

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

DISSERTATION

Untersuchungen zur antagonistischen Rolle von
Glutathionperoxidase-4 (Gpx4) und 12/15-Lipoxygenase
(Alox15) in der Embryogenese und Spermatogenese von
gentechnisch veränderten Mausmodellen

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Simone Hanna Brütsch

aus Singen am Hohentwiel

Datum der Promotion: 10.03.2017

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1	ABSTRACT	3
2	EINLEITUNG	5
2.1	EMBRYOGENESE DER MAUS	5
2.2	SPERMATOGENESE	7
2.3	SELEN – EIN ESSENZIELLES SPURENELEMENT	9
2.4	BIOSYNTHESE VON SELENOPROTEINEN	10
2.5	GLUTATHIONPEROXIDASEN ALS TEIL DER SELENOPROTEINE	11
2.6	DIE GPX4 ALS VERTRETER DER GLUTATHIONPEROXIDASEN	14
2.6.1	STRUKTUR	14
2.6.2	ISOFORMEN	15
2.6.3	FUNKTION	15
2.6.4	KNOCKOUT-MODELLE	16
2.7	LIPOXYGENASEN	20
2.7.1	KATALYTISCHER MECHANISMUS DER LIPOXYGENASEN	22
2.8	DIE ALOX15 ALS VERTRETER DER LIPOXYGENASEN	23
2.8.1	STRUKTUR	24
2.8.2	VORKOMMEN UND AKTIVIERUNG	25
2.8.3	FUNKTIONEN	26
2.8.4	KNOCKOUT-MODELL	27
2.9	REDOXSTATUS DER ZELLE	28
2.10	ZIEL DER ARBEIT	29
3	MATERIAL UND METHODEN	30
3.1	MATERIAL	30

Inhaltsverzeichnis

3.2	METHODEN	33
3.2.1	HALTUNG DER MAUSSTÄMME.....	33
3.2.2	KONSTRUKTION DER <i>U46A Gpx4</i> -KNOCKIN-MAUS.....	33
3.2.3	VERPAARUNGSSTRATEGIE.....	36
3.2.4	DNA, RNA UND PROTEINISOLATION	36
3.2.5	GENOTYPISIERUNG DER TIERE.....	37
3.2.6	UMSCHREIBUNG VON mRNA ZU CDNA ODER REVERSE TRANSKRIPTION	38
3.2.7	QRT-PCR.....	38
3.2.8	WESTERNBLOT	39
3.2.9	PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DER GPX4-AKTIVITÄT	39
3.2.10	ENTNAHME VON PERITONEALMAKROPHAGEN	40
3.2.11	ALOX15-AKTIVITÄTSASSAY UND ANALYSE DER REAKTIONSPRODUKTE.....	40
3.2.12	LIPIDANALYTIK – LIPIDEXTRAKTION UND HPLC.....	40
3.2.13	HPLC	41
3.2.14	TESTIS- UND EPIDIDYMISENTNAHME	41
3.2.15	SPERMIENZÄHLUNG.....	42
3.2.16	ZELLZYKLUSANALYSE.....	42
3.2.17	BESTIMMUNG DES VERHÄLTNISSSES VON TUBULI ZU INTERSTITIUM	43
3.2.18	SPERMIENGEWINNUNG	43
3.2.19	MOTILITÄT DER SPERMIEN VON CAUDA UND CAPUT	43
3.2.20	MORPHOLOGIE MITTELS SPERMAC®-FÄRBUNG	44
3.2.21	MORPHOLOGIE MITTELS ELEKTRONENMIKROSKOPIE UND IMMUNOGOLD.....	45
3.2.22	MITOCHONDRIEN-AKTIVITÄT	46
3.2.23	STATISTIK UND AUSWERTUNG	46
4	ERGEBNISSE	48
4.1	ALLGEMEINE CHARAKTERISIERUNG DER <i>U46A Gpx4</i>^{-/+}<i>ALOX15</i>^{+/-}-MAUS	48
4.1.1	REDUKTIONSKAPAZITÄT DER <i>U46A Gpx4</i> ^{-/+} <i>ALOX15</i> ^{+/-} -PERITONEALMAKROPHAGEN.....	51

Inhaltsverzeichnis

4.2	EMBRYONALE LETALITÄT DER HOMOZYGOTEN <i>Gpx4</i>^{+/+} + <i>Alox15</i>^{+/+}-KNOCKIN-MAUS	52
4.2.1	ZEITPUNKT DER EMBRYONALEN LETALITÄT DER <i>U46A Gpx4</i> ^{+/+} + <i>Alox15</i> ^{+/+} -MAUS	53
4.3	EINFLUSS EINER <i>Alox15</i>^{-/-}-DEFIZIENZ AUF LEBENSFÄHIGKEIT VON <i>U46A Gpx4</i>^{+/+}-EMBRYONEN	55
4.3.1	EMBRYONALE LETALITÄT BEI <i>U46A Gpx4</i> ^{+/+} + <i>Alox15</i> ^{-/-} -TIEREN	55
4.3.2	LIPIDZUSAMMENSETZUNG DER <i>U46A Gpx4</i> ^{-/+} + <i>Alox15</i> ^{-/-} -PERITONEALMAKROPHAGEN	57
4.4	FERTILITÄT DER <i>U46A Gpx4</i>^{-/+} + <i>Alox15</i>^{+/+}-MÄNNCHEN	59
4.5	FERTILITÄT DER <i>U46A Gpx4</i>^{-/+} + <i>Alox15</i>^{-/-}-MÄNNCHEN	61
4.6	CHARAKTERISIERUNG DER <i>U46A Gpx4</i>^{-/+} + <i>Alox15</i>^{+/+}-SPERMEN	63
4.6.1	MOTILITÄT DER <i>U46A Gpx4</i> ^{-/+} + <i>Alox15</i> ^{+/+} -SPERMEN VON CAUDA UND CAPUT	65
4.6.2	MORPHOLOGISCHE UNTERSCHIEDE DER <i>U46A Gpx4</i> ^{-/+} + <i>Alox15</i> ^{+/+} -SPERMEN IM VERGLEICH ZU <i>U46A Gpx4</i> ^{-/+} + <i>Alox15</i> ^{+/+} -SPERMEN	68
4.7	SPERMEN DER <i>U46A Gpx4</i>^{-/+} + <i>Alox15</i>^{-/-}-MAUS	74
4.7.1	VERÄNDERUNG DER TESTISPARAMETER BEI EINER ZUSÄTZLICHEN HOMOZYGOTEN INAKTIVIERUNG DER <i>Alox15</i> IN HETEROZYGOTEN <i>U46A Gpx4</i> ^{-/+} + <i>Alox15</i> ^{+/+} -MÄUSEN	74
4.7.2	MORPHOLOGISCHE UNTERSCHIEDE DER <i>U46A Gpx4</i> ^{-/+} + <i>Alox15</i> ^{-/-} -SPERMEN IM VERGLEICH ZU <i>U46A Gpx4</i> ^{-/+} + <i>Alox15</i> ^{+/+} - UND <i>U46A Gpx4</i> ^{-/+} + <i>Alox15</i> ^{+/+} -SPERMEN	79
4.7.3	OXIDATIVER STATUS DER SPERMEN	82
5	DISKUSSION	84
5.1	BEDEUTUNG DER <i>Gpx4</i> IN DER EMBRYOGENESE	84
5.2	CHARAKTERISIERUNG DER <i>U46A Gpx4</i>^{-/+} + <i>Alox15</i>^{+/+}-MÄUSE	86
5.3	BEDEUTUNG DER <i>Gpx4</i> ALS ENDOGENER LOX-INHIBITOR	87
5.4	BEDEUTUNG DER <i>Gpx4</i> IN DER FERTILITÄT	89
5.4.1	UNTERSCHIEDE ZWISCHEN EINER ENZYMATISCHEN INAKTIVIERUNG DER <i>Gpx4</i> DURCH ALANIN UND SERIN	90
5.5	BEDEUTUNG DER <i>Gpx4</i> IN DER SPERMATOGENESE	91
5.5.1	BEDEUTUNG DER <i>Gpx4</i> IN DER FERTILITÄT UND MOTILITÄT DER SPERMEN	93
5.6	BEDEUTUNG DER ANTAGONISIERENDEN ENZYME <i>Gpx4</i> UND <i>Alox15</i> IN DER SPERMATOGENESE UND FERTILITÄT	94

Inhaltsverzeichnis

5.7	LIMITATIONEN DER ARBEIT	98
5.7.1	ALLGEMEINE LIMITATIONEN.....	98
5.7.2	METHODENKRITIK.....	99
5.8	AUSBLICK	100
5.9	SCHLUSSFOLGERUNG	102
6	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>103</u>
7	<u>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</u>	<u>118</u>
8	<u>PUBLIKATIONSLISTE.....</u>	<u>120</u>
9	<u>LEBENS LAUF.....</u>	<u>122</u>
10	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>123</u>

Abkürzungsverzeichnis

12-H(p)ETE	12-Hydroperoxy-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
Alox15	Lipoxygenase15-1; 12/15-Lipoxygenase
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
C	Cystein
cGpx4	Zelluläre Glutathionperoxidase 4
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Embryonaltag
Fe	Eisen (Ferrum)
Gpx	Glutathionperoxidase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
Hif	Hypoxyinduzierter Faktor
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie („high performance liquid chromatography“)
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Lox	Lipoxygenase
mGpx4	Mitochondriale Glutathionperoxidase

Abkürzungsverzeichnis

mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
nGpx4	Nukleäre Glutathionperoxidase 4
nm	Nanometer
P	Postnatal
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäuren
PVL	Periventrikuläre Leukomalazie
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR (real-time quantitative PCR)
ROS	Reaktives Sauerstoffspezies
S	Serin
SECI	Selenocysteininsertierende Sequenz (selenocysteine insertion sequence)
SSDM	spondylometaphysalen Dysplasie vom Sedaghatian-Typ
tRNA ^{Sec}	Transfer-Ribonukleinsäure für Selenocystein
U	Selenocystein
XnXc	X Chromosomen X Chromatiden
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Zusammenfassung

Der Redoxstatus ist für das Genexpressionsmuster und damit für die metabolische Homöostase von Zellen bedeutsam. Eine Störung des Redoxgleichgewichts kann zu Krankheiten wie Arteriosklerose oder Krebs führen. Die Glutathionperoxidase-4 (Gpx4) und die 15-Lipoxygenase (Alox15) sind funktionelle Gegenspieler im Redoxsystem tierischer Zellen. Die Gpx4 reduziert komplexe Hydroperoxylipide, wirkt als endogener Alox15-Inhibitor und fungiert gleichzeitig als Strukturprotein. Systemische Inaktivierung des *Gpx4*-Gens führt zur Letalität homozygoter Knockout-Embryonen, während sich *Alox15*-Knockout-Mäuse normal entwickeln. Ein spermien-spezifischer Knockout des *Gpx4*-Gens führt zur Infertilität männlicher Mäuse. Bislang war unklar, ob die embryonale Letalität der *Gpx4*-defizienten Mäuse auf den Mangel an Gpx4-Aktivität oder auf das Fehlen des Strukturproteins zurückzuführen ist. Es konnte nicht geklärt werden, ob Gpx4 und Alox15 auch in vivo als funktionelle Gegenspieler wirken und ob ein funktioneller Knockout der *Alox15* die Defizite der Inaktivierung des *Gpx4*-Gens rückgängig machen kann. Um diese Fragen zu beantworten, haben wir ein murines Knockin-Modell hergestellt, bei dem das *Gpx4*-Gen durch ein Konstrukt ersetzt wurde, das für ein katalytisch inaktives Enzym (*U46A Gpx4*) kodiert. Mit diesem Modell wurden die embryonale Letalität homozygoter Embryonen und die Fertilität heterozygoter Merkmalsträger untersucht. Um den Effekt der Inaktivierung der *Alox15* auf diese Knockin-Mäuse zu untersuchen, wurde in einem zweiten Schritt ein homozygoter *Alox15*-Knockout in die *Gpx4* defizienten Mäuse eingekreuzt.

Heterozygote *Gpx4*-Knockin-Mäuse (*U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*) entwickeln sich normal, während homozygote *U46A Gpx4^{+/+}+Alox15^{+/+}*-Mäuse zwischen Embryonaltag 6.5 und 7.5 absterben. Die embryonale Letalität konnte durch einen zusätzlichen Knockout der *Alox15* (*U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*) nicht kompensiert werden. Männliche *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Mäuse weisen eine reduzierte Fertilität auf, die sich durch eine verminderte Motilität ihrer Spermien und durch morphologische Veränderungen in den Mittelstücken manifestieren. Die reduzierte Fertilität der *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Mäuse und die schlechtere Motilität ihrer Spermien konnte durch einen zusätzlichen homozygoten Knockout der *Alox15* (*U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*) ausgeglichen werden. Bei

einzelnen Individuen kam es zudem zur Normalisierung der morphologischen Veränderungen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die embryonale Letalität *Gpx4*-defizienter Maus-Embryonen durch den Verlust der katalytischen Aktivität der *Gpx4* (*U46A Gpx4^{+/+}+Alox15^{+/+}*) verursacht wird. Die embryonale Letalität konnte durch einen zusätzlichen homozygoten Knockout der *Alox15* (*U46A Gpx4^{+/+}+Alox15^{-/-}*) nicht kompensiert werden. Jedoch konnte die Subfertilität heterozygoter *Gpx4*-Knockin-Männchen (*U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*) und die verminderte Motilität ihrer Spermien durch einen zusätzlichen homozygoten Knockout der *Alox15* (*U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*) ausgeglichen werden.

1.1 Abstract

The redox-status is important for the expression pattern of cells and thus it contributes to the regulation of the cellular metabolism. Dysregulation in the cellular redox homeostasis has been related to the pathogenesis of various diseases such as atherosclerosis and cancer. *Alox15* and *Gpx4* are functional counterplayers in metabolism of complex hydroperoxy lipids. *Gpx4* reduces *Alox15*-derived hydroperoxy lipids, acts as endogenous *Alox15* inhibitor but also functions as structural protein (moonlighting character). Homozygous *Gpx4*-deficient animals die at an early stages of embryogenesis and sperm specific disruption of the *Gpx4* gene leads to male infertility. Because of the moonlighting character of *Gpx4* it remained unclear whether the lack of catalytic *Gpx4* activity or the deficiency of the structural protein might be considered the major cause of embryonic lethality. Moreover, it has not been explored in the past whether systemic inactivation of the *Alox15* gene might reverse the defective phenotypes induced by *Gpx4* deficiency.

To address these questions we created *Gpx4* knockin mice, in which the *Gpx4* gene was replaced by a mutant construct that encodes for a catalytically silent enzyme variant (*U46A Gpx4*). In a second step viable heterozygous *Gpx4* knockin mice (*U46A Gpx4^{+/-}*) were crossbred with *Alox15* knockout mice (*Alox15^{-/-}*) to explore the impact of *Alox15* on *Gpx4* deficiency.

Employing these *Gpx4* knockin mice we found that homozygous animals (*U46A Gpx4^{+/+}+Alox15^{+/+}*) die *in utero* between E6.5-7.5 and additional *Alox15*-deficient (*U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{-/-}*) did not rescue embryonic lethality. In contrast, heterozygous knockin mice (*U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{+/+}*) were viable but sperms extracted from the epididymal cauda of *U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{+/+}* mice exhibited impaired motility characteristics. Detailed morphological studies including immune electron microscopy indicated structural midpiece alterations within the mitochondrial capsule. When *U46A Gpx4^{+/-}*-mice were crossed with *Alox*-deficient animals the resulting males (*U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{-/-}*) exhibited improved fertility and motility characteristics. In some individuals we even detected wildtype-like morphological sperm characteristics.

Taken together these data indicate that *Alox15* deficiency does not rescue the lethal phenotype of *U46A Gpx4^{+/+}* knockin mice. Heterozygous expression of a catalytic inactive *Gpx4* variant (*U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*) impairs male but not female fertility. Additional systemic inactivation of the *Alox15* gene (*U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*) improves the sperm motility characteristics and normalizes male fertility to wildtype levels.

2 Einleitung

2.1 Embryogenese der Maus

Die Embryogenese der Maus beginnt mit der Verschmelzung von Eizelle und Spermium (Fertilisation, Abbildung 2-1, Embryonaltag E 0). Dabei entsteht die Zygote, die sich durch mehrere Mitosen zur Blastozyste differenziert. Während der Nidation (E 5) verschmilzt sie mit der Uterusschleimhaut.¹ Die Embryogenese der Maus geht von Embryonaltag E 0 bis E 13 (Abbildung 2-1). Sie beinhaltet die Organogenese und die Differenzierung der einzelnen Gewebe (Köhnlein et al., 2001).

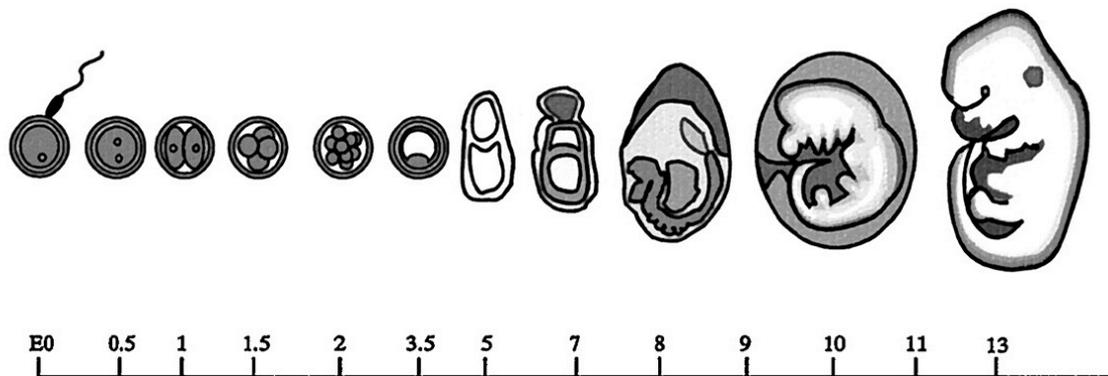


Abbildung 2-1: Embryogenese der Maus (modifiziert nach Bouvard et al. (2001))

Darstellung der Embryogenesestadien der Maus. Diese gehen von Embryonaltag E 0 bis E 13. Danach wird bis zur Geburt (E 21) von der Fetogenese gesprochen.

Zwischen E 6.5 und E 7.5 bildet sich die Körperachse heraus (Arnold et al., 2009). Die Gastrulation beginnt am Tag E 6.5 (Blum et al., 1992). Ab E 7 werden hämatopoietische Stammzellen im Dottersack gefunden (M. A. Moore et al., 1970). Die Neurulation, die Bildung des Neuralrohrs, beginnt ab E 7.5. Aus dem Neuralrohr entsteht letztendlich das Gehirn und das Rückenmark.¹ An die Embryogenese schließt sich die Fetalperiode an, die sich von E 14 bis zur Geburt der Tiere (E 21) erstreckt.¹ In dieser Periode der Individualentwicklung kommt es zum Wachstum des Fetus.

¹ Hill, M.A. . (2015). Embryology Mouse Timeline Detailed. Recherchedatum 6.11.2015

Der Stoffwechsel des Embryos unterliegt während der Embryogenese deutlichen Veränderungen. Vor der Implantation in die Uterusschleimhaut durchlebt der Embryo aufgrund einer mangelnden Blutversorgung eine Entwicklungsperiode, die durch einen chronischen Mangel an energieliefernden Substraten, wie Glukose und Sauerstoff, gekennzeichnet ist. Sowohl Glukose als auch Sauerstoff erhält der Embryo ausschließlich durch Diffusion aus extrazellulärer Flüssigkeit. Durch den relativen Sauerstoffmangel ist der Energiestoffwechsel im Wesentlichen auf die Glykolyse beschränkt. Energieliefernde Substrate, wie Fettsäuren, Aminosäuren und Ketonkörper, über die mitochondriale Atmung umgesetzt werden müssen, stehen dem Embryo aufgrund des relativen Sauerstoffmangels in dieser Entwicklungsphase kaum zur Verfügung (B. Fischer et al., 1993). Damit ist der Energiestoffwechsel durch einen relativen ATP-Mangel und durch eine Adaptation an die hypoxischen Bedingungen gekennzeichnet. Nach der Implantation in die Uterusschleimhaut verbessert sich das Sauerstoff- und Substratangebot drastisch. Über die gut durchblutete Uterusschleimhaut der Mutter wird der Embryo nun mit einem relativen Überangebot an energieliefernden Substraten und an Sauerstoff versorgt. Unter diesen Bedingungen spielt der ATP-Mangel keine Rolle mehr, da nun die energieliefernden Substrate durch den effektiven aeroben Energiestoffwechsel metabolisiert werden können. Gleichzeitig kommt es aufgrund der verbesserten Sauerstoffversorgung zur Stoffwechselumstellung, die dem Reperfusionssyndrom ähnelt. Der Embryo wird den hohen Sauerstoffkonzentrationen des mütterliche Blutes ausgesetzt, was zum oxidativem Stress führt (New et al., 1970), der durch eine vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gekennzeichnet ist. Deshalb spielt ein fein abgestimmtes anti-oxidatives Schutzsystem während der Embryogenese eine besonders bedeutsame Rolle. Durch Dysregulationen der embryonalen Redoxhomöostase entstehen erhöhte Konzentrationen an oxidierend wirkenden Substanzen, wie z.B. Wasserstoffperoxid. Dadurch kommt es zu einer fehlerhaften Embryogenese mit Fragmentation und Apoptose (H. W. Yang et al., 1998).

Andererseits werden für die Initiierung der Embryogenese erhöhte Mengen an Superoxid benötigt. Die Befruchtung einer Eizelle durch ein Spermium erfordert die Sprengung der Zona pellucida (Hatching) und dieser Prozess erfordert eine definierte Menge an Superdioxid. Die Superoxidkonzentration ist zu diesem Zeitpunkt um ein Zehnfaches höher als vor oder nach dem Hatching (Thomas et al., 1997).

2.2 Spermatogenese

Die Spermatogenese beschreibt die Bildung und Reifung der Spermien.² Sie findet vor allem im Testis statt, wobei finale Reifungsprozesse auch im Nebenhoden ablaufen. Neben der Spermatogenese produziert der Testis auch männliche Geschlechtshormone in den Leydig-Zellen. Die Spermatogenese findet im Keimepithel der Samenkanälchen statt (Abbildung 2-2). Als Stützzellen dienen die Sertoli-Zellen. Die Reifung wird in drei Stufen unterteilt: i) mitotische Vermehrung, ii) meiotische Reifung, iii) Spermiogenese (finale Spermiendifferenzierung). In der ersten Stufe kommt es zur Mitose der Stammzellen (Typ A-Spermatogonien). Dabei entstehen entweder neue Typ A-Spermatogonien, die als Vorläuferzellen verweilen, oder Typ B-Spermatogonien, die in die Meiose eintreten. Durch Plasmabrücken zwischen den Keimzellen wird eine synchrone Reifung der einzelnen Spermiengenerationen realisiert. In der ersten meiotischen Reifeteilung werden primäre Spermatozyten mit einem doppelten Chromosomensatz mit vier Chromatiden ($2n4c$) zu sekundären Spermatozyten ($1n2c$). Nach der zweiten Reifeteilung der Meiose kommt es in den Spermatischen ($1n1c$) zur Metamorphose und letztendlich zur Freisetzung der Spermien ins tubuläre Lumen der Testiskanälchen. Die Blut-Testis-Schranke befindet sich zwischen den Spermatogonien und den Spermatozyten. Sie dient als Schutz vor schädigenden Einflüssen des Organismus und als Schutz der reifenden Keimzellen vor Antikörpern aus dem Organismus. Ab der Meiose unterscheidet sich der Genotyp der einzelnen Spermatozyten. Durch Rekombination und Reduktionsteilungen verändert er sich und würde als körperfremd erkannt werden.

² For Miller-Keane Encyclopedia: spermatogenesis. (n.d.) Miller-Keane Encyclopedia and Dictionary of Medicine, Nursing, and Allied Health, Seventh Edition. (2003). Recherchedatum 6.11.2015

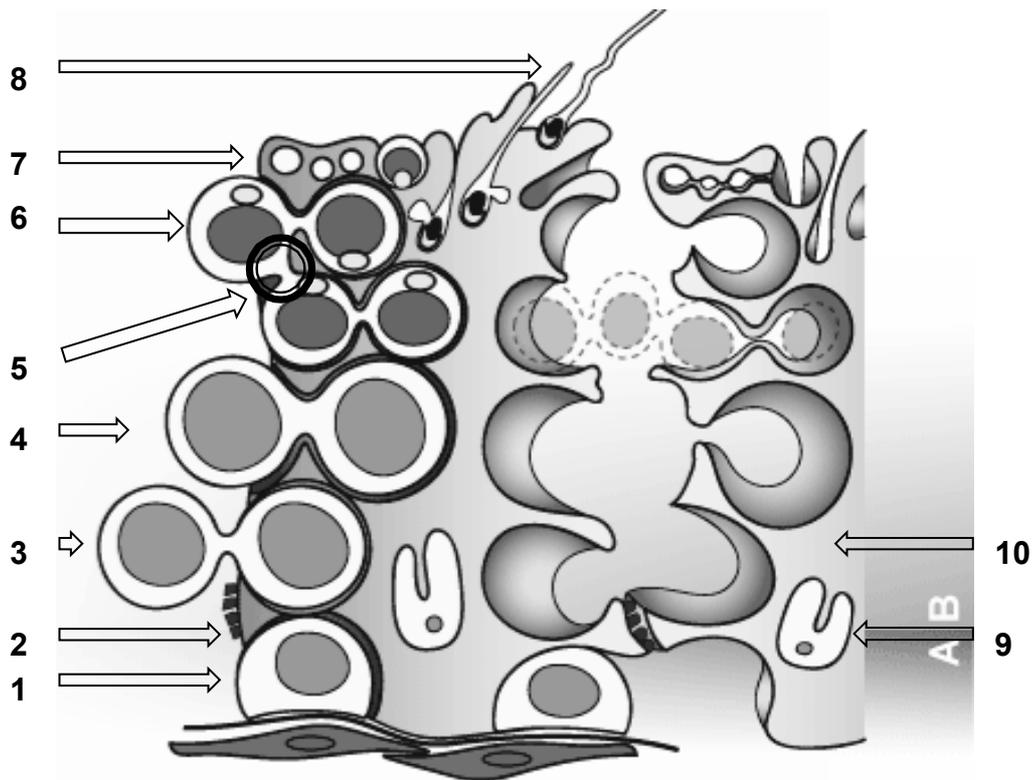


Abbildung 2-2: Spermatogenese im Keimepithel des Hoden

Schematische Darstellung der Spermatogenese im Keimepithel der Maus.

Die Spermatogonien (Typ A & B sind nicht unterschieden, 1: $2n4c$) sind im Bereich A basal der Bluttestisschranke dargestellt, die durch Tight junctions (2) gebildet wird. Im luminalen Verlauf sind die Meiosestadien dargestellt. Primäre (3: $2n4c$) und sekundäre Spermatozyten (4: $1n2c$). Die Spermio-genese beginnt ab den Spermatozyten (6: $1n1c$) und endet in dieser Darstellung mit den Spermien (8: $1n1c$), die noch nicht ins Lumen freigegeben wurden. Das Zytoplasma, das die Spermien in der Reifung abstoßen, wird auch als Residualkörper (7) bezeichnet. Die einzelnen Stadien sind durch Plasmabrücken (5) miteinander verbunden. Als Stützepithel dienen Sertolizellen (10: $2n1c$), deren Zellkerne (9) der Vollständigkeit halber abgebildet sind. Die Anzahl der Chromosomen sind als n und die Anzahl der Chromatiden als c angegeben.

(modifiziert nach (o.V.)Online Embryologiekurs für Studierende der Medizin, Recherchedatum 22.10.2015)

In der Spermio-genese kommt es zur (i) Ausbildung des Akrosoms, (ii) Reduktion des Zytoplasmas, (iii) Zellkernkondensation und (iv) Geißelbildung, woraus letztendlich der Schwanz entsteht. Der Plasmotropfen wird abgestreift. Das fertige Spermium wird in Kopf, Mittelstück und Schwanz unterteilt (Abbildung 2-3). Im Mittelstück sind die Mitochondrien in einer mitochondrialen Kapsel eingebettet, die aus polymerisierten Proteinen, unter anderem aus der Gpx4, besteht (Ursini et al., 1999). An Tag P(Postnatal) 0 gibt es Sertoli-Zellen, sowie Gonozyten, die sich bis Tag P 6 zu

primitiven Typ A-Spermatogonien differenzieren (Bellve et al., 1977). An Tag P 8 erscheinen erstmals Typ B-Spermatogonien (Bellve et al., 1977). Erste Stadien der primären Spermatozyten werden an Tag P 10 beschrieben, sekundäre Spermatozyten ab P 18. An Tag P 35 ist die Spermiogenese zum ersten Mal komplett abgelaufen (Vergouwen et al., 1993).

Nach Abschluss der Reifung im Testis verweilen die Spermien für vier bis sechs Tage in der Epididymis (Adler, 1996). Während der Passage in der Epididymis sinkt der Wasseranteil des Seminalplasmas (Da Silva et al., 2006) und der Proteinanteil steigt an (Fouchecourt et al., 2000). Mit der Reifung in der Epididymis ändert sich auch die Zusammensetzung der Lipide der Spermienmembran. Dabei nimmt die Fluidität der Membran und die Anzahl der negativen Ladungen zu (Kawano et al., 2011).

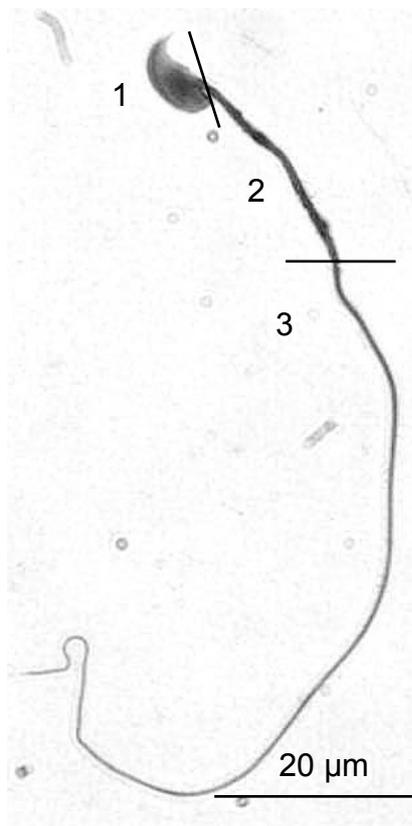


Abbildung 2-3: Spermium

1 = Kopf mit Akrosom, 2= Mittelstück,
3=Schwanz

Bisher ist noch nicht abschließend geklärt, ob die Energie für die Motilität der Spermien aus den Mitochondrien und daher aus der Atmungskette oder aus der Glykolyse stammt (Ford, 2006). Wie auch in anderen Zellen sind die Komplexe I und III der Atmungskette die Hauptquelle für ROS (Koppers et al., 2008). Die Motilität der Spermien hängt unter anderem von der Konzentration der ROS ab, wobei sowohl zu viel als auch zu wenig ROS die Motilität negativ beeinflussen (Aitken, 1995; Griveau et al., 1994). Deshalb ist ein ausgewogener Peroxidstoffwechsel für die Spermien von großer Bedeutung.

2.3 Selen – ein essenzielles Spurenelement

1817 wurde Selen von Jöns Jakob Berzelius das erste Mal beschrieben. Es gehört als Halbmetall zur sechsten Hauptgruppe des Periodensystems der Elemente. Erstmals 1916 im menschlichen Organismus nachgewiesen (Gassmann, 1916),

ergaben nachfolgende Untersuchungen, dass es sich bei Selen um ein essenzielles Spurenelement handelt (Schwarz et al., 1957). Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung empfiehlt die Aufnahme von 30 - 70 µg pro Tag für Erwachsene³. Eine Studie aus China gibt die Obergrenze mit 400 µg pro Tag an (G. Yang et al., 1989). Die chronisch toxische Schwellendosis liegt bei 800 µg pro Tag (Leitzmann, 2003). Untersuchungen bei Selenintoxikationen haben eine akute Selenose für 3 - 7 mg Selen ergeben (Biesalski et al., 2004). Dabei kann es zu Symptomen wie Diarrhoe, Fäulnis der Zähne oder Herzmuskelschwäche kommen.

Selenmangel führt zu mannigfaltigen Erscheinungen beim Menschen. Ein Beispiel ist die Keshan-Krankheit, eine juvenile Kardiomyopathie. Diese wurde erstmalig von chinesischen Forschern in einer Region mit Selenmangel (tägliche Aufnahme <10 µg) beschrieben ("Epidemiologic studies on the etiologic relationship of selenium and Keshan disease," 1979; Levander et al., 1997). Zur Myopathie kommt es wahrscheinlich auf Grund des Selenmangels in Verbindung mit einer Coxsackie-Virus-Infektion. Wallace et al. (1983) haben Mäuse für drei Generationen selen-defizient ernährt und anschließend Caudaspermien untersucht. Sie haben fehlerhaft angeordnete Mitochondrien im Mittelstück und Defekte in den Mitochondrienmembranen gefunden. Daraus folgerten Wallace et al., dass es durch eine Selen-Defizienz zu einer defekten Bildung der Mitochondrienkapsel im Mittelstück der Spermien komme. Die Autoren spekulieren über den Einfluss von Disulfidbrücken des Selenocysteins und eine Fehlkonformation der Mitochondrien durch die Defizienz.

2.4 Biosynthese von Selenoproteinen

Das Selenocystein (U) ist die 21. proteinogene Aminosäure. Sie stellt eine Variation des Cysteins dar. Es kommt statt der funktionellen Thiolgruppe des Cysteins zu einer Selenol-Gruppe. Die Aminosäure wird auf mRNA-Ebene durch das Stopcodon UGA codiert. Thiol-Selenolgruppen sind nukleophiler als Thiolgruppen und liegen bei physiologischen Bedingungen (pH 7,4) als Anion dissoziiert vor. Der pKs-Wert beträgt 5,7 für das Selenocystein, der des Cysteins 8,4. Man nahm an, dass Proteine, die ein Selenocystein im aktiven Zentrum nutzen, reaktionsfreudiger seien als Enzyme, die Cystein nutzten. Experimente konnten bestätigen, dass es durch einen Austausch des

³ Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V., (2015). Recherchedatum 02.11.2015

Selenocysteins der Gpx4 gegen ein Cystein, zu einen starken Abfall der katalytischen Aktivität der Enzyme kommt (Maiorino et al., 1995).

Die Umkodierung des UGA-Stopcodons zu einem Selenocystein-kodierenden Triplet ist gekoppelt an die Existenz einer Selenocystein-Insertionssequenz (SECIS), die bei Säugetieren im 3'-untranslatierten Bereich der mRNA liegt. Diese Sequenz ist für den kontrollierten Einbau des Selenocysteins verantwortlich. Sie verhindert das vorzeitige Beenden der Translation und ist ein Schutz vor Trunkation der meisten Selenoproteine. Selenoproteine sind überlebenswichtig. Bosl et al. (1997) zeigten, dass tRNA^{Sec}-Knockoutmäusen kurz nach Implantation noch vor E 6.5 letal sind und resorbiert werden.

Bei Selenmangel kommt es zu einer Hierarchie der Expression der Selenoproteine und der Verteilung des Selens im Organismus. Bei Beginn von Mangelzuständen kommt es weder im Gehirn noch im Testis zu einer verminderten Selenkonzentration. Weiterhin wirkt sich ein beginnender Selenmangel auf die Expression der Gpx1 sehr stark aus (Expressionshemmung), während die Expression der Gpx4 und des Selenoproteins P (Behne et al., 1988; Behne et al., 2001; K. E. Hill et al., 1992) kaum beeinflusst wird.

2.5 Glutathionperoxidasen als Teil der Selenoproteine

Bei Menschen gibt es 25, bei Nagern 24 Selenoproteine (Kryukov et al., 2003). Eine Subgruppe der Selenoproteine sind die Glutathionperoxidasen. Alle Glutathionperoxidasen reduzieren organische und anorganische Hydroperoxide zu den entsprechenden Hydroxy-Verbindungen. So wird zum Beispiel Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zu Wasser (H₂O) reduziert. Für die Peroxidreduktion nutzen die Peroxidasen entweder GSH oder andere Elektronendonatoren. Mit den frei werdenden Elektronen von der Oxidation ($2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$) wird das Peroxid (ROOH) zu einem Alkohol (ROH) reduziert (Abbildung 2-4). Die Regeneration des oxidierten Glutathions (GSSG) erfolgt durch eine Glutathionreduktase unter Verbrauch von NADPH/H⁺.

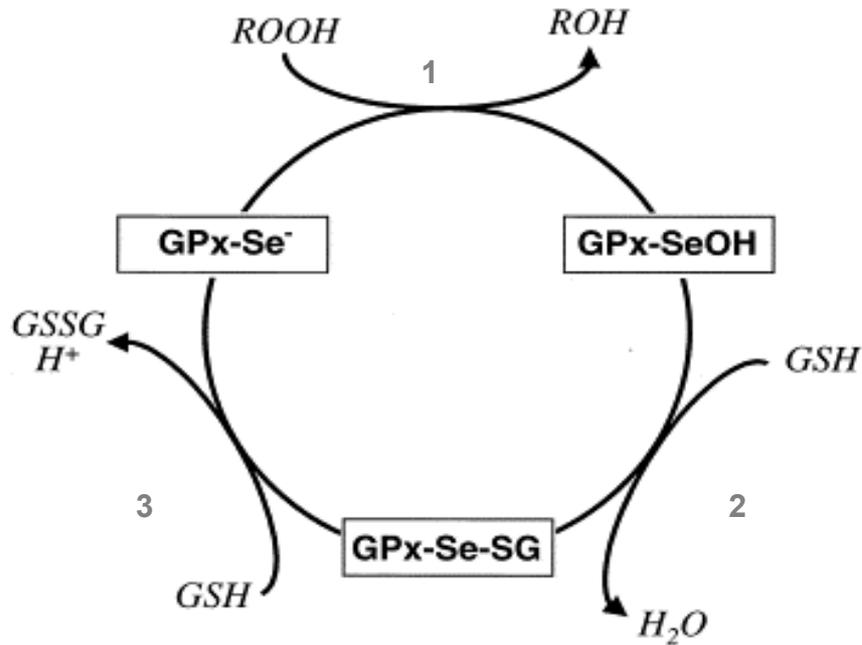


Abbildung 2-4: Reaktionsmechanismus der Glutathionperoxidasen (modifiziert nach Kuhn et al. (2002))

Abgebildet ist der Reaktionsweg der Glutathionperoxidasen. Selen liegt im Enzym dissoziiert als Anion vor ($GPx-Se^-$).

- (1) Im ersten Schritt wird ein Hydroperoxid ($ROOH$) reduziert, während Selen kurzfristig zu einer Säure oxidiert wird ($GPx-SeOH$).
- (2) Ein Glutathion (GSH) bindet unter Abspaltung von Wasser (H_2O) an das Selen.
- (3) Das zweite GSH reduziert das Selen und es entsteht ein oxidiertes Glutathion ($GSSG$) und ist somit regeneriert. Das regenerierte Selen steht jetzt für einen neuen Zyklus zur Verfügung.

Nach heutigem Kenntnisstand gibt es acht Glutathionperoxidasen (Toppo et al., 2008) (siehe Tabelle 2-1). Die erste Glutathionperoxidase wurde durch Mills (1957) beschrieben. Sie ist das erste Mal aus Erythrozyten isoliert worden. Die Gpx1 ist in allen Zellen zu finden und wurde auch intrazelluläre Gpx genannt (Lubos et al., 2011). Die Gpx2 wurde erstmals von Chu et al. (1993) erwähnt. Sie ist im Gastrointestinaltrakt bei Menschen und Nagern zu finden. Die plasmatische Gpx ist 1987 entdeckt und im selben Jahr als Gpx3 identifiziert worden (Maddipati & Marnett, 1987). Die zytosolische Gpx4 wird erstmals durch Ursini et al. (1982) aus der Schweineleber isoliert.

Die Gpx5 ist durch Ghyselinck, Jimenez, et al. (1990) beschrieben und im selben Jahr mit den Glutathionperoxidasen assoziiert worden (Ghyselinck & Dufaure, 1990).

Einleitung

Tabelle 2-1: Bisher bekannte Glutathionperoxidasen

Isoform	weitere Namen	Struktur	Hauptlokalisierung	Erstbeschreiber
Gpx1	zelluläre Gpx / C-Gpx	Tetramer (U)	ubiquitär, gering im männlichen Reproduktionstrakt und endokrine Organe	(Mills, 1957)
Gpx2	GI-Gpx	Tetramer (U)	gastroenteral: human und murin, Leber: human	(Chu et al., 1993)
Gpx3	Plasma-Gpx	Tetramer (U)	Plasma, Lunge, Leber	(Maddipati, Gasparski, et al., 1987)
Gpx4	Phospholipid-Hydroperoxid Gpx / PH-Gpx	Monomer (U)	männlicher Reproduktionstrakt (Testis, Spermien) und endokrine Organe ((Roveri et al., 1994))	(Ursini et al., 1982)
Gpx5	epididymal sekretorische Gpx	Tetramer (C)	männlicher Reproduktionstrakt (Epididymis, Spermien)	(Ghyselinck, Jimenez, et al., 1990)
Gpx6	-	Tetramer (Maus (C), Human (U))	olfaktorisches Riechepithel	(Dear et al., 1991)
Gpx7	NP-Gpx, non-selen-PH-Gpx	Monomer (C)	Brustdrüse	(Utomo et al., 2004)
Gpx8	-	Monomer (C)		(Toppo et al., 2008):

Die Gpx7 und Gpx8 enthalten kein Selenocystein und sind erstmalig durch Utomo et al. (2004) beschrieben worden. Bisher ist noch nicht abschließend geklärt, ob die Gpx8 nur eine Unterform der Gpx7 oder eine eigenständige Isoform ist (Pubmed Gene: *Gpx8*: „putative“⁴). Die Gpx6 enthält bei Mäusen und Ratten, im Gegensatz zum Menschen, kein Selenocystein (Kryukov et al., 2003). Sie ist das erste Mal von Dear et al. (1991) im Riechepithel gefunden worden.

⁴ Pubmed: Recherchedatum 10.10.2015; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/69590>

2.6 Die Gpx4 als Vertreter der Glutathionperoxidasen

Die Gpx4 ist ein monomeres Enzym. Im Gegensatz zu den tetrameren Glutathionperoxidasen kann sie neben löslichen Peroxiden auch komplexe Hydroperoxyfettsäuren reduzieren (Brigelius-Flohe et al., 2013; Ursini et al., 1982). Als Elektronendonator können sowohl Glutathion, Thiole aus Proteinen oder enzymeigene Thiolgruppen dienen (Ursini et al., 1999).

2.6.1 Struktur

Beim Menschen liegt das GPX4 Gen auf dem Chromosom 19 während das orthologe Maus-Gen auf dem Chromosom 10 lokalisiert ist. Beide Gene bestehen aus sieben Exons, wobei das erste Exon als Variante Ia für die zytosolische und mitochondriale Isoform und die Variante Ib für die nukleäre Isoform vorhanden ist. Die Gpx4 unterliegt keinen posttranslationalen Veränderungen (Roveri et al., 1994). Lange Zeit gab es keine Informationen über die Gpx4-Struktur, da sie unter aeroben Bedingungen schnell polymerisiert (Scheerer et al., 2007). Durch die Anwesenheit von reduzierend wirkenden Substanzen [Tris(2-carboxyethyl)phosphin] konnte die Sec46Cys-Mutante der humanen GPX4 kristallisiert und hinsichtlich ihrer 3D-Struktur aufgeklärt werden (Scheerer et al., 2007).

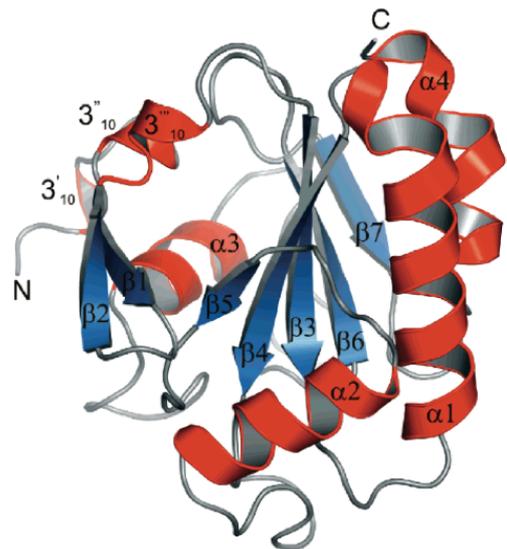


Abbildung 2-5: Dreidimensionale Struktur der Gpx4

Abgebildet ist die dreidimensionale Struktur der humanen GPX4. Es sind die β -Faltblätter (blau) und die α -Helices (rot) dargestellt. (modifiziert nach Scheerer et al. (2007))

Die Tertiärstruktur der Gpx4 enthält ein typisches Thiofloxidase-Motiv (Martin, 1995) mit vier α -Helices und sieben β -Faltblättern (siehe Abbildung 2-5). Das aktive Zentrum ist in einer Vertiefung an der Enzymoberfläche lokalisiert und enthält drei katalytisch aktive Aminosäuren: Selenocystein 46, Glutamin 81 und Tryptophan 136 (Scheerer et al., 2007). Der N-terminale Bereich des Enzyms (die ersten fünf Aminosäuren) sind strukturell sehr

flexibel (Scheerer et al., 2007) und lassen sich bei Röntgenstrukturanalysen nicht vollständig abbilden. Im Gegensatz zu anderen Gpx-Isoformen (Gpx1) fehlen der Gpx4 zwei Schleifen auf der Enzymoberfläche. Eine dieser Schleifen verdeckt bei anderen Gpx-Isoformen das Tryptophan im aktiven Zentrum. Die Oberflächenexposition des aktiven Zentrums der Gpx4 könnte ein Grund für die Substratvielfalt des Enzyms sein (Scheerer et al., 2007). Zum anderen dienen bei anderen Gpx-Isoformen die Schleifen der Dimerisierung (Maiorino et al., 2007). Das Fehlen dieser Schleifen könnte eine Erklärung sein, weshalb die Gpx4 in Zellen überwiegend als Monomer vorliegt.

2.6.2 Isoformen

Die zytosolische Isoform (cGpx4) wurde als erstes von Ursini et al. (1982) beschrieben. Sie besteht aus 170 Aminosäuren (Pushpa-Rekha et al., 1995) und hat ein Molekulargewicht von ca. 20 kDa (Arai et al., 1996). Die mitochondriale Isoform (mGpx4) wurde erstmals von Pushpa-Rekha et al. (1995) beschrieben. Die Signalsequenz für den Transport ins Mitochondrium ist 27 Aminosäuren lang und wird im Mitochondrium abgeschnitten. Das Molekulargewicht reduziert sich von 23 kDa mit Signalsequenz auf 20 kDa im Mitochondrium (Arai et al., 1996). Die nukleäre Isoform (nGpx4) ist 34 kDa schwer (Behne et al., 1988) und enthält durch das alternative Exon Ib die Signalsequenz für den nukleären Import (Pfeifer et al., 2001). Die cGpx4 wird konstitutionell in fast allen Zellen exprimiert, während die n- und mGpx4 vor allem im männlichen Reproduktionstrakt vorhanden ist (Pfeifer et al., 2001). Die mGpx4 spielt zudem eine wichtige Rolle in der Embryogenese (Borchert et al., 2006).

2.6.3 Funktion

Die exponierte Stellung der Gpx4 im Rahmen der Selenhierarchie weist auf eine wichtige Funktion der Gpx4 hin. Welche biologischen Funktionen das Enzym aber genau ausübt, war lange Zeit unklar und ist auch heute noch im Detail nicht vollständig geklärt. Relativ früh konnte gezeigt werden, dass die Gpx4 verschiedene LOX-Isoformen, besonders die Alox15 (Schnurr et al., 1996) und die Alox5 (Weitzel et al., 1993) hemmt. Durch die Hemmung der Alox5 kommt es zu einer verminderten Leukotrienbiosynthese und damit zu einer Beeinflussung der Entzündungsreaktion (Imai et al., 1998). Auch in der Entwicklung der Arteriosklerose wird eine Rolle der Gpx4 diskutiert (Sattler et al., 1994). Da die Arteriosklerose eine entzündliche Gefäßerkrankung ist, könnte auch hier die antiphlogistische Wirkung des Enzyms

bedeutsam sein. Im Verlauf der Pubertät und des Testiswachstums kommt es zu einem Anstieg der *mGpx4* (Maiorino et al., 1998). Während der Reifung der Spermien wird aus der katalytisch aktiven *Gpx4* ein inaktives Proteinpolymer, das am Aufbau der mitochondrialen Kapsel im Mittelstück der Spermien bedeutsam ist (Ursini et al., 1999). Beim Polymerisierungsprozess handelt es sich um eine Reaktion von Protein-Thiolen der *Gpx4* mit dem Selenocystein eines benachbarten *Gpx4*-Monomers. Dadurch entstehen stabile S-Se-Brücken, die mehrere Monomere zum Polymer verbinden. Dieser Polymerisierungsprozess erfordert zum einen die katalytische Aktivität des Enzyms, zum anderen aber auch dessen Eigenschaft als Strukturprotein zu fungieren (moonlighting Charakter = Doppelfunktion der *Gpx4*) (Schneider et al., 2009). Die *nGpx4* stabilisiert die Kondensation der DNA während der Spermienreifung über eine Oxidation der Protamine (M. Conrad et al., 2005). Infertile Männer haben eine signifikant geringere Menge *Gpx4* in Spermien (Imai et al., 2001).

Imai et al. (2003) wiesen die *Gpx4* an Tag E 7.5 im Ektoderm und an Tag E 8.5 im Dottersack nach. Ab E 10.5 werden alle drei Isoformen in murinen Embryos exprimiert. Dabei ist die *nGpx4* nur auf einem geringen Level mit weniger als 50 Kopien pro 1000 *GAPDH* mRNA Kopien in Gehirn und Herz nachweisbar (Borchert et al., 2006). Die *m-* sowie die *cGpx4* sind mit mehr als 100 Kopien mRNA pro 1000 *GAPDH* mRNA-Kopien auf deutlich höherem Niveau exprimiert (Borchert et al., 2006). In der späten Gastrulation von Tag E 14.5 - 17.5 kommt es zu einer Herabregulierung der *mGpx4* (Borchert et al., 2006). Der genaue Mechanismus der *Gpx4*-Funktion während der Embryogenese ist bisher nicht bekannt. In-vitro-Embryogeneseuntersuchungen, bei denen die *Gpx4*-Expression mit Hilfe der siRNA-Technologie ausgeschaltet wurde, deuten darauf hin, dass das Enzym bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems eine Rolle zu spielen scheint (Borchert et al., 2006). Weiterhin wird eine Funktion der *Gpx4* bei der Erythropoese diskutiert (Kaushal et al., 2011). Diese Hypothese konnten kürzlich durch Experimente mit erythroid-spezifischen Knockout-Mäusen bestätigt werden (Canli et al., 2015).

2.6.4 Knockout-Modelle

Für die *Gpx4* gibt es viele verschiedene gentechnisch veränderte Tiermodelle. Die große Anzahl der Modelle spiegelt zum einen das Interesse der Wissenschaft an dem Enzym wieder, ist zum anderen aber auch Ausdruck der funktionellen Multiplizität

des Proteins. Im Folgenden soll ein thematisch geordneter Überblick über die verfügbaren Modelle gegeben werden. Homozygote konventionelle Keimbahn-Knockouts des *Gpx4*-Gens sind nicht lebensfähig, unabhängig davon, auf welche Weise die funktionelle Inaktivierung des Gens vorgenommen wurde (Garry et al., 2008; Imai et al., 2003; Yant et al., 2003). Es zeigen sich Auffälligkeiten in den Embryonen, wie eine fehlerhafte Höhlenbildung und eine geringere Ausdifferenzierung der Keimblätter (Yant et al., 2003). Ein Neuron-spezifischer Knockout der *Gpx4* führt nicht zu einer embryonalen Letalität, allerdings kommt es ab Tag P 5 zum Gewichtsverlust trotz adäquater Fütterung (Seiler et al., 2008). Die Tiere überleben nicht länger als P 13, bevor sie auf Grund ihres Zustands getötet werden mussten (Seiler et al., 2008). Bei einem induzierbaren systemischen Knockout des *Gpx4*-Gens zwischen dem sechsten und neunten Monat kommt es zum Tod der Tiere durch Kachexie (Yoo et al., 2012). Die genaue Todesursache ist dabei noch nicht endgültig geklärt (Yoo et al., 2012), wobei sich deutliche Symptome einer Neurodegenerationen zeigen. Dieses Ergebnis deckt sich mit Untersuchungen der In-vitro-Embryogenese, bei denen festgestellt werden konnte, dass die Inaktivierung der *Gpx4*-Expression mittels siRNA-Technologie zu einer defekten Entwicklung des embryonalen ZNS kommt (Borchert et al., 2006). Bei einer alleinigen selen-defizienten Ernährung oder einem homozygoten Knockout der *m-* oder *nGpx4* kommt es nicht zu einer embryonalen Letalität von homozygoten Merkmalsträgern (M. Conrad et al., 2005; Schneider et al., 2009; Wallace et al., 1983).

Bei heterozygoten Mäusen kommt es in einigen Knockout-Modellen zu reduzierten *Gpx4* mRNA-Konzentrationen in verschiedenen Geweben (Imai et al., 2009; Imai et al., 2003; Yant et al., 2003). Zudem wurde eine verminderte *Gpx4*-Proteinkonzentrationen im Testis und in der Leber nachgewiesen (Garry et al., 2008). Bei induzierbaren Knockout-Mäusen findet sich in allen untersuchten Geweben eine verminderte Proteinkonzentration der *Gpx4*, die mit einer bis zu 40% verringerten ATP-Produktion einhergeht (Yoo et al., 2012). In den nicht embryonal letalen *mGpx4*-Keimbahn-Knockouts wurden verringerte Mengen an *Gpx4* im Testis und in den Mittelstücken der Spermien nachgewiesen (Schneider et al., 2009).

Bei induzierbaren Knockoutmäusen wurde eine erhöhte Apoptoserate festgestellt (Imai et al., 2003; Yoo et al., 2012). Dem gegenüber fanden Yant et al. (2003) keine

erhöhte Apoptoserate in den Embryonen, die aufgrund eines homozygoten *Gpx4*- Mangels absterben und resorbiert werden. Seiler et al. (2008) beschrieben einen Versuch, bei dem embryonale Fibroblasten aus induzierbaren *Gpx4*-Knockout-Mäusen kultiviert wurden. Nach In-vitro-Induktion des *Gpx4*-Knockouts wurde eine erhöhte Apoptoserate der Zellen nachgewiesen, die durch Zugabe von α -Tocopherol verhindert werden konnte. Dabei wurde auch eine Hochregulation der Expression anderer Glutathionperoxidasen beobachtet. *Gpx4*-defiziente Zellen besitzen eine erhöhte Anfälligkeit für oxidativen Stress (Garry et al., 2008; Imai et al., 2003).

Kaushal et al. (2011) analysierten Veränderungen basaler Blutparameter bei einer selen-defizienten Ernährung. Es kam zum Beispiel zu einem erhöhten Anteil an Methämoglobin sowie zu einer verminderten Stresserythropoiese. Es wurden unzureichend differenzierte Erythrozyten in der Milz gefunden und die Erythrozyten im peripheren Blut waren osmotisch instabil. Zudem fanden sich Heinz-Körperchen in den Erythrozyten, die vor allem aus denaturiertem Hämoglobin bestanden. Über Hif1 kam es zu einer Hochregulation der Erythropoetinsynthese, was eine Gegenregulation der bestehenden Anämie darstellte. Ein erythroid-spezifischer Knockout des *Gpx4*-Gens induzierte bei erwachsenen Mäusen eine Anämie, die durch eine verstärkte Nekroptose in Erythrozytenvorläuferzellen hervorgerufen wurde (Canli et al., 2015). Dieser Effekt kann partiell durch Vitamin E verhindert werden (Canli et al., 2015).

Heterozygote *Gpx4*-Knockout-Tiere zeigen keine phänotypischen Auffälligkeiten und keine Unterschiede in der Anzahl der Nachkommen (M. Conrad et al., 2005; Garry et al., 2008; Imai et al., 2003; Yant et al., 2003). Durch einen spermien-spezifischen Knockout der *Gpx4* vermindert sich das Körper- und Testisgewicht (Imai et al., 2009). Bei einem homozygoten Knockout der *mGpx4* sind männliche homozygote Tiere infertil. Bei einer intrazytoplasmatischen Spermieninjektion in die Eizelle kommt es zu befruchteten Eizellen, die sich nach Embryonentransfer zu normal lebensfähigen Tieren entwickeln (Schneider et al., 2009).

Bei einem spermien-spezifischen Knockout der *Gpx4* sind homozygote Männchen infertil und die Spermienzahl ist stark vermindert (Imai et al., 2009). Bei einem Knockout der *nGpx4* ist die DNA-Kondensation der Spermien im Caput vermindert (M. Conrad et al., 2005). Durch einen Verlust der *mGpx4* kommt es zu abnormalen Mittelstücken. Es werden geschwollene Mitochondrien mit einer

Tabelle 2: Übersicht der *Gpx4*-Knockout-Modelle

Autor	Ort des Knockouts	homozygote embryonale Letalität	mRNA-Level <i>Gpx4</i>	Protein <i>Gpx4</i>	Spermien	Fertilität
Imai et al. (2003)	gesamtes Gen	E7	↓ (T, G, H, N)	k.A.	k.A.	unveränd.
Yant et al. (2003)	Exon 3-7	E 7	↓ (H, Lu, N, G, T)	Konzentration: ↓ (H, Lu, N, G, T)	unveränd.	unveränd.
Garry et al. (2008).	Exon 1	vor E 10	k.A.	Aktivität: ↓ (T, Le)	k.A.	unveränd.
Yoo et al. (2012)	induzierbarer Knockout Exon 2 - 4	Tod nach < 14 Tagen Ind.	k.A.	Konzentration: ↓ (nach Ind. in vielen Geweben)	k.A.	k.A.
Seiler et al. (2008)	neuron-spezifischer Knockout	< P 13	k.A.	Konzentration: ↓ (G)	k.A.	k.A.
Imai et al. (2009)	Spermien-spezifischer Knockout	homozygot lebensfähig	→	Konzentration: ↓ (T,S)	beeinträchtigt	infertil
Schneider et al. (2009)	homozygoter Knockout <i>mGpx4</i>	homozygot lebensfähig	k.A.	Konzentration: ↓ (T, S)	beeinträchtigt	m: infertil
M. Conrad et al. (2005)	homozygoter Knockout <i>nGpx4</i>	homozygot lebensfähig	k.A. (<i>m-</i> und <i>cGpx4</i>)	k.A.	inkomplette DNA-Kondensation	unveränd.
Wallace et al. (1983)	Seleno-defizient	lebensfähig	k.A.	k.A.	beeinträchtigt	k.A.

T = Testis, S= Spermien, Le= Leber, Lu = Lunge, G = Gehirn, H = Herz, E =Embryonaltag, P = Tag Postnatal, m= männlich, unveränd = unverändert, Ind. = Induktion des Knockouts, k.A. = keine Aussage

fehlerhaften Anordnung innerhalb der mitochondrialen Kapsel beschrieben (Imai et al., 2009; Ingold et al., 2015; Schneider et al., 2009). Beim Menschen kommt es durch eine erhöhte Lipidperoxidation zu einer Abnahme der Motilität der Spermien und zu Mittelstückdefekten (Rao et al., 1989). In rund 10% der untersuchten infertilen Männer wird eine geringere Expression der Gpx4 in den Spermien gefunden (Imai et al., 2001).

Durch ein fehlerhaftes Spleißen oder ein vorzeitiges Stopcodon im *Gpx4*-Gen kommt es beim Menschen zur spondylometaphysalen Dysplasie vom Sedaghatian-Typ (SSDM) (Smith et al., 2014). Es werden verkürzte Extremitäten durch metaphysäre Chondrodysplasie, Fehlbildungen im Gehirn und im Herzen beschrieben (Aygün et al., 2012). Alles in allem ist dies eine sehr seltene rezessive Erbkrankheit. Bisher sind 18 Fälle in 12 Familien bekannt (Aygün et al., 2012). Die Lebenserwartung ist gering. Das älteste betroffene Kind ist 161 Tage alt geworden (Koutouby et al., 2000). Als Todesursache in den Fallberichten wurden vorrangig Respirationsprobleme genannt (Aygün et al., 2012). Der Phänotyp weist Parallelen zu gefundenen Veränderungen der embryonal letalen Knockout-Mäuse auf (Imai et al., 2003; Ingold et al., 2015; Yant et al., 2003).

2.7 Lipoxygenasen

Bei Vertebraten sind Lipoxygenasen (Lox) weit verbreitet. Wohingegen weniger als 1% der wirbellosen Tieren funktionelle Lox haben (Horn et al., 2014). Bei Pilzen, Pflanzen und Säugetieren sind sie beschrieben (Horn et al., 2014). Bakterien haben nur teilweise funktionelle *Lox*-Gene (Hansen et al., 2013; Horn et al., 2014). Ein Vergleich der Isoformen der einzelnen Spezies ist problematisch, da die Gene nur eine geringe Homologie zu menschlichen Isoformen aufweisen (Ivanov et al., 2015).

Die erste humane Lipoxygenase ist von Hamberg et al. (1974) in humanen Thrombozyten beschrieben. Sie peroxidiert das zwölfte Kohlenstoffatom der Arachidonsäure und ist daher 12-ALOX genannt worden. Wenig später wurde eine weitere Isoform, die spätere Alox15, aus Retikulozyten von Kaninchen isoliert (Schewe et al., 1975). Beim Menschen sind insgesamt sechs funktionelle LOX-Isoenzyme bekannt (ALOX5, ALOX12, ALOX12B, ALOX15, ALOX15B, ALOXE3, siehe Tabelle 2-3) (Funk et al., 2002).

Tabelle 2-3: Vergleich der humanen und murinen Lipoxygenasen

Mensch	früherer Name	Maus	früherer Name	Hauptexpressionsort	Literatur
ALOX15	12/15-LOX	Alox15	Lc12-LOX*	eosinophile Granulozyten, Bronchialepithel	Sun et al. (1996) Sigal et al. (1992)
ALOX15B	15-LOX2	Alox15b	8-LOX	Haarwurzel, Haut, Prostata	Brash et al. (1997); Jisaka et al. (1997)
ALOX12	pl12-LOX**	Alox12	pl12-LOX	Thrombozyten, Haut	Funk et al. (1990); Johnson et al. (1998); Virmani et al. (2001)
ALOX12B	12R-LOX	Alox12b	12R-LOX	Haut	Boeglin et al. (1998); Meruvu et al. (2005)
ALOXE3	eLOX3	Aloxe3	eLOX3	Haut	Kinzig et al. (1999); Krieg et al. (2014); Yu et al. (2006)
ALOX5	5-LOX	Alox5	ALOX5	Leukozyten, Makrophagen, dendritische Zellen	Faronato et al. (2007); (Funk et al., 1989); Ghosh (2003); Wasilewicz et al. (2010)
Pseudogen		Alox12e	eLOX12	Haut	Funk et al. (2002)

Dargestellt sind die humanen und murinen Lipoxygenasen mit dem jeweiligen Namen, der hauptsächlich Lokalisation und Literaturangaben (modifiziert nach Kuhn et al. (2014))

*lc – Leukozyten-Typ, **pl – Plättchen-Typ

Aus historischen Gründen richtete sich die Klassifizierung von Loxs nach ihrer Reaktionsspezifität der Arachidonsäureoxidation. Wenn diese ausgewählte Polyenfettsäure durch eine Lox am Kohlenstoffatom 5 (C5) der Fettsäurekette oxygeniert wurde, nannte man das Enzym Arachidonsäure-5-Lox (Alox5), Erfolgte die Oxygenierung am C15, wurde das verantwortliche Enzym als Arachidonsäure-15-Lox klassifiziert. Inzwischen ist diese Nomenklatur irreführend geworden, da sie nicht die evolutionäre Verwandtschaft der Enzyme berücksichtigt. Zum anderen müssen nach der klassischen von der Reaktionsspezifität-abhängigen Lox-Nomenklatur fünf (Alox15, Alox12, Alox12b, Aloxe12, Aloxe3) der sieben murinen Lox-Isoformen als 12-Lox klassifiziert werden. Die murine Alox15b, dessen menschlicher Ortholog eine 15-LOX darstellt, ist nach dieser Nomenklatur eine 8-LOX. Dadurch ist eine Differenzierung der murinen Isoformen mithilfe der klassischen Nomenklatur nur schwer möglich. Die

murine Alox15 und die humane ALOX15 sind in der Lage veresterte Fettsäuren zu oxidieren. Weder die humane ALOX12 noch die murine Alox12 können das. Auch die Verwandtschaftsanalyse zeigte, dass die murine Alox15 der humanen ALOX15 näher steht (Ivanov et al., 2015). Heutzutage ist man dazu übergegangen, die Isoformen der LOXs nach ihrem evolutionären Verwandtschaftsverhältnis und weniger nach ihren enzymatischen Eigenschaften zu klassifizieren (Tabelle 2-3).

2.7.1 Katalytischer Mechanismus der Lipoxygenasen

Lipoxygenasen sind stereo- und positionsspezifische Dioxygenasen mit einem Nicht-Häm-Eisen im aktiven Zentrum (Ivanov et al., 2010). Mehrfach ungesättigte Fettsäuren werden unter Verbrauch von Sauerstoff zu Hydroperoxyfettsäuren H(p)ETEs umgewandelt. Als Substrat fungieren alle mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Polyenfettsäuren oder PUFA), wie zum Beispiel Linolsäure oder Arachidonsäure (Ivanov et al., 2015). Intrazellulär werden die primären Lox-Produkte, die Hydroperoxyfettsäuren, unter anderem durch Glutathionperoxidasen meist schnell zu Hydroxyfettsäuren reduziert. Während der Dioxygenasereaktion entstehen enzymgebundene Radikale. Unter Sauerstoffmangel oder unter extremen pH-Werten können diese vom Enzym abdissoziieren und eine Radikalkettenreaktion verursachen (Noguchi et al., 2002).

Die Lox-Reaktion kann grundsätzlich in vier Elementarreaktionen unterteilt werden (Abbildung 2-6). Die Aktivierung der Lipoxygenasen erfolgt über eine Oxidation des ursprünglich 2-wertigen Nicht-Häm-Eisens in dessen 3-wertige Form. Im ersten Schritt wird Wasserstoff von einer doppelallylständigen Methylengruppe der Fettsäure abgespalten. Es entsteht ein Fettsäureradikal und ein reduziertes Fe[II]. Dieser Schritt ist geschwindigkeitsbestimmend (Wecksler et al., 2009). Während der Radikalumlagerung wandert das Radikal um zwei Kohlenstoffatome Richtung Methylende [+2-Radikalverschiebung] oder Richtung Carboxylende [-2-Radikalverschiebung] (Kuhn et al., 1986). Anschließend wird Sauerstoff eingebaut. Im letzten Schritt wird das Fettsäureperoxy-Radikal zur Hydroperoxyfettsäure reduziert. Das benötigte Elektron stammt aus der Oxidation des enzymgebundenen Fe[II] zu Fe[III]. Die entstandene Hydroperoxyfettsäure wird protoniert und dissoziiert vom aktiven Zentrum ab.

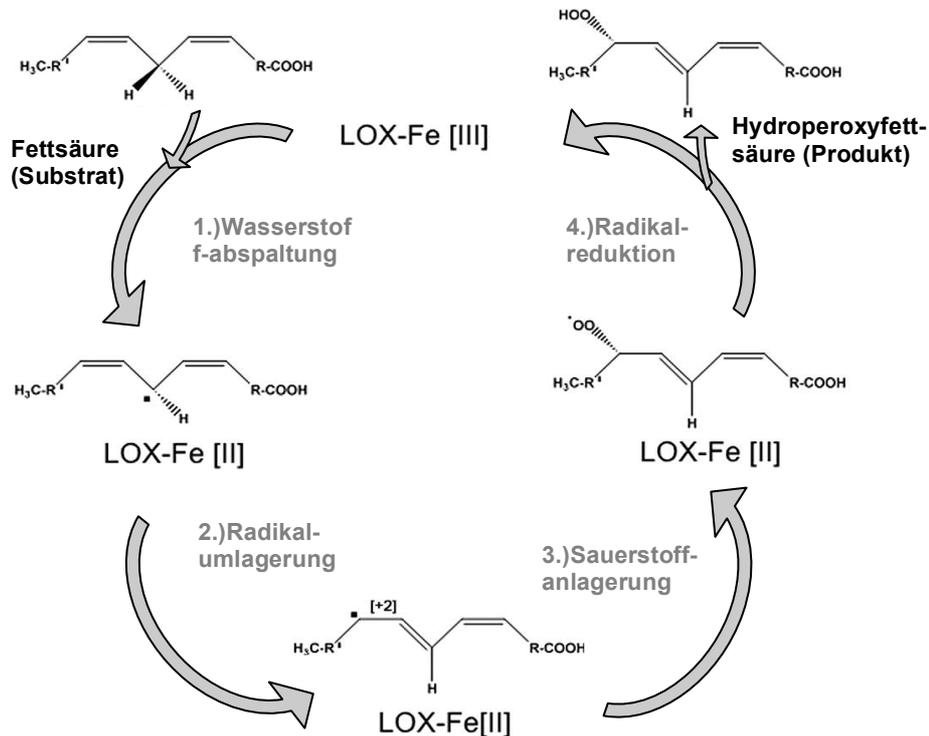


Abbildung 2-6: Reaktionsmechanismus der Lipoxygenasen (modifiziert nach Ivanov et al. (2010))

Die Aktivierung der Lipoxygenasen erfolgt über eine Oxidation zu einem dreiwertigen Eisen (FeIII).

- 1.) Wasserstoffabspaltung: Wasserstoff wird von einer doppelallylständigen Methylengruppe abgespalten (geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Reaktion).
- 2.) Radikalumlagerung: Radikal wandert Richtung Methylende [+2] oder Carboxylende [-2].
- 3.) Sauerstoffanlagerung
- 4.) Radikalreduktion: Fettsäure wird zur Hydroperoxyfett-säure reduziert. Das Elektron stammt vom Eisen (Fe[II]).

2.8 Die Alox15 als Vertreter der Lipoxygenasen

Die Isoformen Alox5 und Alox15 wurden am genauesten untersucht und beschrieben. Die Namen 12/15-Lox und Lox15-1 wird synonym für die Alox15 genutzt. Sowohl die murine Alox15 als auch die humane ALOX15 können freie Polyenfettsäuren, Phospholipide (Schewe et al., 1975), an Cholesterin gebundene Fettsäuren (Belkner et al., 1991) und Lipoproteine oxidieren (Kühn et al., 1993). Für die Reaktionen mit membrangebundenen Lipiden wird Kalzium benötigt, wobei dessen Rolle noch nicht abschließend geklärt ist. Die Neutralisation von negativ geladenen Membranlipiden durch die positiv geladenen Kalzium-Ionen wird diskutiert (Walther et al., 2004).

Die humane ALOX15 kann sowohl das 12., als auch das 15. Kohlenstoffatom der Arachidonsäure oxygenieren, wobei eine starke Präferenz zur 15-Lipoxygenierung besteht. Die spezifischen Produkte entstehen nur innerhalb der ersten Minuten, nachdem die Lipide mit der ALOX15 inkubiert werden. Später entstehen dann auch unspezifische Nebenprodukte (Belkner et al., 1998).

2.8.1 Struktur

Die murine Alox15 besteht als monomeres Protein aus 663 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 75 kDa. Das zugehörige Gen ist auf Chromosom 11 lokalisiert. Die Kristallisation der Kaninchen-Alox15 wurde von Sloane et al. (1990)

bereits vor 25 Jahren publiziert. Sieben Jahre

später folgte die erste 3D-

Struktur (Gillmor et al.,

1997), die für einen Enzym-

Hemmstoff - Komplex

aufgenommen wurde. Nach

weiteren zehn Jahren

wurden die originalen

Röntgenstrukturdaten (Choi

et al., 2008) neu

interpretiert. Dabei ergab

sich, dass der Datensatz die

Koordinaten für zwei

unterschiedliche Strukturen

enthielt. Zum einen konnte aus den Elektronendichteverteilungen auf die Struktur des

nicht-ligandierten Enzyms geschlossen werden. Zum anderen ergab sich die Struktur

des Enzym-Hemmstoff-Komplexes. Beide Strukturen ähnelten sich im Hinblick auf die

Globalstruktur, zeigten aber gravierende Unterschiede am aktiven Zentrum. So kam es

z.B. durch den Hemmstoff zur Dislokation einer Helix, welche das aktive Zentrum

deutlich vergrößerte (Ivanov et al., 2015). Eine ähnliche strukturelle Flexibilität wurde

bisher für keine andere Lox nachgewiesen (Ivanov et al., 2015).

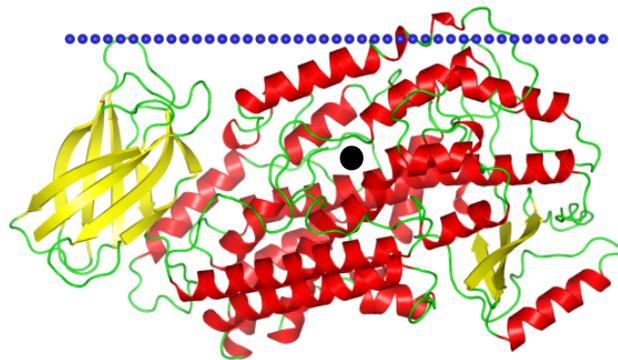


Abbildung 2-7: Dreidimensionale Struktur der Alox15

Abgebildet ist die 3D-Struktur der Kaninchen Alox15. Es ist das N-terminale mit den β -Faltblättern (gelb) und das C-terminale Ende mit den α -Helices (rot). Das Nicht-Häm-Eisen ist schwarz, die Plasmamembran blau dargestellt. (modifiziert nach (Lomize et al., 2005-2013))

Die meisten der bisher strukturell untersuchten Lox haben eine N-terminale Domäne, die vorwiegend aus β -Faltblättern besteht, und ein C-terminale Domäne, die überwiegend aus α -Helices zusammen gesetzt ist (Ivanov et al., 2015; Winkler et al., 1990). Die N-terminale Domäne enthält das katalytische Zentrum mit dem Nicht-Häm-Eisen (Gilbert et al., 2011; Ivanov et al., 2010; Romanov et al., 2006). Gegenüber dem Nicht-Häm-Eisen gibt es eine sauerstoffaffine Region (Saam et al., 2007), welche Bedeutung für den Oxygenierungsprozess und damit für die Spezifität des Enzym haben sollte (Abbildung 2-7).

Seit vielen Jahren wurde davon ausgegangen, dass Lox überwiegend als monomere Enzyme vorliegen. Neuere Untersuchungen deuten aber darauf hin, dass die Enzyme dimerisieren können und dass intrazellulär ein dynamisches Gleichgewicht von Monomer-Dimeren vorliegt (Ivanov et al., 2012; Maiorino et al., 1995; Shang et al., 2011). Die Lage dieses Gleichgewichts ist abhängig von den äußeren Bedingungen (Enzymkonzentration, Salzkonzentration, Anwesenheit von Liganden) und scheint zur Regulation der zellulären Lox-Aktivität beizutragen.

2.8.2 Vorkommen und Aktivierung

In unreifen humanen Erythrozyten, in eosinophilen Granulozyten und im Alveolarepithel ist die ALOX15 auf hohem Niveau exprimiert (Ludwig et al., 1988; Nadel et al., 1991). In geringerem Maße ist sie auch im Endothel zu finden (Takayama et al., 1987). In humanen Monozyten im Blut kann die Expression durch Interleukin 4 induziert werden (D. J. Conrad et al., 1992; Nassar et al., 1994). Allerdings sprechen 10-40 % der Monozyten nicht auf die Stimulation an (Kuhn et al., 2006). Der Grund ist bisher nicht bekannt. Es könnte mit dem Reifegrad der Zellen zusammenhängen (Tsao et al., 2014). Der Hauptbildungsort der murinen Alox15 sind die Peritonealmakrophagen (Kuhn et al., 2006). Die Alox15 ist auch im murinen männlichen Reproduktionstrakt exprimiert (K. A. Fischer et al., 2005).

Obwohl die Alox15 komplexe Substrate wie Membranphospholipide bei einer Freisetzung von freien Polyenfettsäuren aus Membranphospholipiden und Cholesterolester akzeptiert, zeigt sie eine deutliche Präferenz für freie Polyenfettsäuren. Da in den meisten Säugetierzellen die Gleichgewichtskonzentration an freien Fettsäuren sehr gering ist, müssen zur Initiierung der Lox-Reaktion freie

Polyenfettsäuren durch die katalytische Wirkung der Phospholipase A2 bereitgestellt werden.

2.8.3 Funktionen

Die Alox15 ist an der Produktion von Signalstoffen beteiligt (Kuhn, 1996; Powell et al., 2015). Andererseits kann die Alox15 auch über die Modifikation von Membranlipiden an der Umstrukturierung von Zellorganellen teilnehmen. In unreifen roten Blutzellen kommt es durch die Alox15 zu einem Abbau von Mitochondrien im Rahmen der erythroiden Differenzierung. Dies ist ein physiologischer Prozess bei der Reifung von Erythrozyten in der späten Erythropoese (Schewe et al., 1977). Durch die Regulation des Redoxstatus in Zellen nimmt das Enzym aber auch Einfluss auf die Expressionsregulation (Kim et al., 2013). Die Alox15 spielt unter anderem eine Rolle im Gehirn (Piomelli et al., 1987), bei der Spermiogenese und bei der Fortpflanzung (K. A. Fischer et al., 2005; K. Moore et al., 2010). Weiterhin scheint sie in der Pathogenese der Arteriosklerose (Gertow et al., 2011), bei Schlaganfällen (van Leyen, 2013) und bei Entzündungsreaktion bedeutsam zu sein (Higgs et al., 1981).

2.8.3.1 Periventrikuläre Leukomalazie

Durch oxidativen Stress kann es zur Apoptose von Neuronen kommen (Xiao et al., 2011). Auswirkungen des oxidativen Stresses sind bei Parkinson, Alzheimer, Schlaganfällen und bei der periventrikulären Leukomalazie (PVL) festzustellen. Bei Frühgeborenen kommt es durch Sauerstoffmangel zu Schädigungen der weißen Substanz und damit zu kognitiven und motorischen Störungen (Haynes et al., 2013). Sie zeigten, dass diese Schädigungen mit einem erhöhten Expressionsniveau der ALOX15 in den entsprechenden Läsionen bei PVL einhergeht. Diese Beobachtungen wurden von In-vitro-Zellversuchen gestützt, die eine ALOX15-abhängige Apoptose von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen herausgearbeitet haben (van Leyen et al., 2008; Wang et al., 2004).

Im Verlauf der letzten Jahre gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass die Alox15 eine Rolle bei Gehirnschädigungen nach einer Ischämie spielt (van Leyen, 2013). Moskowitz et al. (1984) zeigten, dass es zu einem Anstieg von Alox15-Metaboliten, wie zum Beispiel 12-HETE, bei Rennmäusen nach einer Ischämie im Gehirn kommt. Ein Knockout der *Alox15* schützte Mäuse bei einem experimentellen

Schlaganfall (Khanna et al., 2005; van Leyen et al., 2006) und vor Ödembildung (Jin et al., 2008).

2.8.3.2 Spermio-genese und Fortpflanzung

Die Alox15 wurde in Plasmotropfen der Spermien nachgewiesen (K. A. Fischer et al., 2005; K. Moore et al., 2010). Männliche homozygote *Alox15^{-/-}*-Knockout-Mäuse sind subfertil und es kommt zu einer vermehrten Retention der Plasmotropfen (K. A. Fischer et al., 2005; K. Moore et al., 2010). Auch beim Durchdringen des Spermiums der Zona pellucida der Eizelle wird eine Rolle der Alox15 diskutiert (Lax et al., 1990; Mack et al., 1992). In-vitro-Versuche an isolierten Leydig-Zellen von Ratten zeigen einen Einfluss von Loxs auf die Testosteronproduktion (Mele et al., 1997). Wobei weder der Mechanismus noch die beteiligten Lox-Isoformen bisher bekannt sind (Ivanov et al., 2015). Während der Ovulation ist 15-HETE erhöht und eine Ovulation kann durch einen Alox15-Inhibitor unterbunden werden (Downey et al., 1998).

2.8.3.3 Entzündungsreaktionen

Die Alox15 ist sowohl an pro- als auch an antiinflammatorischen Prozessen beteiligt (Kuhn et al., 2014; Kuhn et al., 2006). Es kommt durch die Reaktionsprodukte, wie 15-HETE, zu Entzündungsreaktionen bei dermalen Applikation (Higgs et al., 1981). Eoxin, das Leukotrien E4-Analogon des Alox15-Wegs, wirkt ebenfalls proinflammatorisch. Es wird vermehrt bei bronchialen Entzündungen im Zusammenhang mit Hodgkin-Lymphomen ausgeschüttet (Claesson, 2009; Sachs-Olsen et al., 2010). Andere Alox15-Metabolite, z.B. die Lipoxine, wirken hingegen antiinflammatorisch (Sachs-Olsen et al., 2010). Dadurch kommt es zu einer Normalisierung der Gefäßpermeabilität und zu einer Apoptoseinduktion von proinflammatorischen neutrophilen Granulozyten (El Kebir et al., 2013; Ereso et al., 2009). Durch die Hemmung der Alox15 bzw. den Knockout des entsprechenden Gens kommt es zur Exazerbation der Entzündungsreaktion in verschiedenen Entzündungsmodellen (Kronke et al., 2009).

2.8.4 Knockout-Modell

1996 stellten Sun & Funk erstmals *Alox15*-defiziente Mäuse vor. Bei einer groben makroskopischen Untersuchung der inneren Organe stellten sie keine Unterschiede zu entsprechenden Wildtypkontrollen fest. Selbst die

Peritonealmakrophagen der *Alox15^{-/-}*-Tiere, die bei Wildtypmäusen große Mengen an Alox15 exprimieren, sind im Vergleich zu den *Alox15^{+/+}*-Wildtypen morphologisch nicht verändert. Im Blut sind keine signifikanten Unterschiede zwischen *Alox15^{-/-}*-, *Alox15^{+/-}*- und *Alox15^{+/+}*-Mäusen aufgefallen. 2010 stellten Moore et al. fest, dass es wahrscheinlich durch eine Retention des Plasmatropfens zu einer Subfertilität der *Alox15^{-/-}*-Männchen kommt.

Wenn *Alox15^{-/-}*-Tiere Stress ausgesetzt werden, kommt es jedoch zu phänotypischen Auffälligkeiten. Produkte der Alox15 regulieren den Tonus der Blutgefäße in unterschiedlichen Hypertonie-Modellen (Chawengsub et al., 2009). *Alox^{-/-}*-Mäuse reagieren im Vergleich zu Wildtypen auf eine salzinduzierte Blutdrucksteigerung mit höheren Drücken (Kriska et al., 2012). Bei einer Kreuzung von *Alox15^{-/-}*-Mäusen mit Arteriosklerose-Modell-Mäusen (Apolipoprotein E-Knockout-Mäuse) gibt es einen Rückgang von circa 50 % der arteriosklerotischen Plaques in der Aorta der Mäuse (Funk et al., 2002; Haeggstrom et al., 2011). Es gibt jedoch auch Hinweise auf eine anti-arteriogene Wirkung der Alox15 in verschiedenen Arteriosklerose-Modellen (Shen et al., 1996; Trebus et al., 2002).

2.9 Redoxstatus der Zelle

Der Redoxstatus einer Zelle ist ein wichtiger regulatorischer Parameter für das Genexpressionsmuster und trägt damit wesentlich zur Bestimmung des zellulären Phänotyps bei (Kim et al., 2013). Der Redoxstatus wird durch pro- (z.B. Loxs) und antioxidative (z.B. Gpxs) Enzyme aufrecht gehalten (Olsen et al., 2013). Die Alox15 sowie die Gpx4 sind wichtige Enzyme zum Erhalt dieses Gleichgewichts (Brigelius-Flohe et al., 2013). Durch eine Überlastung des Redoxsystems kann es zu einem Überwiegen der Oxidantien kommen. Dieser Zustand wird als oxidativer Stress bezeichnet (Sies, 1997). Die Gpx4 kann Produkte der Alox15 reduzieren (Brigelius-Flohe et al., 2013). Zudem können beide Enzyme membrangebundene Lipide als Substrat nutzen. Auf Grund dieser Eigenschaften gelten diese Enzyme als funktionelle Gegenspieler im Redoxsystem der Zelle (Kuhn et al., 2002).

2.10 Ziel der Arbeit

Aus den bisherigen Knockout-Modellen geht hervor, dass die Gpx4 wichtige Funktionen in der Embryogenese (2.6.4) und der Spermatogenese (2.6.3) erfüllt. Obwohl eine Reihe von Versuchen darauf hindeutet, dass die Alox15 als katalytischer Gegenspieler der Gpx4 fungiert, gibt es bisher nur wenige Daten, die diese antagonistische Funktion in Ganztiermodellen nachgewiesen haben. In bisherigen Experimenten wurde der Alox15-Weg vor allem durch den Einsatz von Lox-Hemmstoffen ausgeschaltet, was jedoch in mehrerer Hinsicht problematisch ist. Zum einen existieren bislang keine Lox-Hemmstoffe, deren Isoform-Spezifität überzeugend nachgewiesen wurde. Zum anderen wirken einige Lox-Hemmstoffe als Radikalfänger, so dass es nahezu unmöglich ist zu differenzieren, ob ein biologischer Effekt auf die Hemmung des Enzyms oder auf die Radikalfängerwirkung zurückzuführen ist. Um diese Probleme zu umgehen, haben wir eine loss-of-function-Strategie gewählt, die auf Lox-Hemmstoffe verzichtet und stattdessen auf einer Inaktivierung des *Alox15*-Gens basiert.

Die Gpx4 hat mehrere Funktionen und wirkt in biologischen Systemen sowohl als Enzym als auch als Strukturprotein. In den bisherigen Knockout-Strategien wurde überwiegend die Expression des *Gpx4*-Gens kompromittiert, so dass es nicht möglich war, die Frage zu beantworten, ob z.B. die embryonale Letalität der Keimbahn-Knockouts auf das Fehlen der katalytischen Aktivität oder das Nichtvorhandensein des Strukturproteins zurückzuführen ist. Um diese Frage zu beantworten, haben wir ein murines Knockin-Modell geschaffen, bei dem das native Gen der *Gpx4* durch ein Konstrukt ersetzt wurde, das für ein katalytisch inaktives Enzym (U46A-Mutante) kodiert.

Unter Verwendung dieser beiden Modellsysteme sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen beantwortet werden: i) Führt eine homozygote Expression der katalytisch inaktiven U46A Gpx4 zu einem embryonal letalen Phänotyp? ii) Ändert sich die embryonale Letalität durch einen zusätzlichen homozygoten Knockout des *Alox15*-Gens? iii) Welche Parameter ändern sich bei Spermien durch heterozygote Expression der U46A Gpx4? iv) Können Veränderungen der Spermienparameter durch einen zusätzlichen Knockout des *Alox15*-Gens rückgängig gemacht werden?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1.1 Enzyme und Polymerasen

My Taq Red Mix	Bioline, D - Luckenwalde
BioMix Red	Bioline, D - Luckenwalde
RevertAid Premium Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific, D - Darmstadt
EcoRI; HindIII; BamH1; SwaI; BspWI	Thermo Fisher Scientific, D - Darmstadt
Glutathionreduktase	Thermo Fisher Scientific, D - Dortmund
SensiMix SYBR No-ROX Kit	Bioline, D - Luckenwalde

3.1.1.2 Kits

GeneMATRIX Universal	EURx Ltd.; PL - Gdansk
DNA/RNA/Protein Purification Kit	
RevertAid™ Premium first Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, D - Dortmund
SensiMix™ SYBR PCR Kit	Bioline, D - Luckenwalde
Spermac Färbelösung	Minitüb, D - Tiefenbach

3.1.1.3 Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen	Biozym, D - Hessisch Oldendorf
Safe Seal Micro Tubes	Sarstedt, D - Nümbrecht
steriles Material Bench	Thermo Fisher Scientific, D - Dortmund
Falkon-Tubes	Thermo Fisher Scientific, D - Dortmund
Pipetten	Thermo Fisher Scientific, D - Dortmund

3.1.1.4 Lösungen und Puffer

TAE	40 mM Tris; 20 mM Natriumacetat; 2 mM EDTA, pH 8,5
RT-Puffer für PCR	10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 15 mM KCl; 0,6 mM Magnesiumchlorid pro 100ml
PBS	137 mM Natriumchlorid; 2,7 mM Kaliumchlorid; 12 mM Phosphat, pH 7,4

3.1.1.5 Chemikalien

Agarose	Promega, D - Mannheim
Arachidonsäure	Serva, D - Heidelberg
Belizitrat	Serva, D - Heidelberg
Bromphenolblau	Merck, D - Darmstadt
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma, D - Dreisenhofen
Chloroform	Merck, D - Darmstadt
dNTP-Lösung	Roth, D - Karlsruhe
Dulbecco's gepufferter Lösung	Sigma, D - Dreisenhofen
EPON 812	Serva, D - Heidelberg
EDTA	Sigma, D - Dreisenhofen
Essigsäure	Roth, D - Karlsruhe
Ethanol	Roth, D - Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, D - Karlsruhe
Glycerol	Sigma, D - Dreisenhofen
Glutaraldehyd	AGAR Scientific, GBR - Stansted
Glutathion	Sigma, D - Dreisenhofen
Hämalaunlösung	Roth, D - Karlsruhe
Histokitt	Roth, D - Karlsruhe
HPLC-Standards	Cayman Chem. Vertrieb: Spi Bio, FR - Montigny le Bretonneux
Isopropanol	Roth, D - Karlsruhe
Kaliumchlorid	Sigma, D - Dreisenhofen

Material und Methoden

Kaliumlauge	Roth, D - Karlsruhe
Methanol	VWR International GmbH, D - Darmstadt
n-Hexan	Baker Deventer, NL
NADPH (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat)	Merck, D - Darmstadt
Natriumacetat	Roth, D - Karlsruhe
Natriumborhydrid	Technologies Inc., D - Eggenstein
Natriumchlorid	Roth, D - Karlsruhe
Natronlauge	Sigma, D - Dreisenhofen
Osmiumtetroxid	Serva, D - Heidelberg
Phosphat	Biochrom, D - Berlin
Propanol	Sigma, D - Dreisenhofen
Propidiumjodid	Invitrogen, USA - Carlsbad
Rhodamin 123	Invitrogen, USA - Carlsbad
Tris	Merck, D - Darmstadt
Tween 20	Roth, D - Karlsruhe
Uranylacetat	Serva, D - Heidelberg

3.1.1.6 Verwendete Primer

GPX4-Genotypisierung		up	5' GAC AGA TGG CTC TGG ACC TGG GTG 3'
		down	5' TAA TCT GGC GTG GTA GGG GCA GAC 3'

<i>U46A Gpx4</i> Herstellung	– kurzer Arm des Vektors	up	5'- TGT ACC ACG TAG GTA CAG TGT CTG -3'
		down	5'- TGT GAA AGC ACA GGC TGT GAG -3'
	Punktmutation	up	5'- GTA GCA TAT TCT AGG GGT GTC CAC -3'
		down	5'- GGA ACT TCG CTA GAC TAG TAC GCG TG -3'
	Neokassette	up	5'- GCA TGC TGG GAA AGT GAG TG -3'
		down	5'- GGT AAA GTT CCA TTT GAT GGC ACT GG -3'

	<i>FLP</i> -Gen	FLP1	5'- CAC TGA TAT TGT AAG TAG TTT GC -3'
		FLP2	5'- CTA GTG CGA AGT AGT GAT CAG G -3'
<i>Alox15</i> - Genotypisierung	Gemeinsamer up-Primer		5'- GGC TGC CTG AAG AGG TAC AG -3'
	Knockout down-Primer		5'-GGG AGG ATT GGG AAG ACA AT-3'
	Wildtyp down-Primer		5'- CCA TAG ACG AGA CCA GCA CA -3'

qRT-PCR

<i>GAPDH</i>	up	5'- CCA TCA CCA TCT TCC AGG AGC GA -3'
	down	5'- GGA TGA CCT TGC CCA CAG CCT TG -3'
<i>m+zGpx4</i>	up	5'- CGC CTG GTC TGG CAG GCA CCA -3'
	down	5'- ACG CAG CCG TTC TTA TCA ATG AGA A -3'
<i>m-phGpx4</i>	up	5'- GAG ATG AGC TGG GGC CGT CTG A -3'
	down	5'- ACG CAG CCG TTC TTA TCA ATG AGA A -3'

3.2 Methoden

3.2.1 Haltung der Mäuse

Die Mäuse wurden zu viert oder fünft in Käfigen frei gehalten und bekamen Wasser und Futter ad libitum. Alle Tierexperimente wurden unter der Tierversuchsnummer T 0437/08 durchgeführt und durch die zuständige Landesbehörde Berlin bewilligt. Die *Alox15*-Knockout-Mäuse wurden von dem Jackson Labor (Bar Harbor, USA) bezogen und von Sun et al. (1996) das erste Mal beschrieben.

3.2.2 Konstruktion der *U46A Gpx4*-Knockin-Maus

Durch einen Austausch des Selenocysteins mit Alanin an der 46. Stelle in der Aminosäuresequenz kommt es zu einem katalytisch inaktiven Protein (Scheerer et al., 2007). Diese Punktmutation wurde durch einen Basenaustausch von TGA zu GCA in den Primern mit einer überlappenden PCR-Strategie realisiert. Es wurde eine passende Mausgensequenz aus einem positiv getesteten C57BL/6N BAC-Klon entnommen. Die dafür verwendete genomische DNA-Sequenz der *Gpx4* ist 653 bp lang und beinhaltet Exon 3 und 4 der *Gpx4*. Im dritten Exon ist das Selenocystein enthalten. Es wurden zunächst die einzelnen Sequenzen zwischen PT1 und 2 sowie zwischen PT3 und 4 amplifiziert und diese in einem weiteren PCR-Ansatz mit den Primer PT1 und 4

vervielfältigt. In den Primer PT3 und PT4 wurde die gewünschte Mutation eingefügt (fettgedruckter Teil in der Primersequenz). Das entstandene Amplifikat wurde sequenziert um die Punktmutation und Vollständigkeit zu bestätigen. Die gesamte Sequenz ist 8.53 kbp lang.

Die von der Maus stammende genomische Sequenz der *Gpx4* enthält

PT1: 5'-TCCATGCACGAATTCTCAGCCAAG-3'

PT2: 5'-CAGTTTTGCCT**GCT**TGCGAGGCCACGTTGGTG-3'

PT3: 5'-GTGGCCTCGCAAG**C**AGGCAAACTGACGTAACTAC-3'

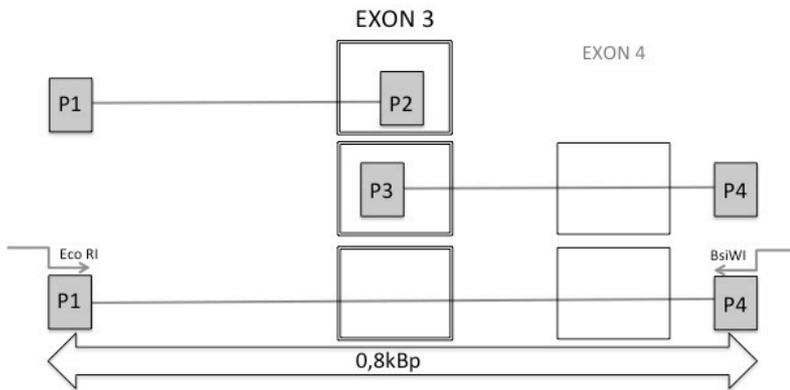
PT4: 5'-GCTAGATCGTACGCTTTGAGGCTCAGCCAGGTG-3'

alle 7 Exons. Eine Neokassette wurde 215 bp nach Exon 4 in das Intron 4/5 mit Hilfe des Restriktionsenzym BisWI eingefügt. Der entstandene Vektor beinhaltet einen 3'- und einen 5'-Arm links beziehungsweise rechts der Neokassette, die von jeweils zwei LoxP/FRT-Stellen gesäumt ist. Der 3'-Arm ist 2.96 kb lang und enthält zusätzlich das erste Exon, der 5'-Arm ist ungefähr 4.93 kb lang. Die durch LoxP/FRT-Sequenzen flankierte Neokassette befindet sich 215 bp nach dem Exon 4 (Abbildung 3-1 B, zweite Reihe).

Das PCR-Konstrukt, die Gensequenz und die Neokassette wurden mit Hilfe des Restriktionsenzym BisWI und EcoRI in den Vektor eingefügt. Dieser ist synthetisch hergestellt und 2.4 kb lang (pSP72, Promega, Madison, USA) und mit einer Ampicillin-Resistenz versehen. Alles in allem ist der Vektor 12.43 kb lang. Zum Einbringen wurde ein Aliquot mit 10 µg des gesamten Vektors mit Swal linearisiert und mit Hilfe der Elektroporation in BA1 (C57BL/6N x 129/svEv) hybride embryonale Stammzellen transfiziert.

Mit Hilfe einer PCR wurden die Klone, nach einer Ampicillin-Selektion analysiert. Die hybriden embryonalen Stammzellen mit dem kurzen Arm des Vektors, der Neokassette und der Punktmutation wurden ausgewählt. Nach einer Bestätigung durch Sequenzierung wurden die embryonalen Stammzellen in C57BL/6N-Blastozysten transferiert. Die entstehenden Chimäre (F1-Generation) wurden mit C57BL/6N-FLP-Mäusen (vom Jaxon Labor #003800) verpaart und zehn Generationen in den C57BL/6N-Hintergrund zurückgekreuzt. Mit Hilfe der FLP-Sequenz wurde die Neokassette herausgeschnitten (Abbildung 3-1 B, vierte Reihe).

A)



B)

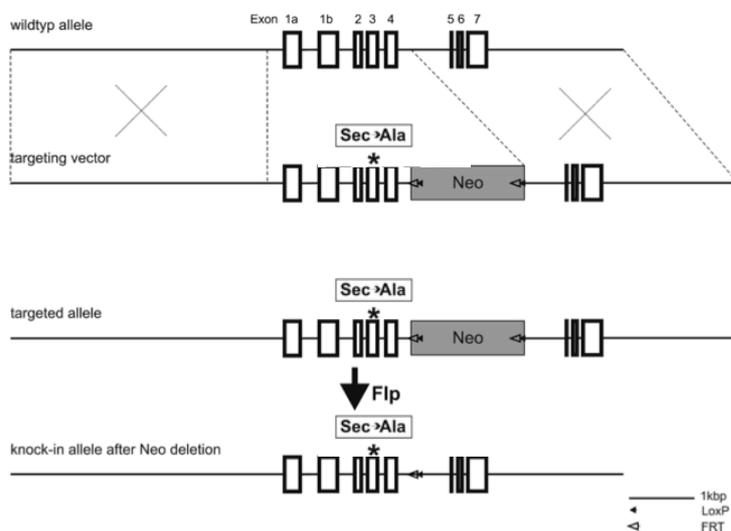


Abbildung 3-1: Herstellung der *U46A Gpx4*-Knockin Maus

A) Überlappende PCR-Strategie: Mit Hilfe einer PCR wurde die Punktmutation in Exon 3 der *Gpx4* eingefügt.

B) Herstellung des *Gpx4*-Knockin-Vektors: Dabei ist in der ersten Zeile das gesamte Gen eines Wildtypen gezeigt. In der zweiten Linie ist der Vektor mit der U46A-Punktmutation (*) sowie der Neokassette und den LoxP/FRT-Sequenzen dargestellt. In der dritten Zeile ist das Allel nach Insertion und in der vierten das Allel nach Herausschneiden der Neokassette abgebildet.

Bei den Nachkommen wurde per PCR überprüft, ob die Punktmutation und der kurze Arm des Vektors enthalten waren und die Neokassette herausgeschnitten wurde. Dies traf auf sechs Mäuse unserer ersten Generation zu. Diese wurden dann mit C57BL/6N-Wildtypen gekreuzt. In der entstandenen zweiten Generation (F2) wurde überprüft, ob die Neokassette und das FLP-Gen nicht mehr enthalten war. Zudem

wurde mit den oben genannten Primer kontrolliert, dass die Punktmutation noch vorhanden ist. Am Ende waren es elf Mäuse, auf die alle Voraussetzungen zutrafen. Diese F2-Tiere wurden verpaart und die daraus entstehende F3-Generation wurde auf Deletion der Neokassette und auf das Vorhandensein der Punktmutation hin untersucht. Eine Wildtypbande ist 837 bp, ein Knockin-Bande 1015 bp lang. Dies kommt durch einen verbleibenden Rest der LoxP-Stelle im Genom zustande. Homozygote Tiere wären über eine singuläre Knockin-Bande zu identifizieren.

3.2.3 Verpaarungsstrategie

Um eine möglichen Rettung der homozygoten *U46A Gpx4^{+/+}+Alox15^{-/-}*-Letalität durch einen *Alox15^{-/-}*-Knockout zu überprüfen, wurden heterozygote *U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{+/+}*-Tiere mit homozygoten *U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{-/-}*-Tieren gekreuzt. Aus der ersten Generation (F1) wurden die Tiere, die für beide Gene heterozygot sind (*U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{+/-}*), ausgewählt und miteinander verpaart. In der darauffolgenden Generation (F2) wurden *U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{-/-}*-Tiere ausgewählt. Für eine Erhaltungszucht wurden *U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{-/-}* genutzt. In F3 wurden *U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{-/-}*-Tier zur Zucht verwendet.

3.2.4 DNA, RNA und Proteinisolation

Die zu analysierenden Proben wurden entsprechend der gelieferten Vorschrift des DNA/RNA/Protein Purification Kits, aufgearbeitet. Zur RNA-Elution wurden 40 µl und zur DNA-Elution wurden jeweils 50 µl des mitgelieferten Elutionmediums verwendet. Die Konzentration der DNA bzw. RNA im Eluat wurde photometrisch bestimmt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die aufgearbeitete DNA und die Proteine bei -20°C, die RNA bei -80°C gelagert. Proteine für die Aktivitätsbestimmung wurden bei -80°C und 10 % Glycerol gelagert.

PCR-Programm zur *Gpx4*-Genotypisierung

5 min	95°C	40x
15 sec	95°C	
15 sec	60°C	
30 sec	72°C	
5min	72°C	

PCR-Mix zur *Gpx4*-Genotypisierung (1 Probe)

10,3 µl	H ₂ O dest.	
0,6 µl	Primer up	(20 µM)
0,6 µl	Primer down	(20 µM)
12,5 µl	MyTaq-BIOLINE	
1 µl	gDNA	
Volumen Gesamt: 24 µl Mix		

3.2.5 Genotypisierung der Tiere

Zur Genotypisierung wurden Ohrstanzen oder Gewebe von Embryonen verwendet. Mit den in Abbildung 3-2 aufgelisteten Primern wurde die PCR zur Genotypisierung des *Gpx4*-Genlokus durchgeführt. Das *U46 Gpx4*-Wildtyp-Allel ist 412 bp, das *U46A Gpx4*-Knockin-Allel ist 587 bp lang. Wie in der Abbildung 3-2 dargestellt, zeigte sich bei einem Wildtyp-Tier (*U46A Gpx4*^{-/-}, Abbildung 3-2: -/-) und bei einem homozygoten Tieren (*U46A Gpx4*^{+/+}, Abbildung 3-2: +/+) nur eine einzelne Bande bei 412 beziehungsweise 587 bp. Bei heterozygoten Tieren (*U46A Gpx4*^{-/+}, Abbildung 3-2: -/+) waren zwei Banden zu sehen. Für die PCR wurde die Polymerase MyTaq Red Mix (Bioline, Deutschland) verwendet und die PCR entsprechend dem Manual durchgeführt.

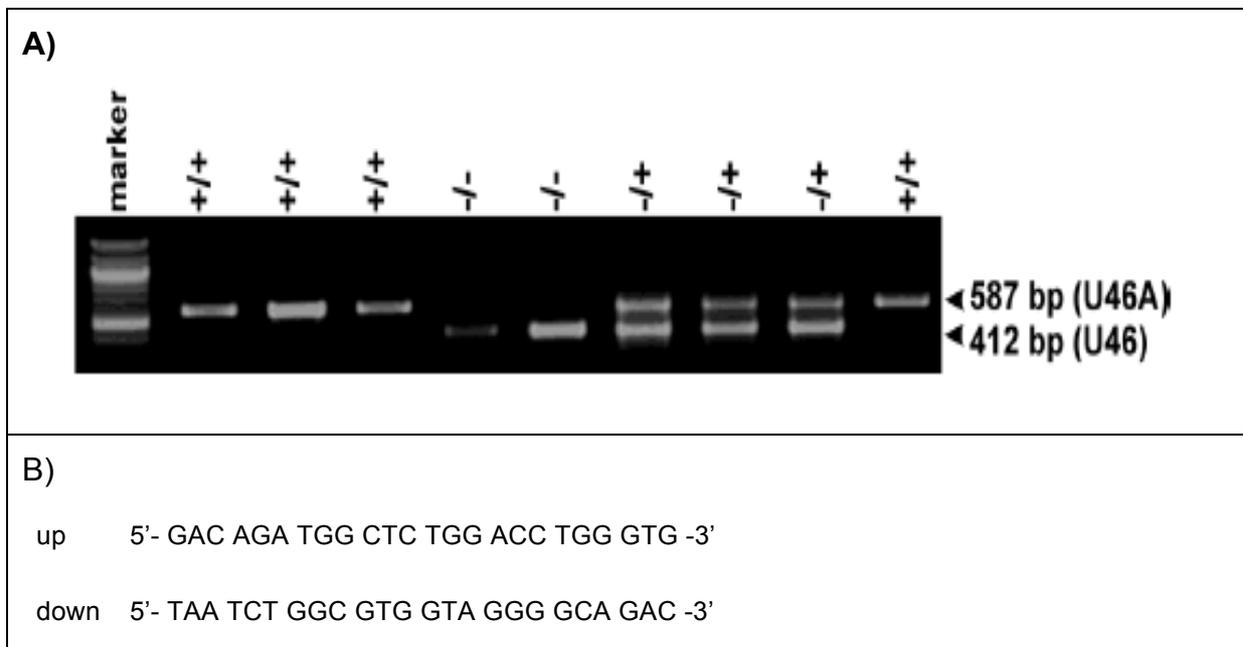


Abbildung 3-2: *Gpx4*-Genotypisierung:

(A): Darstellung der PCR-Banden im Agarosegel mit Hilfe von Ethidiumbromid: Ein Wildtyp-Allel (*U46*) ist 412 bp lang während ein Knockin-Allel (*U46A*) 587 bp lang ist [*Gpx4*-Genotyp: Homozygote *U46A Gpx4*^{+/+}-Tiere (+/+), heterozygote *U46A Gpx4*^{-/+}-Tiere (-/+), *U46A Gpx4*^{-/-}-Wildtypen (-/-)]

(B) Primer zu Genotypisierung des *Gpx4*-Genlokus.

Des Weiteren wurde mit dem Knockout-Modell des Jackson-Lab für die *Alox15* gearbeitet, das erstmals durch Sun und Funk (1996) vorgestellt wurde. Die dort genannten Primer wurden zur Genotypisierung verwendet. Das Wildtyp-Allel (*Alox15*⁺) ist 200 bp lang und die Größe des Knockout-Bande (*Alox15*⁻) beträgt 417 bp. Die PCR wurde mit der BioMix Red (Bioline, Deutschland) und dem entsprechenden Manual folgend durchgeführt. Jeweils 10 µl des PCR-

PCR-Programm zur *Alox15*-Genotypisierung

94°C	3min	12 Zyklen
94°C	20sec	
64°C	30sec	
72°C	35sec	
94°C	20sec	25 Zyklen
58°C	30sec	
72°C	35sec	
72°C	2min	

PCR-Mix zur *Alox15*-Genotypisierung (1 Probe)

2	µl	Primer up
2	µl	Primer Wildtyp down
2	µl	Primer Knockout down
25	µl	BioMix Red
17	µl	Mix (50 µg gDNA + destilliertes Wasser)
Gesamtvolumen: 48 µl Mix		

Produkts wurden auf ein 1,5 %iges Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen. Die PCR-Fragmente wurden bei 80 V im Gel aufgetrennt. Anschließend konnten die Banden auf einem UV-Tisch beurteilt werden. Zudem wurde eine Kontrolle ohne DNA jeweils mitgeführt, um mögliche Verunreinigungen des Mixes auszuschließen.

Primer zur *Alox15*-Genotypisierung

up	5'- GGC TGC CTG AAG AGG TAC AG -3'
Wildtyp-down	5'- CCA TAG ACG AGA CCA GCA CA -3'
Knockout-down	5'- GGG AGG ATT GGG AAG ACA AT -3'

3.2.6 Umschreibung von mRNA zu cDNA oder Reverse Transkription

Die Isolation der gesamten zellulären RNA erfolgte wie in 3.2.4 beschrieben. Während der reversen Transkription wurde die enthaltene RNA in cDNA umgeschrieben. Die Umschreibemenge betrug 300-1000 ng RNA. Die Reverse Transkription erfolgte mit dem RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis Kit und wurde entsprechend der beigelegten Vorschrift durchgeführt.

3.2.7 qRT-PCR

Die quantitative real-time PCR (qRT-PCR) wurde mit Hilfe des RotorGene 3000 (Corbett Research, Mortlake, Australien) und des SensiMix™ SYBR PCR Kit (BIOLINE, Deutschland) durchgeführt. Bei jedem Lauf wurden definierte Standardverdünnungen mitgeführt zur Bestimmung der Konzentration der enthaltenen cDNA der Probe und als interne Pipettierkontrolle. Eine Negativkontrolle stellte sicher, dass keine

Mix für die qRT-PCR

3 µl ddH ₂ O	
0,5 µl Primer-Mix up	2,5 µM
0,5 µl Primer-Mix down	2,5 µM
5 µl SensiMix Plus	
1 µl der zu untersuchenden cDNA	

Verunreinigungen entstanden sind. Nach jedem Zyklus wurden, mit Hilfe des Farbstoffes Sybr-Green, der im SensiMix™ Plus enthalten ist, die Extinktionen bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit Rotor-Gene Monitor Software (Version 4.6). Als Bezugsgen wurde die *GAPDH* genutzt. Zur statistischen Absicherung wurden mindestens drei Läufe pro Probe durchgeführt.

3.2.8 Westernblot

Proteine wurden von den verschiedenen Geweben der Mäuse, wie in 3.2.4 beschrieben, präpariert. Die Proteinbestimmung erfolgte auf Grundlage der Proteinquantifizierung nach Bradford (1976) mit dem Roti®-Quant System (Roth, D-Karlsruhe). Die Eichung wurde durch eine BSA-Verdünnungsreihe vorgenommen. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte nach der Methode von Laemmli (Laemmli et al., 1970). Dabei trennten sich Proteine der Größe nach in einem elektrischen Feld auf. Aliquots, mit jeweils 100 µg Protein, wurden auf einem 12,5% SDS-PAGE-Gel aufgetragen. In einem elektrischen Feld bei 25-30 mA trennten sich die Proteine ihrer Größe nach auf. Das Gel wurde auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham, Buckinghamshire, England) geblottet. Die Blotmembran wurde, zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen, mit Blotting Grade Blocker (Bio-Rad, München, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurde sie mit dem ersten Antikörper (anti-Gpx4: Mab63-1 (Borchert et al., 2010)), oder anti-GAPDH (Sigma, Deutschland) über Nacht inkubiert. GAPDH wurde dabei als Referenzprotein genutzt. Nach der Inkubation wurde die Membran mit PBS/0.3% Tween 20 gewaschen. Danach wurde der zweite Antikörper (anti-Maus: Sigma, Germany oder anti-Kaninchen: Santa Cruz, USA) für 30 min inkubiert. Die Entwicklung erfolgte mit dem ECL Kit (Perkin Elmer, Waltham, USA). Es wurden die Bandenintensität und -größen verglichen. Die Quantifizierung erfolgte immer relativ zum Wildtyp.

3.2.9 Photometrische Bestimmung der Gpx4-Aktivität

Die Gpx4-Aktivität wurde mit einem gekoppelten Test spektrometrisch ermittelt. Das Gewebe wurde in Lysepuffer homogenisiert. Das Homogenisat wurde zur Assay-Lösung gegeben und für 5 min bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 10 000 rpm zentrifugiert. Im Überstand wurde der Proteingehalt bestimmt und die Reaktion durch die Zugabe von Substrat (25 µM Phosphatdidylcholin- Hydroperoxid) gestartet (Borchert

et al., 2003). Durch den Einsatz von Phosphatidylcholin-Hydroperoxid als Substrat konnte die spezifische Aktivität der Gpx4 gemessen werden (Maiorino et al., 1990). Die

Lysepuffer

- 50 mM Tris-HCl,
- 0,3 M KCl
- 1 mM EDTA
- 10% Glycerol
- 5 mM TCEP
- 1% Triton X100

- PIC (Protease Inhibitor Mischung)

Assaylösung für die Gpx4-Aktivitätsmessung

- 1 ml 0.1 M Tris/Cl Puffer, pH 7.4
- 5 mM EDTA
- 0.1 % Triton X-100
- 0.2 mM NADPH
- 3 mM Glutathion
- 1 Einheit Glutathionreduktase

Aktivität wurde über den Verbrauch an NADPH bei 340 nm ermittelt (molarer Extinktionskoeffizient für NADPH: $6.22 \times 10^6 \text{ (M}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$).

3.2.10 Entnahme von Peritonealmakrophagen

Nach zervikaler Dislokation und Desinfektion des Bauchs wurde das Abdomen bis auf Höhe des Peritoneums eröffnet. Anschließend wurde steriles PBS intraperitoneal appliziert. Durch Einmassieren des PBS wurden die Makrophagen mobilisiert und anschließend mit dem PBS entnommen. Beim Injizieren und Aspirieren sollte darauf geachtet werden, dass kein Darm verletzt wurde, da sonst die

Makrophagen in einer unsterilen Umgebung kultiviert werden würden.

3.2.11 Alox15-Aktivitätsassay und Analyse der Reaktionsprodukte

Für den Lox-Assay wurden die entnommenen Peritonealmakrophagen nach initialer Aufnahme und Zentrifugation in 0,5 ml PBS resuspendiert und mit Arachidonsäure (0.1 mM finaler Konzentration) versetzt. Die Zellen wurden im Ultraschallbad lysiert und anschließend 15 min bei Raumtemperatur (21 - 24 °C) inkubiert. Die Hydroperoxyfettsäuren wurden, mit Hilfe von Natriumborhydrid zu den korrespondierenden Alkoholen reduziert. Anschließend wurde 0,5 ml eiskaltes Methanol hinzugefügt. Nach Abzentrifugation der Proteine wurde der klare Überstand in RP-HPLC injiziert und das Verhältnis der HETE/HpETE bestimmt.

3.2.12 Lipidanalytik – Lipidextraktion und HPLC

Um die Lipide von anderen Zellbestandteilen zu trennen, wurde eine Lipidextraktion auf Basis von Bligh et al. (1959) durchgeführt. Die 1 ml Zellsuspension wurde zusammen mit 2,5 ml Methanol und 1,25 ml Chloroform in einem Schliffröhrchen gevortext und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von weiteren

1,25 ml Chloroform und 1,25 ml destilliertem Wasser wurde die Suspension 5 min zentrifugiert (1000 rpm (rounds per minutes), 10 °C). Die organische Chloroform-Unterphase wurde mit einer Glaspipette abgezogen und im Vakuumverdampfer bei 200 bar eingedampft. Die zurückbleibenden Lipide im Schliffröhrchen wurden in 800 µl Methanol resuspendiert. Damit es zu keinen zusätzlichen Oxidationen der Lipide kommt, wurde die Suspension mit Argon überschüttet.

Zur Hydrolyse wurde der Lipid-Methanol-Mischung 150 µl 40%ige Kaliumlauge hinzugegeben und für weitere 30 min 60 °C inkubiert. Zur Neutralisation wurden 120 µl Essigsäure hinzugefügt. Die Proben wurden anschließend mit der HPLC aufgetrennt oder nach erneuter Zugabe von Argon bei -20 °C gelagert. Es ist darauf zu achten, die Proben, die später verglichen werden sollten, möglichst in einem Mal aufzuarbeiten, um eine gleiche Bearbeitung zu gewähren.

3.2.13 HPLC

Die Messungen der Lipidextrakte erfolgten mit der Shimadzu LC-20 HPLC. Die RP-(Reverse Phase)-HPLC wurde mit einer Nucleodur C18 Schwerkraftsäule (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland; 250x4 mm, Partikelgröße: 5 µm) durchgeführt. Die Messung der Hydroxyfettsäuren (HETE) erfolgte bei 235 nm und einer Laufgeschwindigkeit von 1 ml/min. Die langkettigen Fettsäuren wurden bei 210 nm detektiert. Das Laufmittel ist ein Methanol-Wasser-Essigsäuregemisch mit einem Verhältnis von 85/15/0,05 Volumenprozent.

Die Normale-Phase-HPLC wurde in einer Nucleosil 100-5 Säule (Partikelgröße: 5 µm) durchgeführt. Das Laufmittel ist ein nHexan-2Propanol-Essigsäure-Gemisch (100/2:/0,1 Volumenanteil) und die Laufgeschwindigkeit betrug 1 ml/min.

3.2.14 Testis- und Epididymisentnahme

Nach zervikaler Dislokation wurden Testis und Epididymis mit umgebendem Fettgewebe entnommen und bei 4 °C bis zur weiteren Analyse gelagert. Die Analysen wurden am Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW) in Berlin durchgeführt. Die Motilitätsanalyse und die Rhodamine123-Propidiumjodid-Färbung erfolgte innerhalb von 12 h nach Entnahme, um eine möglichst exakte Aussage über die Motilität und

Vitalität zu erhalten. Man entfernte das Fettgewebe von Testis und Epididymis und wog die Organe (elektronische Präzisionswaage bis 1 mg, Ohaus, Schweiz). Die Epididymis wurden im Gesamten und nochmals nach Auftrennung in Caput und Cauda gewogen (Abbildung 3-3).

3.2.15 Spermienzählung

Zur Zählung der testikulären Spermien wurde ein halber Testis unter Aussparung der Rete testis mit Hilfe eines Mörsers durch ein Nylonnetz (Porengröße 28 µm) gepresst und in einer Suspension mit Dulbecco's gepufferter Lösung (Sigma

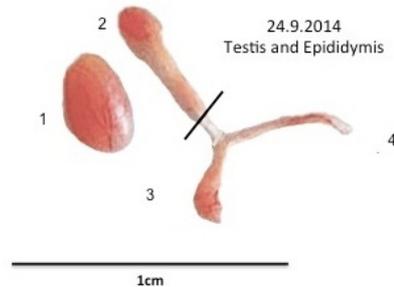


Abbildung 3-3: Präparation von Testis und Epididymis

Sicht auf einen freipräparierten Testis (1) mit dazugehöriger Epididymis (2, 3) und Ductus deferens (4). Die Abgrenzung zwischen Caput (2) und Cauda (3) ist durch Striche gekennzeichnet.

D 8537) suspendiert. Nach dem definierten Verdünnen eines Aliquots der Probe mit Wasser erfolgte das Zählen der Spermien mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Die Suspensionen der epididymalen Spermien wurden nach entsprechender Verdünnung mit Wasser ebenfalls gezählt.

3.2.16 Zellzyklusanalyse

Nach Analyse der prozentualen Anteile der verschiedenen Zellzyklusstadien im Testisgewebe kann die Gonadenaktivität abgeschätzt und eine Aussage über die Effektivität der Meiose beziehungsweise der Spermatogenese gemacht werden. Dazu wurde ein halber Testis bei - 20 °C eingefroren und bis zur Analyse gelagert. Aus dem Testisparenchym wurden die Zellen vereinzelt, permeabilisiert und die DNA in den Zellkernen proportional mittels 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) angefärbt (Blottner et al., 1996). Am Durchflusszytometer (CyFlowSpace, Partec, Deutschland) wurde die Fluoreszenzintensität der Zellkerne (ca. 15 000) und damit deren Zellzyklusstadium ermittelt und mit Hilfe der Software FlowMax Software (Partec, Germany) ausgewertet.

Es gibt tetraploide Zellen (4C) mit einem vierfachen Chromosomensatz. Diese befinden sich in der G2/M-Phase des Zellzykluses. Es sind vor allem Spermatozyten in der ersten Reifeteilung der Meiose, aber auch die Spermatogonien und andere

somatische Zellen während einer mitotischen Teilung. Diploide Zellen (2C) besitzen den doppelten Chromosomensatz. Dieses Signal kommt entweder von Spermatogonien vor der Reifeteilung oder somatischen Testisgewebszellen außerhalb der Zellteilung. Haploide Zellen (1C) sind die Spermatiden oder Spermien mit einem einfachen Chromosomensatz nach der zweiten meiotischen Teilung. Ein hoher Anteil an 1C-Zellen spricht für eine hohe meiotische Aktivität. Das Verhältnis von 2C- zu 4C- und von 1C- zu 2C-Zellen gibt an, ob eine Meiose stattfindet. Somit beschreibt das Verhältnis von 1C- zu 4C-Zellen die Effektivität der Meiose.

3.2.17 Bestimmung des Verhältnisses von Tubuli zu Interstitium

Die mit einer standardmäßigen Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbten Testisschnitte wurden auf das Verhältnis von Tubuli zu Interstitium hin untersucht. Dabei wurden Bereiche ausgewählt, in denen die Tubuli quer angeschnitten sind. In diesen Abschnitten wurde das Verhältnis von tubulären zu interstitiellen Flächen gemessen (Schon et al., 2004). Dadurch konnte beurteilt werden, ob eine Testisvergrößerung durch eine allgemeine Gewebevermehrung oder durch einen Vermehrung des einen oder anderen Anteils zustande kommt.

3.2.18 Spermengewinnung

Im ersten Schritt wurde die Epididymis in Cauda und Caput unterteilt. Je nach Fragestellung wurde rechte und linke Epididymis getrennt oder zusammen untersucht. Cauda beziehungsweise Caput wurden mit Hilfe einer Schere fein zerkleinert. Die Spermien schwammen bei Raumtemperatur (21 - 24 °C) 5 min in 200 µl mit 0,4 % (w/v) BSA M199 versetztem Medium (Schradin et al., 2012) aus. Zur Trennung der Spermien von größeren Gewebestücken wurde die Suspension mit weiteren 600 µl Medium durch einen Zellfilter (Porengröße 30 µm, Partec, Deutschland) gespült und für 5 min in einen Thermoblock bei 37 °C inkubiert.

3.2.19 Motilität der Spermien von Cauda und Caput

5 µl der jeweiligen Spermiesuspension mit einer Konzentration von circa $4 - 8 \cdot 10^6$ Spermienzellen/ml wurden auf eine auf 38 °C vorgewärmte Makler Kammer (Sefi-Medical Instruments, Israel) pipettiert. Die Motilität wurde im einem Mikroskop (negativer Phasenkontrast, 10x, AXIOScopeA1, Zeiss, Deutschland) mit Hilfe eines Computer assistierten Spermienanalyse-Systems (CASA, AndroVision, Minitüb, Germany) analysiert. Es wurden jeweils acht Felder bei einer Bildrate von 100 Bildern/s

und einer Laufzeit von 1 s aufgenommen. Pro Feld wurden circa 30 bis 50 Spermien registriert und ausgewertet. Anhand der Sequenzen konnten verschiedene Motilitätsparameter erfasst werden. Das Programm identifizierte die Köpfe und Mittelstücke der Spermien. Dadurch konnten bewegliche von unbeweglichen Spermien unterschieden werden. Lokal bewegliche Spermien legten

Tabelle 3-1 Kriterien zur morphologischen Bewertung der Spermien

Normales Spermium	keine Defekte
Kopf	einzelner Kopf
	Knick zwischen Kopf und Mittelstück (>90°)
	Knick zwischen Kopf und Mittelstück (>180°)
	deformierter Kopf zwei Köpfe defektes Akrosom
Mittelstück	Verjüngung klein (Länge<Durchmesser)
	Verjüngung groß (Länge>Durchmesser)
	Krümmung
	Krümmung und Verjüngung Krümmung an Verjüngung abgebrochen
Schwanz	Krümmung abgebrochen

weniger als 20 µm/s zurück. Langsam motile Spermien legten weniger als 80 µm/s zurück. Schnell progressive Spermien legten mindestens 80 µm/s zurück. Alle Werte wurden in Prozent angegeben.

3.2.20 Morphologie mittels Spermac®-Färbung

5 µl der Spermiesuspension aus 3.2.18 wurden für die Spermac-Färbung auf einen Objektträger ausgestrichen und getrocknet. Anschließend wurden sie für 5 min in die Fixierlösung gestellt und für mindestens 12 h bei Raumtemperatur getrocknet und mit der Spermac®-Färbung (Minitüb, Deutschland) gefärbt. Nachdem die Objektträger

Spermac®-Färbung	
Färbelösung A	3 min
waschen (Leitungswasser)	
Färbelösung B	45 s
waschen (Leitungswasser)	
Färbelösung C	1 min
waschen (Leitungswasser)	

getrocknet waren, wurden die Spermien mit der HistoKitt-Fixierung von Roth eingebettet. Für ein gutes Ergebnis sollten die Spermien innerhalb von einer Woche beurteilt werden, da sonst die Intensität der Färbung nachlassen kann. Laut Manual stellen sich Akrosomen dunkelgrün, Kerne rot und Mittelstücke grün dar. Die Spermien wurden

bei 1000-facher Vergrößerung und Ölimmersion unter einem Mikroskop (Zeiss, Deutschland) beurteilt. Für die Morphologie wurden 100 Spermien pro Probe ausgezählt. Dabei wurden Deformationen oder andere Defekte an Kopf, Mittelstück und Schwanz beurteilt (Tabelle 3-1).

Zur weiteren Beurteilung der optischen Erscheinung des Mittelstücks wurde dessen Morphologie erfasst und es wurden pro Objektträger in zehn Feldern je zehn Spermien gezählt. Dabei erfolgte die Auszählung einfachblind. Die Auffälligkeiten der Mittelstücke wurden in drei Grade unterteilt. Bei Grad 1 wiesen die Mittelstücke eine glatte Oberfläche auf und hatten eine regelmäßige grüne Färbung. Grad 2 beschrieb Mittelstücke, die eine leicht gewellte Oberfläche und eine unregelmäßige oder nicht grüne Färbung aufwiesen. Spermien mit Grad 3 wiesen eine stark aufgeworfene Membran mit großen Durchmesserschwankungen auf. Die Färbung war nicht einheitlich grün (Abbildung 3-4). Die Aufteilung in Grade wurde durch uns vorgenommen, um die Unterschiede quantitativ darstellen zu können.

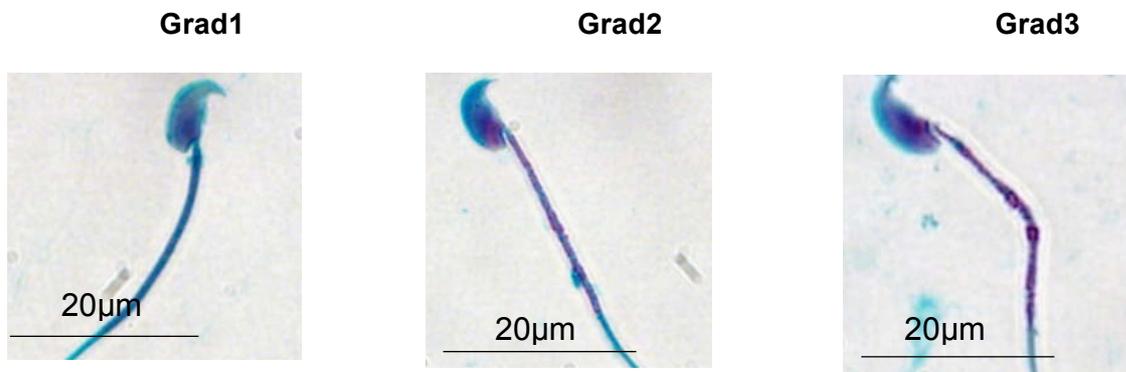


Abbildung 3-4: Morphologische Beurteilung der Spermienmittelstücke

Die Färbung der Spermien wurden mit Hilfe der Spermac®-Färbung durchgeführt. Es sind die Grade der Auffälligkeiten im Mittelstück dargestellt. Die Grade wurden zur quantitativen Erfassung ausgearbeitet.

Grad 1: Die Mittelstücke wiesen eine glatte Oberfläche auf und hatten eine regelmäßige Färbung.

Grad 2: Mittelstücke wiesen leichte Unebenheiten auf und hatten eine unregelmäßig gewellte Zellmembran.

Grad 3: Mittelstücke wiesen starke Unebenheiten und eine aufgeworfene Membran auf.

3.2.21 Morphologie mittels Elektronenmikroskopie und Immunogold

Für die Elektronenmikroskopie wurden die Spermien in 3 % (w/v) Glutaraldehyd fixiert, in PBS (pH 7.2) gewaschen und anschließend in 2 % Osmiumtetroxid fixiert. Für die Dehydratation wurde Ethanol genutzt und schließlich wurde die Proben in EPON 812 eingebettet. Die Spermien wurden mit Uranylacetat und Bleizitrat gefärbt, die Ultradünnschnitte wurden mit einem RMC Ultramikrotom (Boeckeler Instruments, USA) angefertigt. Für die Elektronenmikroskopie wurden ungefärbte Schnitte bei Raumtemperatur mit dem monoklonalen Anti-MenschGpx4-Antikörper (Borchert et al.,

2010) in einer 1:2000 Verdünnung inkubiert. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Schnitte nach einem Waschschrift mit einigen Tropfen PBS mit einem kommerziellen Ziege-Anti-Maus IgG Antikörper behandelt (Verdünnung 1:40, Goldpartikelgröße 12 nm). Dieser wurde für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wurden die Schnitte mehrmals mit PBS und Wasser gewaschen. Die Elektronenmikroskopie wurde mit dem FEI TecnaiSpiritBT Mikroskop (120 kV; FEI Deutschland GmbH) durchgeführt. Die Elektronenmikroskopie sowie die nötigen Vorfärbungen wurden durch das IZW Berlin durchgeführt.

3.2.22 Mitochondrien-Aktivität

Mit Hilfe einer Rhodamin123-Propidiumjodid-Färbung ist es möglich, die Vitalität der Spermien darzustellen. Rhodamine123 akkumuliert in der Membran vitaler Mitochondrien. Propidiumjodid penetriert nicht vitale Zellen und akkumuliert an der DNA. Es wurden $1-2 \cdot 10^6$ Zellen in 250 μ l M199 mit 1 μ l Rhodamin 123 (50 μ g/ml) und 2,5 μ l Propidiumjodid (1 mg/ml) für 20 min bei 38 °Celsius im Dunkeln inkubiert. Die Spermien wurden mit dem Durchflusszytometer (CyFlowSpace, Partec, Germany) ausgestattet mit einem 50 mW Laser (488 nm) und geeigneten Filtern (515-560 nm Bandpass für Rhodamin 123 (grün) und 620 nm Langpass für Propidiumjodid (rot)) vermessen und die Signale mit Hilfe der Software FlowMax Software, (Partec, Germany) ausgewertet (Schradin et al., 2012).

3.2.23 Statistik und Auswertung

Die adressierten Fragestellungen sind sehr allgemein gefasst. Um Auswirkungen und Unterschiede in den erhobenen Daten zu finden, wurde eine explorative Datenanalyse angestrebt. Das Ziel einer solchen Analyse ist, Daten zu erfassen und Unterschiede herauszufinden, um daraus weitere Erkenntnisse und Ansatzmöglichkeiten zu finden (Behrens, 1997).

Die Normalverteilung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest überprüft. Danach wurde der zutreffende Test ausgewählt und mit Hilfe von SPSS 23 (IBM Armonk New York, USA) durchgeführt. Bei den erhobenen Daten handelte es sich nur teilweise um Normalverteilungen, deswegen wurden zur Auswertung nicht parametrische Tests verwendet. Wenn nicht anders erwähnt, wurde bei zwei zu vergleichenden Stichproben der Mann-Whitney-U-Test genutzt, um Unterschiede von zentralen Tendenzen zu testen. Bei einem Vergleich von mehreren Gruppen wurde der

Kruskal-Wallis-Test genutzt, um auf einen Unterschied zwischen den Gruppen zu testen. Bei einer Signifikanz wurden anschließend Einzelvergleiche mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Das Signifikanzniveau betrug $p \leq 0,05$. Bei einem Gruppenvergleich wurde das Signifikanzniveau der Einzelteste entsprechend der alpha-Fehler-Inflation mit der Bonferroni-Korrektur, $p(\text{Einzeltest}) \leq 0,05/\text{Anzahl der Einzelvergleiche}$, korrigiert. Die statistische Auswertung der Arbeit ist nach Konsultation mit dem Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité durchgeführt worden. Im Boxplot geben die dicken Balken den Median an. Die gesamte Box entspricht allen Werten zwischen der 25. und 75. Perzentile. Die Balken am Ende der Linien entsprechen den höchsten beziehungsweise niedrigsten Werte. Ausreißer werden als Punkte außerhalb dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Allgemeine Charakterisierung der *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Maus

Katalytisch aktive Selenoproteine wie die Gpx4 enthalten am aktiven Zentrum ein Selenocystein, dessen Selen im Reaktionszyklus des Enzyms einem Wertigkeitswechsel unterliegt (Schuckelt et al., 1991). Wird die redox-aktive Aminosäure Selenocystein gegen eine redox-innerte Aminosäure ausgetauscht, sollte es zu einer drastischen Beeinträchtigung der katalytischen Aktivität kommen. So haben Scheerer et al. (2007) gezeigt, dass ein Austausch des Selenocysteins zu einem Alanin im aktiven Zentrum der Gpx4 zu einer kompletten Inaktivierung des Enzyms führt. Deshalb wurde für die Herstellung einer Mauslinie mit einer katalytisch inaktiven Gpx4 das Codon für das Selenocystein im Gen der *Gpx4* gegen ein Alanin-kodierendes Triplet ausgetauscht (siehe 3.2.2). Zunächst wurden die heterozygoten Nachkommen (*U46A Gpx4^{-/+}*) genauer charakterisiert. Diese Mäuse sind lebensfähig, fruchtbar und ausgewachsene Mäuse wiesen keine phänotypischen Veränderungen auf, solange die Tiere nicht anderweitig gestresst wurden.

Zunächst wurde die Höhe der *Gpx4*-mRNA-Expression in verschiedenen Geweben quantifiziert. Dazu wurde zunächst die Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben von *U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*-(Wildtyp-Mäuse) und *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Tieren (heterozygote Knockin-Mäuse) präpariert und mit Hilfe von Isoform-spezifischen Primern die Gleichgewichtskonzentrationen der verschiedenen *Gpx4*-mRNA-Isoformen (zytosolisch, mitochondrial, nukleär) mittels quantitativer RT-PCR (qRT-PCR) quantifiziert. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Expressionsniveau der *Gpx4*-Isoformen zwischen Wildtyp-(*U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*) und Knockin-(*U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*)-Mäuse (Abbildung 4-1).

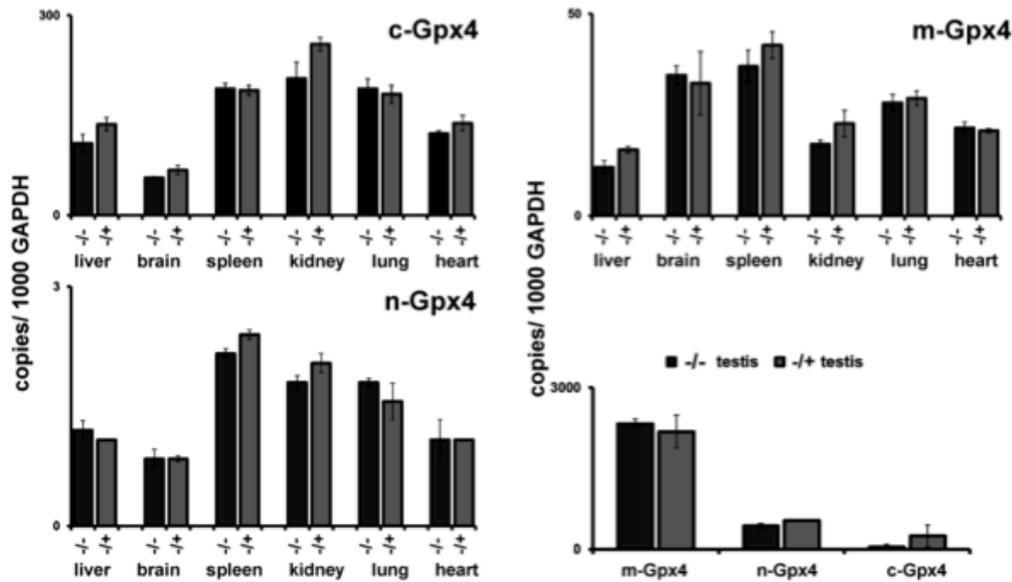


Abbildung 4-1: Expression der *Gpx4* mRNA-Isoformen in heterozygoten *U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{+/+}*- und Wildtyp- (*U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{+/+}*)-Mäusen

Die RNA-Präparation wurde wie in „Material und Methoden“ beschrieben durchgeführt. Nach Extraktion der RNA aus verschiedenen Geweben und Umschreiben mit Hilfe der qRT-PCR wurde das Expressionsniveau der unterschiedlichen Isoformen (zytosolische, mitochondriale und nukleäre Gpx4) in *U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{+/+}*- und *U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{+/+}*-Tieren bestimmt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Students-T-Tests durchgeführt (* $p < 0.05$). Es waren vergleichbare Level der zytosolischen, mitochondrialen und nukleären *Gpx4* in unterschiedlichen Geweben zu finden ($p > 0,05$). Es wurden jeweils zwei Tiere in einem Dreifachlauf ausgewertet.

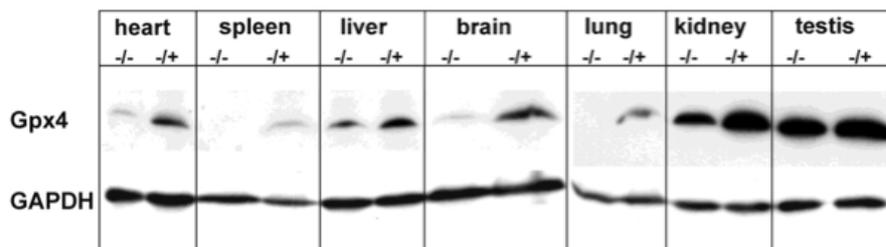


Abbildung 4-2: Expression des Gpx4-Proteins in heterozygoten *U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{+/+}*- und Wildtyp- (*U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{+/+}*)-Mäusen

Der Western-Blot wurde wie in „Material und Methoden“ beschrieben durchgeführt. Nach Homogenisierung der Gewebe wurde ein Western-Blot mit 60-100 μg Protein und mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers durchgeführt. Die GAPDH diente als Referenz-Protein. In allen untersuchten Geweben war eine erhöhte Konzentration des Gpx4-Proteins in heterozygoten *U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{+/+}*-Mäusen zu finden.

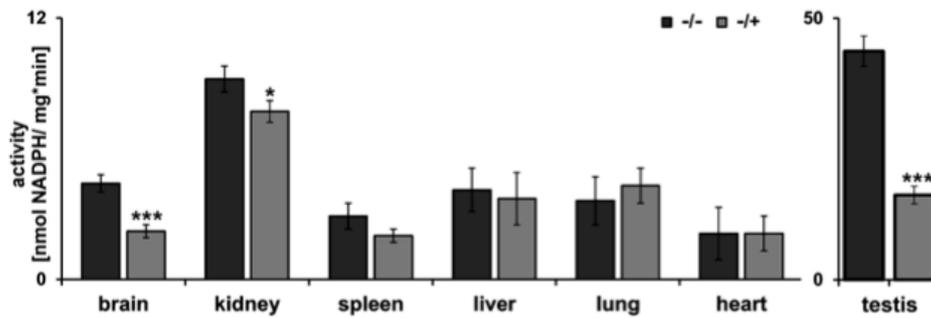


Abbildung 4-3: Gpx4-Aktivitätsassay in heterozygoten *U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{+/+}*- und Wildtyp- (*U46A Gpx4^{-/-} + Alox15^{+/+}*)-Mäusen

Die Gpx4-Aktivität wurde wie in „Material und Methoden“ beschrieben durchgeführt. Die verschiedenen Gewebe wurden homogenisiert und die Gpx4-Aktivität mit Phospholipidhydroperoxid als Substrat gemessen. Die Aktivität wurde auf die eingesetzte Menge an Protein angeglichen. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Students-T-Tests durchgeführt (n=3, *p<0,05, ***p<0,001). In Testis, Gehirn und Nieren kam es zu einer verminderten Aktivität der Gpx4 (p<0,05). In Milz, Leber und Herz gibt es keinen Unterschied (p>0,05).

Mit Hilfe eines spezifischen Anti-Gpx4-Antikörpers wurde die Menge des Gpx4-Proteins in den verschiedenen Geweben quantifiziert. Dabei wurde festgestellt (Abbildung 4-2), dass es in allen untersuchten Geweben zu einer erhöhten Expression des Gpx4-Proteins bei den heterozygoten *U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{+/+}*-Mäusen im Vergleich zu *U46A Gpx4^{-/-} + Alox15^{+/+}*-Tieren kam. Der verwendete Antikörper konnte nicht zwischen dem Wildtyp- und dem Knockin-Protein unterscheiden. Um zu überprüfen, ob es durch eine vermehrte Proteinkonzentration zu einem Unterschied in der Enzymaktivität kommt, wurde, mit Phospholipidhydroperoxid als Substrat, die Gpx4-Aktivität gemessen. Im Testis, im Gehirn und in den Nieren kam es zu einer signifikant (p<0,05) verminderten Gpx4-Aktivität bei den *U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{+/+}*-Mäusen im Vergleich zu *U46A Gpx4^{-/-} + Alox15^{+/+}*-Tieren. In Milz, Leber und Herz gab es keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 4-3).

Zusammenfassung: Trotz gleicher mRNA-Menge kommt es zu einer vermehrten Proteinkonzentration. In einigen Geweben, wie Milz, Leber und Herz, kommt es zu einer vergleichbaren Aktivität der Gpx4. In anderen Geweben gibt es trotz erhöhter Gpx4-Proteinkonzentration eine verminderte Aktivität (Testis, Gehirn und Nieren).

4.1.1 Reduktionskapazität der *U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{+/+}*-Peritonealmakrophagen

Die Gpx4 kann die primären Produkte des Alox15-Stoffwechsels, die Hydroperoxylipide, zu den entsprechenden Hydroxylipiden reduzieren. Um zu testen, ob die Reduktionskapazität für Hydroperoxylipide von heterozygoten Knockin-Peritonealmakrophagen (*U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{+/+}*-Mäuse) im Vergleich zu Wildtyp-Makrophagen verändert ist, wurden ruhende Peritonealmakrophagen von beiden Mauslinien präpariert und hinsichtlich ihrer Reduktionskapazität untersucht. Dabei konnte zunächst festgestellt werden, dass sich keine signifikanten ($p > 0.05$) Unterschiede in der Expression der *Alox15*-mRNA im Vergleich beider Mauslinien nachweisen ließen. Von beiden Mauslinien wurden die Zellen mit exogener Arachidonsäure (5Z,8Z,11Z,14Z-Eicosatetraensäure) inkubiert, wurde dieses Substrat durch die Alox15 zu 12S-Hydroperoxy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraensäure (12S-HpETE) und 15S-Hydroperoxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraensäure (15S-HpETE) umgewandelt. Die katalytisch inaktive Form der Gpx4 (*U46A*) ist nicht in der Lage, die 12S- und 15S-HpETE zu 12S- und 15S-HETE zu reduzieren und daher wird bei den heterozygoten Knockin-Mäusen ein erhöhtes Verhältnis von 12S- + 15S-HpETE / 12S- + 15S-HETE in Peritonealmakrophagen erwartet. Nach der Inkubation der präparierten Zellen mit Arachidonsäure wurde das Verhältnis 12/15HpETE / 12/15HETE) mit Hilfe der SP-HPLC ermittelt (Abbildung 4-4). Sowohl die *U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{+/+}*-Peritonealmakrophagen als auch die heterozygoten *U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{+/+}*-Makrophagen oxygenierten exogen zugesetzte Arachidonsäure zu 12- und 15-HpETE mit einem Verhältnis von 10:1. Für heterozygote Knockin-Mäuse (*U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{+/+}*-Makrophagen) konnte ein Quotient von 12S/15S-HETE vs. 12S/15S-HpETE von 0.29 ± 0.03 ($n=5$) ermittelt werden. Diese Daten belegen, dass nur ca. ein Drittel der gebildeten Hydroperoxylipide zu den entsprechenden Hydroxyverbindungen reduziert wurden. Der entsprechende Quotient bei Wildtyp-Mäusen (*U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{+/+}*-Makrophagen) lag bei 0.52 ± 0.02 ($n=5$). Im Students-T-Test ergab sich ein statistisch signifikanter ($p < 0.001$) Unterschied. Diese Daten belegen, dass Peritonealmakrophagen von heterozygoten Knockin-Mäuse (*U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{+/+}*-Makrophagen) eine signifikant geringere Kapazität zur Reduktion von Hydroperoxylipiden aufweisen als entsprechende Zellen von Wildtyp-Tieren (*U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{+/+}*).

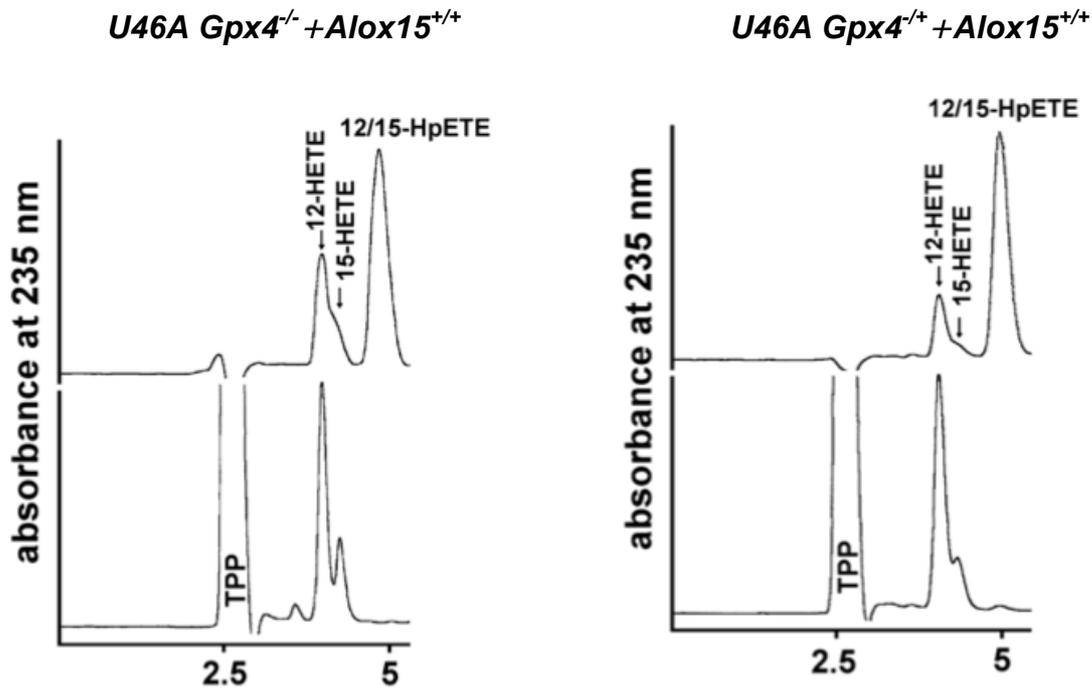


Abbildung 4-4: Oxidierungsprodukte der Peritonealmakrophagen von *U46A Gpx4^{-/-} + Alox15^{+/+}*- und *U46A Gpx4^{+/+} + Alox15^{+/+}*-Mäusen nach Inkubation mit Arachidonsäure

Die Peritonealmakrophagen wurden von *U46A Gpx4^{-/-} + Alox15^{+/+}*- und *U46A Gpx4^{+/+} + Alox15^{+/+}*-Tieren wie in 3.2.10 beschrieben entnommen. Die Mäuse haben einen *Alox15^{+/+}*-Hintergrund. Nachdem die Peritonealmakrophagen gewaschen und in PBS aufgenommen wurden, wurde ein Alox15-Aktivitätsassay mit Arachidonsäure durchgeführt. Die Produkte wurden mit der HPLC analysiert. Das Verhältnis von HETE/HpETE war in *U46A Gpx4^{+/+} + Alox15^{+/+}*-Mäusen (0.29 ± 0.03) im Vergleich zu Wildtypen (*U46A Gpx4^{-/-} + Alox15^{+/+}*, 0.52 ± 0.02) signifikant geringer ($p < 0.001$). Zur Auswertung wurde der Students-T-Test genutzt ($n=5$).

Zusammenfassung: Das Verhältnis von HETE/HpETE als möglicher Indikator für die Gpx4-Aktivität ist in den Peritonealmakrophagen bei *U46A Gpx4^{-/-} + Alox15^{+/+}*-Mäusen geringer als in *U46A Gpx4^{+/+} + Alox15^{+/+}*-Tieren. Dies bestätigt unsere Vermutung der geringeren Reduktionskapazität der *U46A Gpx4^{-/-} + Alox15^{+/+}*-Knockin-Mäuse.

4.2 Embryonale Letalität der homozygoten *Gpx4^{+/+} + Alox15^{+/+}*-Knockin-Maus

Die Gpx4 fungiert als Enzym im Peroxidstoffwechsel komplexer Lipide spielt aber gleichzeitig eine Rolle als Strukturprotein (Brigelius-Flohe, 1999). Inaktivierung des *Gpx4*-Gens führt zur embryonalen Letalität der homozygoten Knockout-Mäuse (Imai et al., 2003). Bislang war jedoch unklar, ob die embryonale Letalität der Knockout-Mäuse auf den Mangel an katalytischer Gpx4-Aktivität oder auf den Mangel des Strukturproteins zurückzuführen ist. Um diese Frage zu beantworten, haben wir

versucht, durch Paarung heterozygoter *U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{+/+}*-Männchen mit Weibchen des gleichen Genotyps homozygote *U46A Gpx4^{+/+} + Alox15^{+/+}*-Nachkommen zu erzeugen. Aus zehn Würfen gingen 35 Nachkommen hervor, die nach ungefähr drei Wochen genotypisiert wurden. Laut den Mendelschen Regeln sollte es zu einer relativen Verteilung der verschiedenen Genotypen von 1(wt) : 2(he) : 1(ho) kommen. Von den 35 Nachkommen wurden 16 Mäuse als *U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{+/+}*-Wildtypen und 19 Mäuse als heterozygote *U46A^{-/+} + Alox15^{+/+}*-Tiere identifiziert. Es wurden keine homozygote *U46A^{+/+} + Alox15^{+/+}*-Nachkommen genotypisiert (Tabelle 4-1). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass homozygote *U46A Gpx4^{+/+} + Alox15^{+/+}*-Embryonen nicht lebensfähig sind.

Tabelle 4-1: Nachkommen der *U46A^{-/+} + Alox15^{+/+}* x *U46A^{-/+} + Alox15^{+/+}*-Verpaarung

<i>Gpx4</i> -Genotyp der Nachkommen	Tatsächliche Anzahl	Erwartete Anzahl (Mendel)
-/-	16	12
-/+	19	23
+/+	0	12
Gesamte Anzahl Nachkommen	35	47

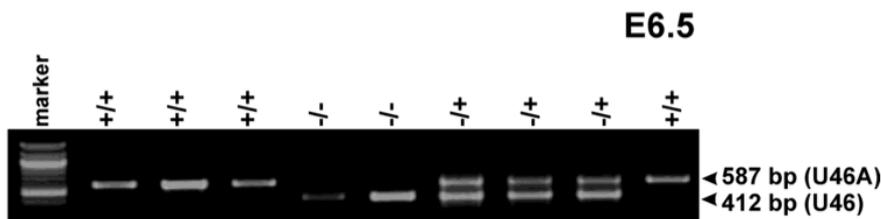
Zusammenfassung: Eine homozygote Inaktivierung der *Gpx4* führt zu einer embryonalen Letalität der Mäuse.

4.2.1 Zeitpunkt der embryonalen Letalität der *U46A Gpx4^{+/+} + Alox15^{+/+}*-Maus

Systemische Inaktivierung des *Gpx4*-Gens führt zur Resorption homozygoter Knockout-Embryonen zwischen dem 6. und 7. Schwangerschaftstag (E 6.5-E 7.5) (Imai et al., 2003; Yant et al., 2003). Um zu überprüfen, zu welchem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung der homozygote *Gpx4 U46A^{+/+} + Alox15^{+/+}*-Knockin letal ist, wurden Embryonen an den Embryonaltagen E 6.5 und E 7.5 präpariert und genotypisiert. Bei E 6.5 fanden sich homozygote Embryonen, in einem für den Zeitpunkt normalen Entwicklungsstand (Abbildung 4-5 A). Bei E 7.5 konnten Embryonen in Stadium der Resorption identifiziert werden, die sich bei der anschließenden

genetischen Analyse als homozygote *U46A Gpx4^{+/+} +Alox15^{+/+}*-Embryonen herausstellten (siehe Abbildung 4-5 B). Obwohl bei den sich unter Resorption befindenden Embryonen nicht mehr eindeutig zwischen Dottersack und Embryonalanlage unterschieden werden konnte, war es möglich, den embryonale Anteil vom umliegenden mütterlichen Gewebe eindeutig abgrenzen.

A) Ausschnitt der Genotypisierung von Embryonen an Tag E6.5



B) Ausschnitt der Genotypisierung von Embryonen an Tag E7.5

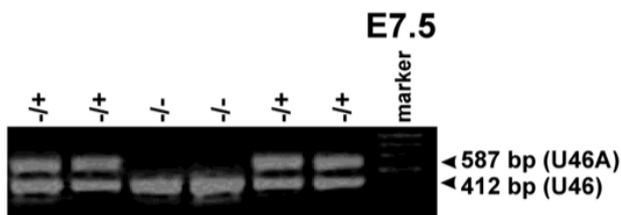


Abbildung 4-5: PCR-Ergebnis der Genotypisierung von Embryonen an den Embryonaltagen E6.5 und E7.5

Es wurden *U46A Gpx4^{-/+} +Alox15^{+/+}*-Tiere gekreuzt und die Embryonen an der Embryonalentwicklung E 6.5 und E 7.5 genotypisiert (Methode siehe 3.2.5). Die Bande bei 587 bp zeigt das Knockin-Allel (*U46A*), die Bande bei 412 bp das Wildtyp-Allel (*U46*). Bei heterozygoten (-/+) Tieren sind beide Banden, bei Wildtypen (-/-) und homozygoten Tieren (+/+) nur eine der Banden vorhanden.

(A) Embryonen an Embryonaltag E 6.5

(B) Embryonen an Embryonaltag E 7.5

Zusammenfassung: Es werden zum Zeitpunkt E 6.5 homozygote normal entwickelte *U46A Gpx4^{+/+} +Alox15^{+/+}*-Embryonen gefunden. Auch zum Zeitpunkt E 7.5 sind homozygote *U46A Gpx4^{+/+} +Alox15^{+/+}*-Embryonen vorhanden. Diese befanden sich aber ausnahmslos im Stadium der fortgeschrittenen Resorption. Damit ist ein homozygoter Knockin einer katalytisch inaktiven Gpx4 zwischen E 6.5 und E 7.5 embryonal letal.

4.3 Einfluss einer *Alox15*^{-/-}-Defizienz auf Lebensfähigkeit von *U46A Gpx4*^{+/-}-Embryonen

4.3.1 Embryonale Letalität bei *U46A Gpx4*^{+/-}+*Alox15*^{-/-}-Tieren

Gpx4 und *Alox15* sind antagonisierende Enzyme im Peroxidstoffwechsel von Lipiden (Brigelius-Flohe et al., 2013). Bei In-vitro-Versuchen konnte die Apoptose von homozygoten *Gpx4*-Knockout-Zellen durch einen Lox-Inhibitor verhindert werden (Seiler et al., 2008). Auf Grund dieses Ergebnisses stellten Seiler et al. die These auf, dass die *Alox15* eine entscheidende Rolle bei der Apoptose von *Gpx4*-Knockout-Zellen spielt. Überträgt man diese Datenlage auf In-vivo-Verhältnisse, könnte das bedeuten, dass homozygot letale *Gpx4*-Knockout-Embryonen durch ein zusätzliches Ausschalten der *Alox15* lebensfähig werden könnten. Um diese These zu überprüfen, haben wir *U46A Gpx4*^{+/-}+*Alox15*^{+/-}- mit *U46A Gpx4*^{-/+}+*Alox15*^{-/-}-Mäusen gekreuzt. Mäuse der ersten Generation (F1), mit dem Genotyp *U46A Gpx4*^{+/-}+*Alox15*^{+/-}, wurden miteinander verpaart und hinsichtlich des Genotyps in beiden Genloci typisiert. Aus der entstandenen zweiten Generation (F2) wurden männliche und weibliche Mäuse mit dem Genotyp *U46A Gpx4*^{+/-}+*Alox15*^{-/-} ausgewählt und für die dritte Generation (F3) miteinander gekreuzt. Unabhängig vom *Alox15*-Genotyp der Mäuse sollten in F2 und F3 laut Mendelschen Regeln 25 % homozygote *U46A Gpx4*^{+/-}-Mäuse entstehen.

Weder in der zweiten noch in der dritten Generation wurden Tiere mit einem homozygoten *U46A Gpx4*^{+/-}-Genlocus identifiziert. Die unter unseren Kreuzungsbedingungen zu erwartete Anzahl an homozygoten *U46A Gpx4*^{+/-}-Tiere betrug für die F2 Generation 31 (Tabelle 4-2 A). In der F3 Generation sollten es 28 homozygote Tiere (*U46A Gpx4*^{+/-}) sein (Tabelle 4-2 B). Tatsächlich wurden aber keine Nachkommen mit homozygoten Knockin des *U46A Gpx4*-Allels (*U46A*) nachgewiesen. Diese Daten weisen stark darauf hin, dass ein homozygoter Knockin des *U46A*-Allels auch bei simultaner Ausschaltung der *Alox15*-Expression nicht lebensfähig ist.

Ergebnisse

Tabelle 4-2: Anzahl der Nachkommen bei Verpaarungen

A) F2-Generation: *U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{-/-}*-Kreuzung

Genotyp Nachkommen F2-Generation		Tatsächliche Anzahl	Erwartete Anzahl
<i>U46A-Gpx4</i>	<i>Alox15</i>		
-/-	+/+	9	7
-/-	+/-	10	14
-/-	-/-	10	7
+/-	+/+	14	14
+/-	+/-	30	28
+/-	-/-	12	14
+/+	+/+	0	7
+/+	+/-	0	14
+/+	-/-	0	7
Gesamte Anzahl Nachkommen		85	112

B) F3-Generation: *U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{-/-}*-Kreuzung

Genotyp Nachkommen F3-Generation		Tatsächliche Anzahl	Erwartete Anzahl
<i>U46A-Gpx4</i>	<i>Alox15</i>		
-/-	-/-	34	31
+/-	-/-	58	60
+/+	-/-	0	31
Gesamte Anzahl Nachkommen		92	122

Um direkt zu zeigen, dass es auch bei den *U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{-/-}*-Kreuzungen zu einer embryonalen Letalität kommt, wurden Embryonen zum Zeitpunkt E 8.5 präpariert. Dabei fanden sich neben normal entwickelten Embryonen auch Individuen in unterschiedlichen Resorptionsstadien. Nach der Genotypisierung stellten sich die

Embryonen, die sich im Stadium der Resorption befanden, ausnahmslos als homozygote *U46A Gpx4^{+/+}+Alox15^{-/-}*-Tiere heraus (Abbildung 4-6 Reihe 3 +/+).

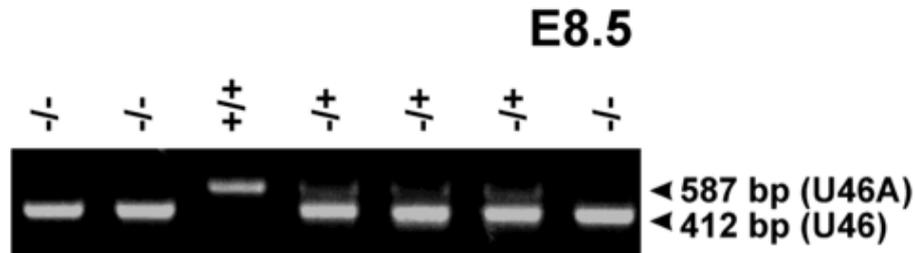


Abbildung 4-6: Genotypisierung des *U46A Gpx4*-Genotyps von ausgewählten *U46A Gpx4^{+/+}+Alox15^{-/-}*-Embryonen an Embryonaltag E8.5

Zwei *U46A Gpx4^{+/+}+Alox15^{-/-}*-Mäuse wurden verpaart und Embryonen an E 8.5 präpariert und genotypisiert (Methode siehe 3.2.5). Das Wildtyp-Allel (*U46*) hat 412 bp, während das Knockin-Allel (*U46A*) 587 bp hat. Es zeigen sich neben *U46A Gpx4^{-/-}*-Wildtypen (Reihe 1,2,7 von links, -/-) auch heterozygote *U46A^{+/-}*-Tiere (Reihe 4,5,6, -/+) und ein homozygoter *U46A^{+/+}*-Knockin (Reihe 3, +/+).

Zusammenfassung: Homozygote *U46A Gpx4^{+/+}+Alox15^{-/-}*-Embryonen sterben in der Embryogenese vor Tag E 8.5. Ein zusätzlicher homozygoter Knockout der *Alox15* kann die embryonale Letalität der *U46A Gpx4^{+/+}*-Embryonen nicht verhindern.

4.3.2 Lipidzusammensetzung der *U46A Gpx4^{+/+}+Alox15^{-/-}*-Peritonealmakrophagen

Neben der *Alox15* sind in der Maus sechs weitere Lipoxygenase-Isoformen bekannt (Kuhn et al., 2014). Um zu überprüfen, ob die verwendeten *U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{-/-}*-Knockout-Mäuse tatsächlich keine funktionelle *Alox15* exprimieren und um zu klären, ob es beim *Alox15*-Knockout zu einer Kompensationsreaktion durch die Hochregulation anderer Lipoxygenaseisoformen kommt, wurde die Fettsäureoxygenierungskapazität von Peritonealmakrophagen quantifiziert. Nach Inkubation mit exogener Arachidonsäure wurden die Arachidonsäureoxygenierungsprodukte mit Hilfe der SP-HPLC analysiert. Zu Kontrolluntersuchungen wurden *U46A Gpx4^{+/+}+Alox15^{+/+}*-Mäuse verwendet. Wie aus Abbildung 4-7 hervorgeht, waren Peritonealmakrophagen von *U46A Gpx4^{+/+}+Alox15^{+/+}*-Mäusen in der Lage, Arachidonsäure zu 12-H(p)ETE zu oxygenieren. Das war bei *U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{-/-}*-Mäusen nicht der Fall. Interessanterweise kam es bei den

U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}-Mäusen zu einer verstärkten 5-H(p)ETE-Bildung. Diese Daten deuten darauf hin, dass der *Alox15*-Knockout zu einer Verstärkung des *Alox5*-Weges geführt haben könnte. Obwohl dieser Effekt mehrfach beobachtet wurde, sind weiterführende Experimente nötig, um dies Schlussfolgerung zu bestätigen. Dies überstieg aber den Rahmen meiner Arbeit.

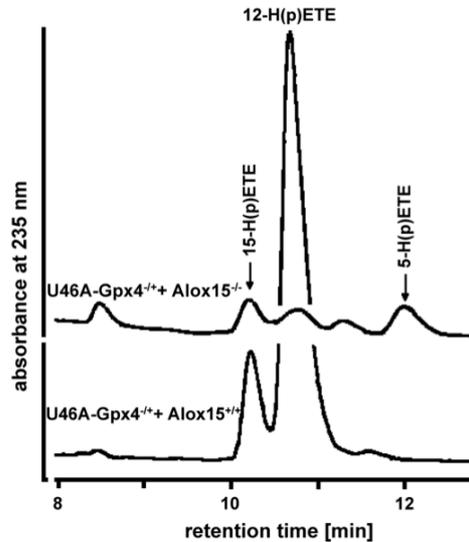


Abbildung 4-7: Oxigenierungsprodukte der Peritonealmakrophagen von *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*-Mäusen nach Inkubation mit Arachidonsäure

Nach Entnahme der Peritonealmakrophagen wurden diese in PBS aufgenommen und mit Arachidonsäure (100 μ M) für 15 min inkubiert. Anschließend wurden die Lipide mit Hilfe der SD-HPLC analysiert (siehe „Material und Methoden“). Als Kontrolle dienen *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Mäuse. *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*-Mäuse produzieren kein 12-HETE.

Zusammenfassung: *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*-Mäuse können exogene Arachidonsäure nicht zu den typischen *Alox15*-Produkten (12S/15S)-H(p)ETE oxygenieren. Zwar kommt es zu einer verstärkten Bildung von 5-H(p)ETE, was jedoch aufgrund der unterschiedlichen biologischen Wirkungen von 12- und 5-H(p)ETE nicht als Kompensationswirkung interpretiert werden sollte.

4.4 Fertilität der *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Männchen

Die Gpx4 spielt bei der Spermatogenese eine bedeutsame Rolle, da sie als Strukturprotein wesentlicher Bestandteil der mitochondrialen Kapsel ist und damit essentiell für den Energiestoffwechsel der Spermien zu sein scheint (Ursini et al., 1999). Ein systemischer heterozygoter Knockout des *Gpx4*-Gens führt nicht zu Einschränkungen der männlichen Fortpflanzungsfähigkeit, während ein spermien-spezifischer homozygoter Knockout des *Gpx4*-Gens zu männlicher Infertilität führt (Imai et al., 2003; Schneider et al., 2009). Bisher war allerdings unklar, ob die heterozygote Expression einer katalytisch inaktiven Gpx4 die Fertilität der Mäuse verändert. Um diese Frage zu klären, wurden heterozygote *U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{+/+}*-Mäuse und Wildtyp- (*U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*)-Kontrollen untereinander und mit den jeweiligen Vergleichsmäusen gepaart und die Nachkommenzahlen pro Wurf quantifiziert (Abbildung 4-8).

Bei der Verpaarung von *U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*-Wildtypmäusen wurden im Durchschnitt 8 Nachkommen pro Wurf (6,25-9,00, 25.-75. Perzentile) geboren. Bei der Verpaarung von heterozygoten *U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{+/+}*-Mäusen untereinander (*U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{+/+}* x *U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{+/+}*) waren es durchschnittlich 5,33 (3,34-6,67, 25.-75. Perzentile) lebensfähige Nachkommen, so dass ein signifikanter Unterschied ($p=0,005$) festgestellt werden konnte. Da homozygote *Gpx4*-Knockin-Embryonen zwischen E 6.5 und E 7.5 absterben und resorbiert werden, musste die Anzahl der gezeugten Nachkommen entsprechend der Mendelschen Regeln korrigiert werden. Die in Abbildung 4-8 angegebenen Zahlen enthalten bereits diese Korrekturen.

Die bei der Verpaarung heterozygoter Knockin-Mäuse ermittelte Anzahl der Nachkommen pro Wurf erlaubt nicht die Unterscheidung, ob die heterozygoten Männchen oder die heterozygoten Weibchen eine verminderte Zeugungsfähigkeit aufweisen. Um diese Frage zu beantworten, wurden sowohl heterozygote *U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{+/+}*-Weibchen als auch heterozygote *U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{+/+}*-Männchen mit einem Wildtyp- (*U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*)-Partner verpaart. Wenn das Männchen heterozygot für die *Gpx4* ist (*U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{+/+}*) und das Weibchen zwei Wildtyp-Allele besaß (*U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*), wurden durchschnittlich 5 (3,00-6,25, 25.-75. Perzentile) Nachkommen pro Wurf geboren.

Ergebnisse

Das sind signifikant weniger Nachkommen als eine reine *U46A Gpx4^{-/-} + Alox15^{+/+}*-Wildtyp-Verpaarung ($p < 0,001$). Wurde ein heterozygoten *U46A Gpx4^{+/-} + Alox15^{+/+}*-Weibchen mit einem Wildtyp Männchen (*U46A Gpx4^{-/-} + Alox15^{+/+}*) verpaart, konnten 6,5 (4,0-9,0, 25.-75. Perzentile) Nachkommen pro Wurf quantifiziert werden (Abbildung 4-8). Dies ergibt im Vergleich zu einer Wildtyp-Verpaarung keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,133$). Es zeigte sich allerdings kein Unterschied zwischen den Verpaarungen von Wildtypen (*U46A Gpx4^{-/-} + Alox15^{+/+}*) mit heterozygoten Männchen (*U46A Gpx4^{+/-} + Alox15^{+/+}*) beziehungsweise heterozygoten Weibchen (*U46A Gpx4^{+/-} + Alox15^{+/+}*). Aus diesen Daten ergab sich, dass heterozygote *U46A Gpx4^{+/-} + Alox15^{+/+}*-Männchen subfertil waren, während entsprechende Knockin-Weibchen keine Fertilitätsprobleme hatten.

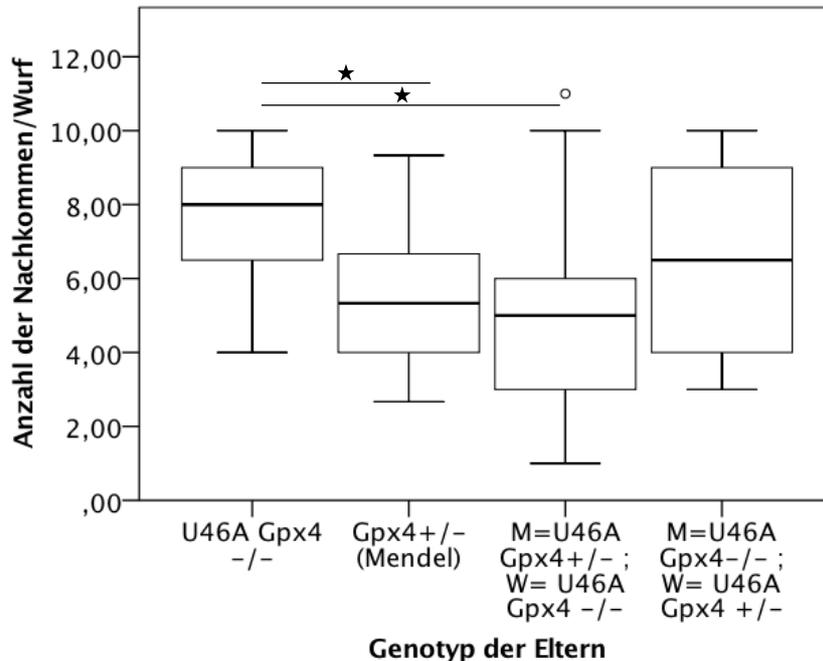


Abbildung 4-8: Nachkommen pro Wurf der Wildtypen *U46A Gpx4^{-/-}* im Vergleich zu heterozygoten *U46A Gpx4^{+/-} x U46A Gpx4^{+/-}*- und *U46A Gpx4^{+/-} x U46A Gpx4^{-/-}*-Verpaarungen

Männchen und Weibchen mit verschiedenen Genotypen wurden verpaart und die Nachkommenzahl wurde ermittelt. Da homozygote *U46A Gpx4^{+/-}*-Tiere embryonal letal sind, wurde die Nachkommenzahl mit Hilfe der Mendelschen Regeln angeglichen. Der *Alox15*-Genotyp ist jeweils Wildtyp (*Alox15^{+/+}*). Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt (* $p < 0,05$).

U46A Gpx4^{-/-}: 36 Verpaarungen mit 269 Nachkommen; *U46A Gpx4^{+/-} x U46A Gpx4^{+/-}*: 9 Verpaarungen mit 35 Nachkommen (nach Mendel: 47); *U46A Gpx4^{-/-}-m* (Männchen) x *U46A Gpx4^{+/-}-w* (Weibchen): 18 Verpaarungen mit 115 Nachkommen, *U46A Gpx4^{+/-}-m* (Männchen) x *U46A Gpx4^{-/-}-w* (Weibchen): 50 Verpaarungen mit 257 Nachkommen.

Zusammenfassung: Werden heterozygote *Gpx4*-Knockin-Männchen (*U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{+/+}*) mit Weibchen gleichen Genotyps und auch mit Wildtyp-Weibchen gepaart, werden signifikant weniger Nachkommen pro Wurf geboren. Dieses Ergebnis deutet auf eine Subfertilität der Knockin-Männchen hin.

4.5 Fertilität der *U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{-/-}*-Männchen

Die homozygote Letalität der *U46A Gpx4^{+/+}*-Tiere konnte durch einen zusätzlichen *Alox15*-Knockout nicht gerettet werden. Ein heterozygoter Knockin der *U46A Gpx4^{-/+}* führt zu einer Subfertilität des Männchens (Abbildung 4-8). Aus der in einigen in vitro Systemen gezeigten antagonistischen Wirkung von *Gpx4* und *Alox15* ergab sich damit die Frage, ob ein systemischer Knockout der *Alox15* die Subfertilität der *U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{+/+}*-Männchen positiv beeinflussen kann.

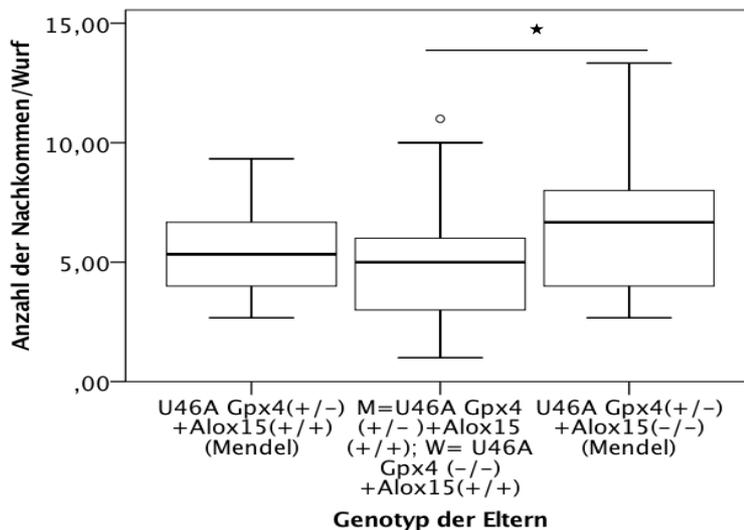


Abbildung 4-9: Nachkommen der *U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{-/-}*-Verpaarung im Vergleich zur Verpaarungen von heterozygoten *U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{+/+}*-Männchen mit Wildtyp-Weibchen (*U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{+/+}*)

U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{-/-}-Männchen wurden mit Weibchen mit dem selben Genotyp verpaart. Bei 85 Verpaarungen kam es zu 394 Nachkommen (nach Mendel: 525). Da ein homozygoter *U46A Gpx4^{+/+}*-Genotyp embryonal letal ist, sind die Zahl der Nachkommen nach den Mendelschen Regeln für *U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{-/-}*- und *U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{+/+}*-Verpaarungen korrigiert worden. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt (* $p < 0,05$).

Bei männlichen heterozygoten *U46A^{-/+} + Alox15^{+/+}*-Tieren zeigt sich eine Subfertilität. *U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{-/-}*-Pärchen haben 6,67 (4,00-8,00, 25.-75. Perzentile) Nachkommen pro Wurf (Abbildung 4-9, 85 Verpaarungen mit 394 Nachkommen (nach Mendel: 525). Im Vergleich zu den subfertilen *U46A Gpx4^{-/+} + Alox15^{+/+}*-Männchen, die

mit einem Wildtyp-Weibchen (*U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*) verpaart wurden, sind es mit $p=0,007$ signifikant mehr Nachkommen. Bei einem Vergleich der Nachkommen der *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*-Verpaarungen mit Verpaarungen heterozygoter *Gpx4*-Mäuse (*U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}* x *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*) gibt es keinen signifikanten Unterschied ($p=0,187$, Abbildung 4-9).

Eine Subfertilität durch einen *Alox15*-defizienten Hintergrund haben K. A. Fischer et al. (2005) gezeigt. Wir konnten bei unseren Verpaarungen eine Subfertilität der homozygoten *Alox15*-Tiere mit einem Wildtyp-*Gpx4*-Lokus (*U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*) bestätigen. *Alox15*-Wildtypverpaarung (*U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*) hatten 7,00 (5,00-8,00, 25.-75. Perzentile) Nachkommen pro Wurf (72 Verpaarungen mit 488 Nachkommen). Homozygote *Alox15*-Knockout-Verpaarungen (*U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}* x *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*) hatten 6,00 (4,00-7,00, 25.-75. Perzentile) Nachkommen pro Wurf (116 Verpaarungen mit 647 Nachkommen). Dies bedeutet, dass es durch einen alleinigen Knockout der *Alox15* (*U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*) zu einer Subfertilität ($p<0,001$, Abbildung 4-10) im Vergleich zum Wildtyp (*U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*) kommt.

Um weitere Hinweise darauf zu erhalten, ob der *Alox15*-Knockout zu einer Verbesserung der männlichen Fertilität von heterozygoten *Gpx4*-Knockin Mäusen (*U46A-Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*) führt, wurden die Schwangerschaftsraten der Verpaarungen quantifiziert. Verpaarungen von zwei heterozygoten *U46A^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Mäusen hatten eine Schwangerschaftsrate von knapp 11%. Bei Verpaarung von *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*-Mäusen untereinander gab es circa 30% tragende Weibchen (Tabelle 4-3).

Tabelle 4-3: Anzahl tragender *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Weibchen im Vergleich zu *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*-Weibchen nach terminierten Verpaarung

	Nicht tragend	tragend	Schwangerschaftsrate(%)
<i>U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}</i> -Verpaarungen	25	3	10,7
<i>U46A Gpx4^{-/+}-Alox15^{-/-}</i> -Verpaarungen	36	13	33,3

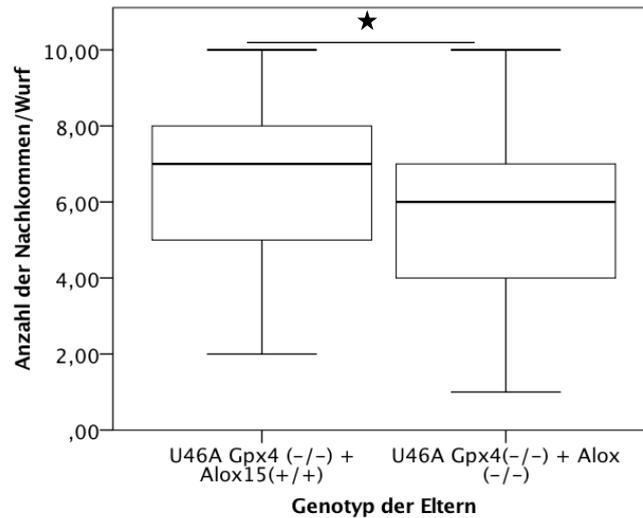


Abbildung 4-10: Anzahl der Nachkommen bei $U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{-/-}$ im Vergleich zu $U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}$ -Tieren

$U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{-/-}$ -Männchen wurden mit Weibchen, mit dem selben Genotyp verpaart. Bei 85 Verpaarungen kam es zu 394 Nachkommen. Bei einer Wildtyp-Verpaarungen($U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}$ x $U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}$) kam es zu 488 Nachkommen bei 72 Würfen. Dies ergibt mit $p<0,001$ einen signifikanten Unterschied. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt (* $p<0,05$).

Zusammenfassung: Ein heterozygoter $Gpx4 U46A^{-/+}$ -Knockin führt bei Männchen zu einer Subfertilität. Durch die Einkreuzung einer homozygoten $Alox15$ -Defizienz in den $U46A Gpx4^{-/+}$ -Stamm kommt es zu einer Erhöhung der Nachkommenzahl pro Wurf. Diese Verbesserung der Fertilität zeigt sich auch an einer erhöhten Rate an tragenden Weibchen.

4.6 Charakterisierung der $U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}$ -Spermien

Auf Grund unserer Beobachtungen der Subfertilität der $U46A^{-/+}+Alox15^{+/+}$ -Männchen sowie aus Beobachtungen vorhergegangener Knockout-Modelle (Imai et al., 2009; Ingold et al., 2015; Wallace et al., 1983) wurden die Gonaden, die Spermio-genese sowie die Struktur und Funktion der Spermien von heterozygoten $Gpx4$ -Knockin-Männchen ($U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}$) genauer untersucht.

Zunächst wurden die Körpergewichte der Versuchstiere quantifiziert. Bei 16 untersuchten männlichen $U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}$ -Mäusen (Wildtyp-Mäuse) betrug das durchschnittliche Körpergewicht 30,5 g (28,7-33,4, 25.- 75. Perzentile). Bei den 18

Ergebnisse

untersuchten männlichen *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Mäuse ergab sich ein durchschnittliches Körpergewicht von 31,2 g (28,2-34,5; 25.-75. Perzentile). Es zeigt sich mit einem Signifikanzniveau von $p=0,686$ und damit kein signifikanter Unterschied im Körpergewicht der beiden Mausstämme.

Zur Untersuchung der Testisgewichte wurden acht *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Mäuse und fünf *U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*-Mäuse zufällig ausgewählt. Die Testes dieser *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Tiere wogen durchschnittlich 2,7 (2,3-3,3; 25.- 75. Perzentile, $n=5$) mg/g Körpergewicht. Die Hoden der *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Männchen wogen durchschnittlich 3,0 (2,7-3,4; 25.- 75. Perzentile) mg/g Körpergewicht ($n= 8$). Damit ergaben sich keine Unterschiede ($p=0,464$) im Testisgewicht zwischen heterozygoten *Gpx4*-Knockin-Mäusen und entsprechenden Wildtyp-Kontrollen (Abbildung 4-11). Die männliche Subfertilität der *Gpx4*-Knockin Mäuse (*U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*) lässt sich damit nicht auf ein reduziertes Hodengewicht zurückführen.

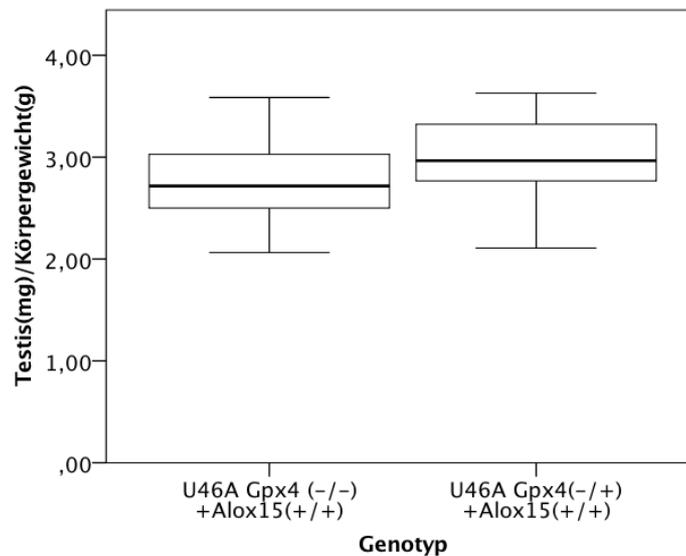


Abbildung 4-11: Testisgewicht pro Körpergewicht bei *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}* im Vergleich zu *U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*

Nach Entnahme und Präparation wurde das Testisgewicht ermittelt und auf das Körpergewicht der Maus bezogen. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Männchen ($n=8$) und den Wildtypen (*U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*, $n=5$). Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt ($*p<0,05$).

Um einen groben Eindruck der Morphologie der Testes zu bekommen, wurden diese mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbten. In Hodenschnitte ergaben keine

offensichtlichen Strukturunterschiede. Das Verhältnis von tubulären zu interstitiellen Flächen war vergleichbar ($p > 0,05$).

Um die Gonadenaktivität und die Effektivität der Meiose beurteilen zu können, wurden die Zellzyklusstadien der testikulären Spermien und deren Vorläufer bestimmt. Mit Hilfe des Durchflusszytometers wurden die Chromosomensätze der Zellkerne in den somatischen Zellen und den Keimzelltypen im Testis analysiert. Dabei sind bei den jeweils fünf untersuchten Tieren keine Unterschiede aufgefallen ($p > 0,05$). Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurde die absolute Anzahl der testikulären Spermien sowie der Spermien in den Abschnitten der Epididymis bestimmt. Die Zahl der Spermien ist nicht signifikant unterschiedlich ($p > 0,05$).

Zusammenfassung: Durch die heterozygote Expression einer katalytisch inaktiven Gpx4 (*U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*) kommt es zu keinen einem signifikanten Unterschieden in Körper- und Testisgewicht im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (*U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*). Zudem zeigen sich keine Unterschiede in Effektivität der Meiose und den Spermienzahlen in Testis und Epididymis.

4.6.1 Motilität der *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Spermien von Cauda und Caput

Durch einen spermien-spezifischen homozygoten Knockout der *Gpx4* kommt es zu einer Infertilität der Männchen (Imai et al., 2009). Sie beschrieben bei diesen Mäusen wurden vor allem im Mittelstück der Spermien morphologische Auffälligkeiten. Die heterozygote Expression einer enzymatisch inaktiven Gpx4 führt zu einer Subfertilität. Im Folgenden wurde untersucht, ob sich die Spermien der *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Knockin Mäuse strukturell und funktionell von den Zellen entsprechender Kontrolltiere unterscheiden.

Zur Charakterisierung der Spermien bestimmten wir zunächst mit Hilfe des CASA-Programms die Motilität (siehe Material und Methoden 3.2.19). Dafür wurden von fünf *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Knockin-Mäusen und fünf Wildtyp-Kontrolltieren (*U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*) Spermien aus dem Caput und der Cauda der Epididymis isoliert. Bei Caput-Spermien ist in keinem der untersuchten Motilitätsparameter ein signifikanter Unterschied festzustellen ($p > 0,05$). Bei Wildtyp-Mäusen (*U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*) lag der Anteil der motilen Spermien, die aus der Cauda des Nebenhodens isoliert wurden,

durchschnittlich bei 37,1 % (28,0-41,7; 25.– 75. Perzentile). Bei heterozygoten *Gpx4*-Knockin-Tieren (*U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*) erreichte dieser Anteil jedoch nur bei 13,7 % (10,4-27,3; 25.- 75. Perzentile) (Abbildung 4-12 A). Aus diesen Daten konnte geschlussfolgert werden, dass die Spermien der *Gpx4*-Knockin-Mäuse signifikant ($p=0.016$) weniger motil waren als die Keimzellen von Wildtyp-Kontroll-Mäusen. Auch der Anteil an progressiv motilen Spermien war bei *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Mäusen mit 5,4% (4,1-13,7; 25.–75. Perzentile) gegenüber Wildtyp-Mäusen (*U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*) mit 28,4 % (17,7-31,0; 25.-75. Perzentile) signifikant ($p=0.016$) geringer (Abbildung 4-12B). Der prozentuale Anteil an schnell progressiven Spermien betrug bei heterozygoten Knockin-Tieren (*U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*) 1,9 % (0,7-10,0; 25.-75. Perzentile). Damit liegt der Anteil der schnellen Schwimmer signifikant ($p=0.009$) unter dem Anteil dieser Zellen (15,3 %; 10,5-21,5; 25.– 75. Perzentile) bei Wildtyp-Kontrollmäusen (Abbildung 4-12 C). Rein rechnerisch ergab sich aus diesen Zahlen, dass der Anteil immotiler Spermien bei heterozygoten *Gpx4*-Knockin-Mäusen mit 86,5% (72,7-89,6; 25.-75. Perzentile; signifikant ($p=0.016$) über dem Anteil von Wildtypmäusen (62,9 %, 58,3-72,0; 25.–75. Perzentile) lag (Abbildung 4-12 D).

Im Vergleich der totalen Motilität der Cauda-Spermien waren die Spermien der *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*-Mäuse sogar besser als die der Wildtyp-Mäuse ($p=0,047$; *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*: 54,38 % (45,65-62,04); *U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*: 37,08 % (27,99-41,70)). Dies spricht für eine Überkompensation des zusätzlichen Knockouts der *Alox15* bei einem heterozygoten *Gpx4*-Genotyp.

Die Spermatogenese läuft überwiegend im Hoden ab und reife Spermien werden in den Kopf des Nebenhodens abgegeben. Sie wandern dann durch dieses Organ in den Schwanz des Nebenhodens. Während ihrer Passage des Organs reifen die Spermien nach und verbessern ihre Beweglichkeit. Epididymale Cauda-Spermien von Wildtyp- (*U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*)-Mäusen zeigten eine um 707 % (218-2003; 25.-75. Perzentile) höhere schnell progressive Motilität im Vergleich zu Caput-Spermien. Im Gegensatz dazu betrug die Steigerung der progressiven Motilität bei *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Spermien nur 141 % (29-141; 25.–75. Perzentile). Diese Daten belegten, dass die Steigerung der Motilität während der Nebenhodenpassage bei *Gpx4*-Knockin-Mäusen signifikant ($p=0,027$) geringer ausfällt als bei Normaltieren. Damit kann

geschlussfolgert werden, dass der *Gpx4*-Knockin bei der epididymalen Spermienreifung eine besondere Rolle spielt.

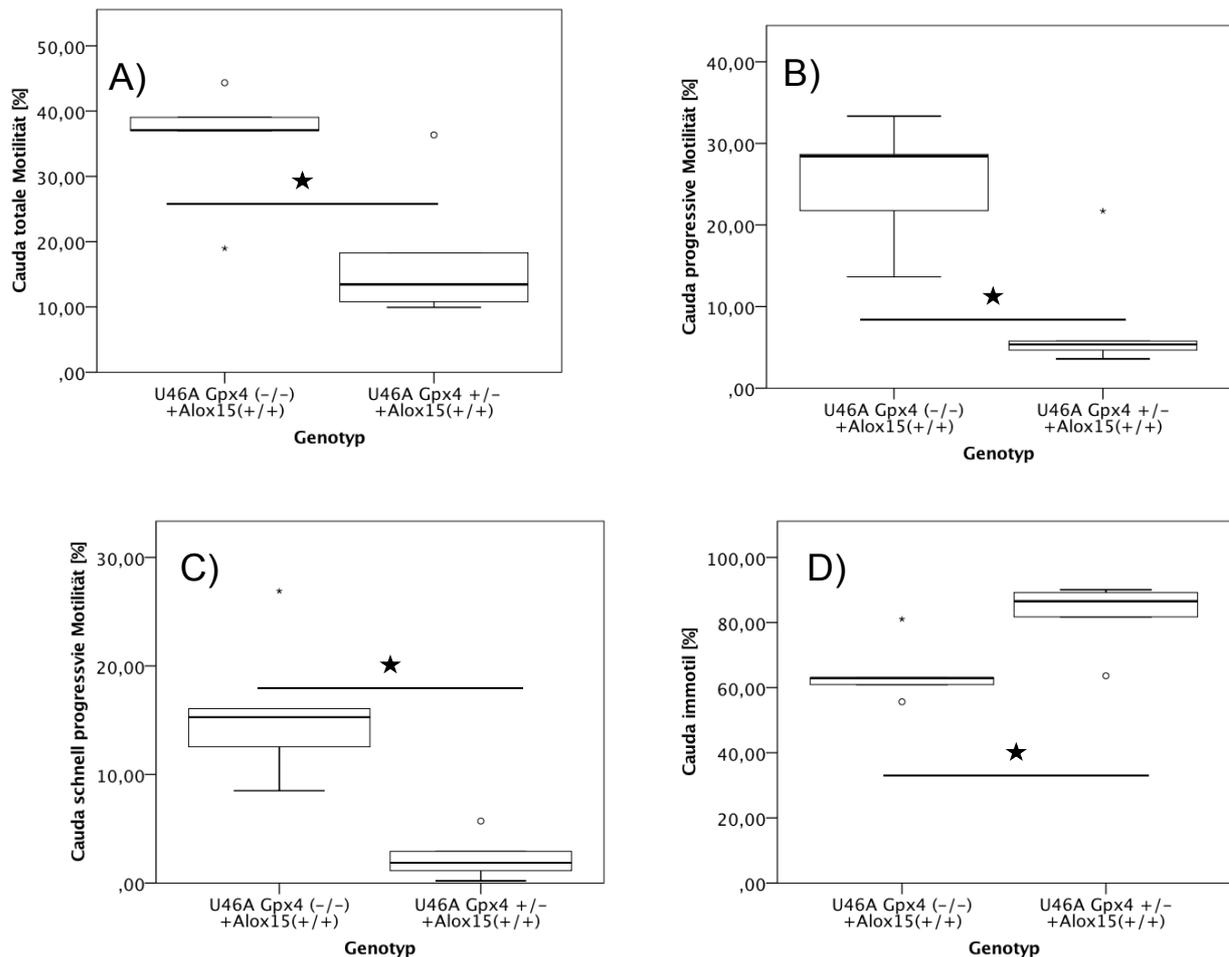


Abbildung 4-12: Motilität der Spermien aus der Cauda von *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Mäusen im Vergleich zu *U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*-Mäusen

Die aus der Epididymis extrahierten Spermien wurden computerassistent untersucht (siehe 3.2.19). Es wurden jeweils fünf Tiere von jedem Genotyp untersucht. Im *Alox15*-Genlocus sind sie jeweils *Alox15^{+/+}*. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt (* $p < 0,05$).

(A) motile Spermien (progressive, kreismotile und lokal motile Spermien)

(B) progressive Spermien (schnell progressiv, langsam progressiv)

(C) schnell progressive Spermien

(D) immotile Spermien

Zusammenfassung: Durch einen funktionellen heterozygoten Knockout der *Gpx4* wird die Motilität der Spermien signifikant schlechter. Zudem kommt es in der Passage in der Epididymis zu einer geringeren Steigerung der progressiven Motilität der *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Spermien im Vergleich zum Wildtyp (*U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*).

4.6.2 Morphologische Unterschiede der *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Spermien im Vergleich zu *U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*-Spermien

4.6.2.1 Mikroskopische Betrachtung und Beurteilung

Bisher wurden strukturelle Veränderungen von Spermien bei unterschiedlichen spermien-spezifischen *Gpx4*-Knockout-Modellen untersucht (M. Conrad et al., 2005; Imai et al., 2009; Schneider et al., 2009). Um zu überprüfen, ob die beobachteten funktionellen Veränderungen (geringere Motilität der *Gpx4*-Knockin-Spermien) von Strukturänderungen begleitet werden, wurde eine Spermac®-Färbung durchgeführt. Nach der Färbung wurden die Spermien unter 1000-facher Vergrößerung genauer untersucht und bewertet (3.2.20). Durch die Färbung werden Zellkerne rot, Akrosomen

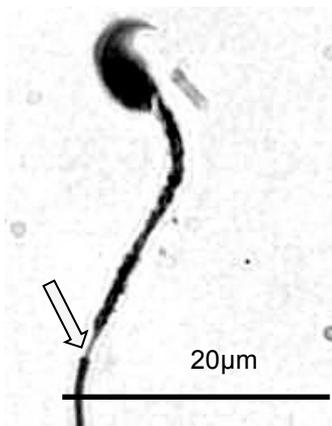


Abbildung 4-13: Verjüngung als morphologisches Korrelat zur fehlenden Mitochondrienkapsel im Bereich des Mittelstück eines *U46A Gpx4^{-/+}*-Spermiums

1000-facher Vergrößerung eines *U46A Gpx4^{-/+}*-Spermiums mit Augenmerk auf die Verjüngung im Mittelstück (→).

dunkelgrün und Mittelstücke grün dargestellt. Bei der Beurteilung wurden normale Spermien ohne Defekt, von Zellen mit morphologischen Auffälligkeiten unterschieden. Es wurde besonderes Augenmerk auf das Mittelstück gelegt. Es wurden Auffälligkeiten wie ein Abknicken im Mittelstück oder ein abgebrochener Schwanz quantifiziert (siehe 3.2.20). Im Durchschnitt hatten 4 % (2,5-6,5; 25.–75. Perzentile) der *U46A Gpx4^{-/+}*-Spermien (n=5) eine Verjüngung im Mittelstück (Abbildung 4-13). Dabei ist die Mitochondrienkapsel im Mittelstück unterbrochen und man sah freiliegende

Mikrotubuli. Bei den *U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*-Wildtypen (n=5) waren weniger als 1 % (0,0-1,0; 25.–75. Perzentile) der Spermien betroffen (p=0,008).

In allen *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Spermien fielen Unregelmäßigkeiten im Mittelstück auf. Trotz blinder Auszählung war daher eine rasche Zuordnung zum Genotyp der Maus möglich. Diese morphologischen Unterschiede könnten am besten als Vergrößerung der Struktur des Mittelstück charakterisiert werden, die sich als Körnung darstellt. Diese Vergrößerung spiegelte eine irreguläre Struktur der

Mitochondrienkapsel des Mittelstücks wieder. Zur besseren Objektivierbarkeit wurde diese morphologische Körnung in drei Schweregrade aufgeteilt und die Zellen morphometrisch ausgewertet. Dazu wurden an zehn unterschiedlichen Stellen des Präparats, die zufällig ausgewählt wurden, jeweils zehn Spermien bewertet. Grad 1 beschreibt ein normales Spermium mit durchgängig grünem Mittelstück und gerade verlaufender Plasmamembran. Grad 2 beschreibt Spermien, deren Mittelstücke gewellt erscheinen und deren Farbe nicht vollständig grün ist. Grad 3 Spermien sind Spermien, die große Durchmesserabweichungen aufweisen und deren Mittelstücke wiederum nicht vollständig grün erscheinen. *U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*-Spermien hatten über 90% normale Spermien (Grad 1: 95,0 % (90,0-100,0; 25.–75. Perzentile), Grad 2: 5,0 % (0,0-10,0; 25.–75. Perzentile)). Im Gegensatz dazu wurden bei *U46A Gpx4^{-/+}*-Knockin-Mäuse keine Grad 1-Spermien gefunden. Bei diesen Tieren konnten im Schnitt 40,0 % (28,0-58,0; 25.–75. Perzentile) Grad 2 und 60,0 % (42,0-72,0; 25.– 75. Perzentile) Grad 3-Spermien festgestellt werden. Der Anteil an Grad 1- und Grad 3- Spermien ist mit $p=0,005$ signifikant unterschiedlich. Bei Grad 2-Spermien beträgt der Signifikanzgrad $p=0.009$ (Abbildung 4-14).

Zusammenfassung: *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Spermien haben signifikant häufiger eine unterbrochene Mitochondrienkapsel im Mittelstück. Normale (Grad 1) Spermien werden bei *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Tieren nicht gefunden, während stark gekörnte Grad 3 Spermien bei Wildtyp-Mäusen (*U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*) nicht nachweisbar waren.

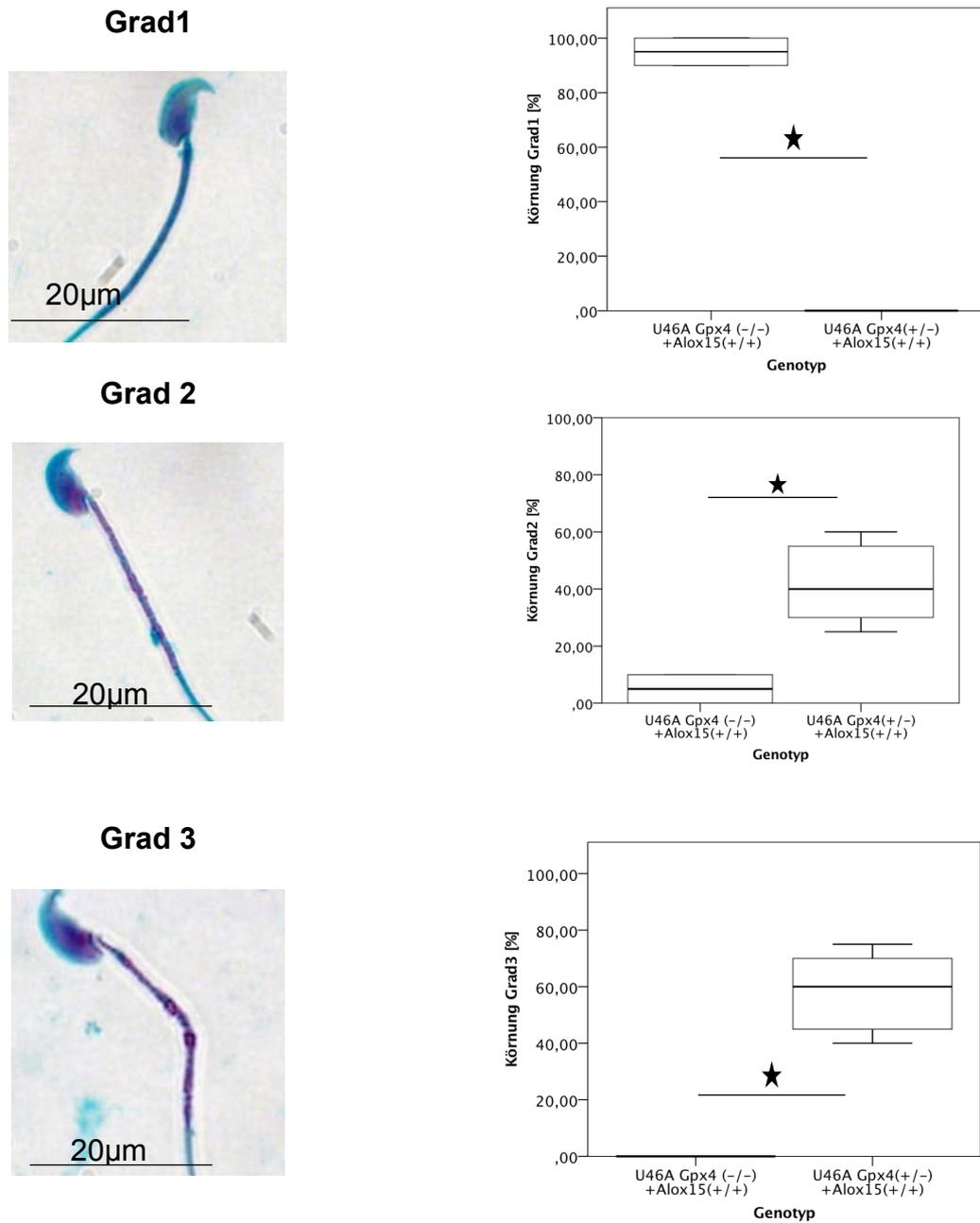


Abbildung 4-14: Morphologie der Mittelstücke der Spermien von Mäusen mit einem heterozygoten enzymatischen Knockin der *Gpx4* im Vergleich zu einem Wildtyp

Die Spermien wurden aus der Epididymis extrahiert und mit der Spermac®-Färbung gefärbt (siehe „Material und Methoden“). Im *Alox15*-Genlocus sind die Spermien jeweils *Alox15*^{+/+} (Wildtyp). Die Unterscheidung in Grade erfolgte auf Grund der morphologischen Unterschiede im Mittelstück. Grad 1 beschreibt normale Spermien, Grad 2 beschreibt moderate Veränderungen und Grad 3 starke Veränderungen des Mittelstücks. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt (*p<0,05).

4.6.2.2 Elektronenmikroskopie und Immunogoldfärbung der *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Spermien

Zur genaueren Charakterisierung der morphologischen Besonderheiten wurden die Spermien mittels der Transmissions-Elektronenmikroskopie untersucht. Als morphologisches Korrelat für die im Mikroskop beschriebenen morphologischen Auffälligkeiten im Mittelstück zeigten sich geschwollene Mitochondrien. Es waren auch Vakuolen in den Mitochondrien und eine irreguläre Anordnung der Mitochondrien innerhalb der mitochondrialen Kapsel zu sehen (Abbildung 4-16). Diese Auffälligkeiten zeigten sich in allen gesichteten Mittelstücken der *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Spermien, unabhängig davon, ob die Spermien aus dem Caput oder aus der Cauda des Nebenhodens isoliert wurden. Die oben genannten Verjüngungen im Mittelstück waren als freiliegende Mikrotubuli der Mittelstücke sichtbar.

Um die subzelluläre Verteilung der Gpx4 in den Spermien zu untersuchen, wurden Immunogold-Untersuchungen mit Spermien von Wildtyp-Mäusen (*U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*) und heterozygoten *U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{+/+}*-Mäusen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein monoklonaler Anti-Gpx4-Antikörper (Borchert et al., 2006) zur Immunfärbung eingesetzt. Die Antigen-Antikörperkomplexe wurden dann mit einem goldmarkierten Anti-Maus-IgG-Antikörper detektiert. Dabei wurde festgestellt, dass die Gpx4 sowohl bei Wildtyp-Mäusen (*U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*) als auch in den *Gpx4*-Knockin Tieren (*U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*) im Zytosol, im Zellkern und in den Mitochondrien nachzuweisen ist (Abbildung 4-15). Dabei ergaben sich keine Unterschiede zwischen Caput- und Cauda-Spermien. Bisher wurde das Vorkommen der Gpx4 in den Plasmotropfen nicht beschrieben. Diese temporären Zellorganellen, die während der Spermienreifung gebildet wurden und zytosolische Zellkomponenten enthalten, die in den späteren Reifungsstadien der Spermien nicht mehr gebraucht werden, enthielten entsprechend unserer Immunfärbungen große Mengen an Gpx4. Frühere experimentelle Ergebnisse haben gezeigt, dass diese temporären Zellorganellen die Alox15 enthalten (K. A. Fischer et al., 2005).

Ergebnisse

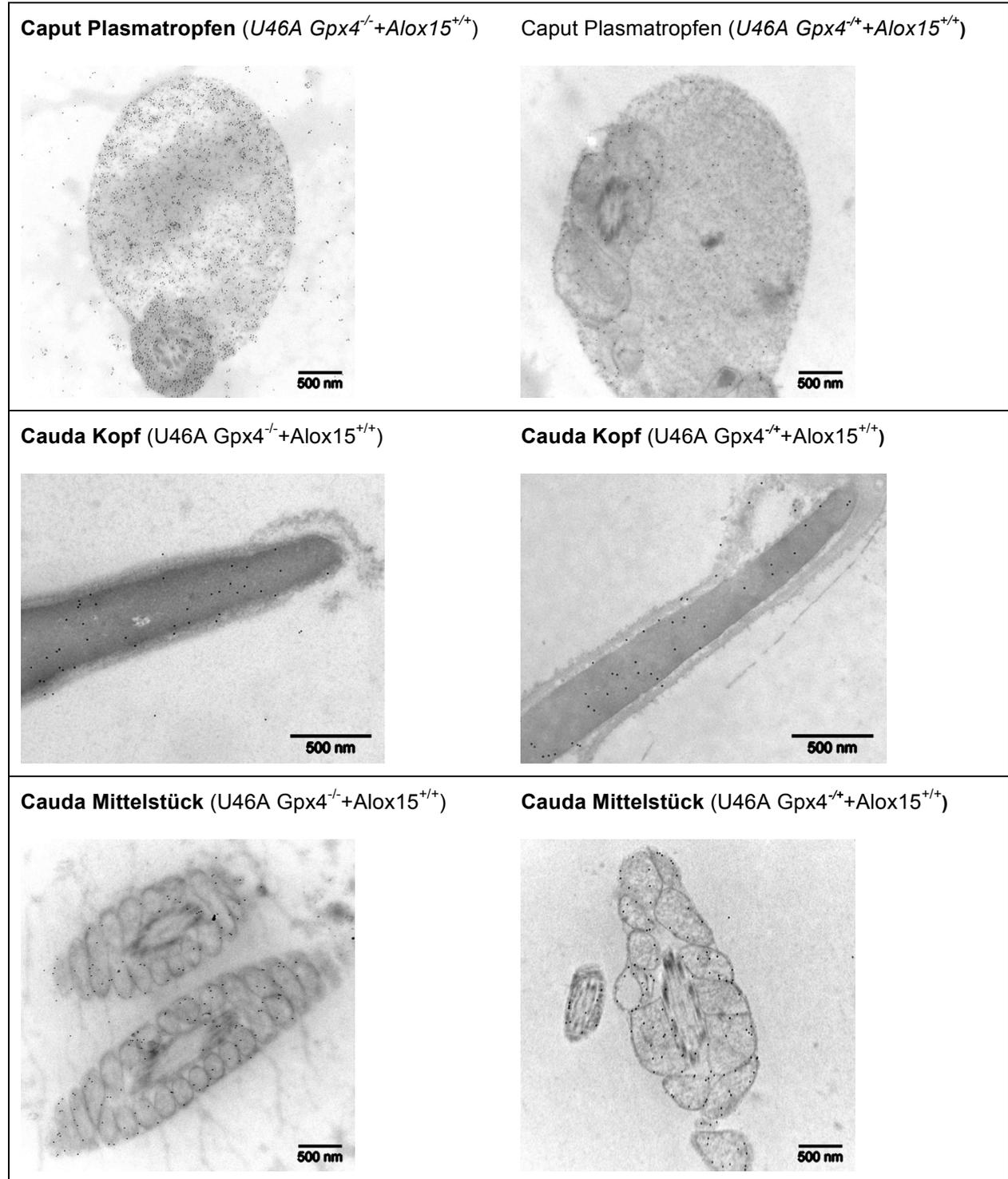


Abbildung 4-15: Immunogoldfärbung von Spermien aus Caput und Cauda von *U46A Gpx4^{-/-}* - und *U46A Gpx4^{+/+}*-Mäusen

Die Immunogoldfärbung der verschiedenen Teile des Spermiums zeigte die Lokalisation der Gpx4. Die Goldpartikel sind als schwarze Punkte erkennbar.

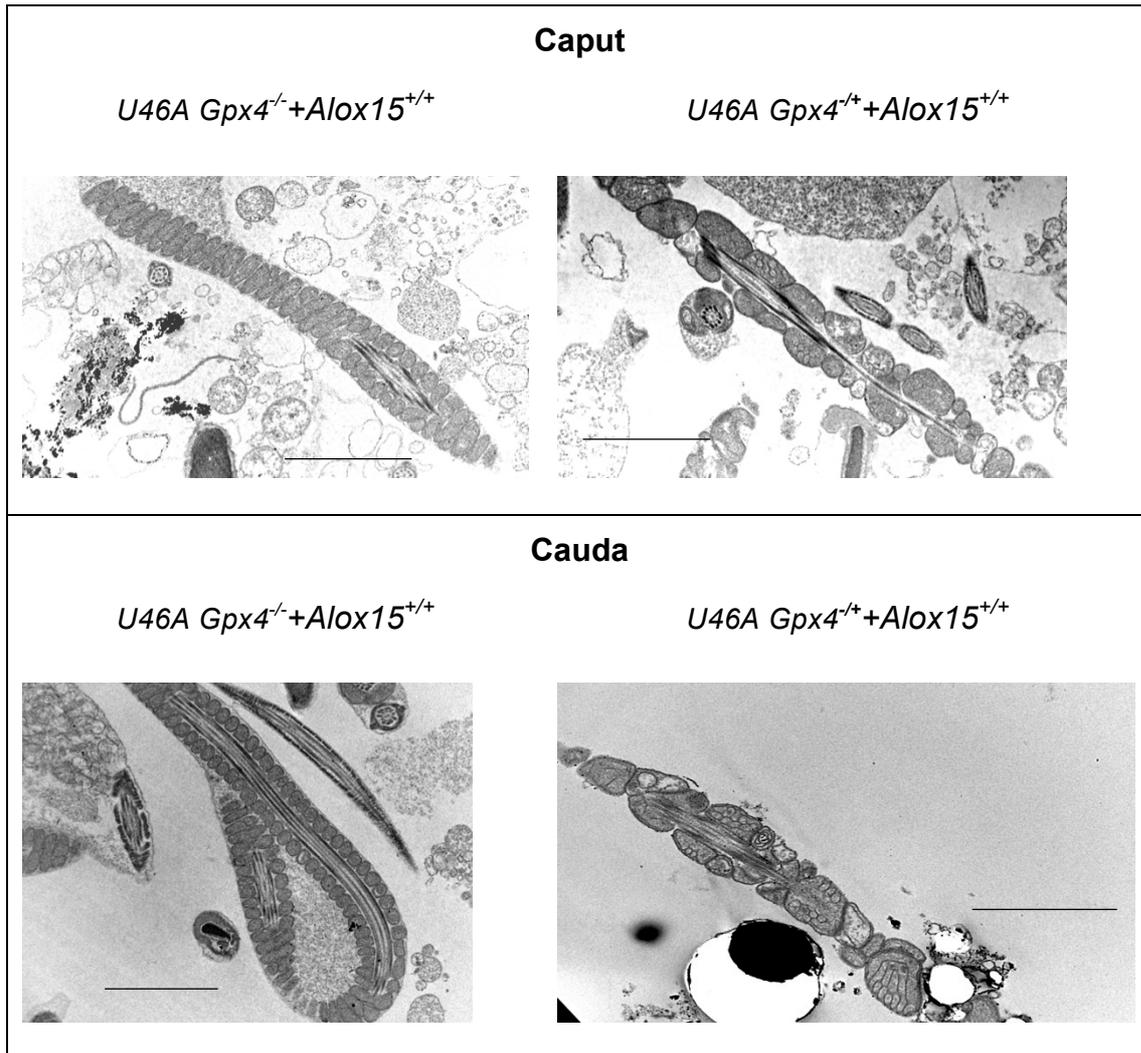


Abbildung 4-16 Transelektronenmikroskopische Aufnahmen von Spermien aus Caput und Cauda von *U46A Gpx4^{+/+}+Alox15^{+/+}*- und *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Mäusen mit besonderem Augenmerk auf dem Mittelstück

Die Gewinnung und Färbung der Spermien ist in „Material und Methoden“ beschrieben. Die Aufnahmen zeigen Mittelstücke. Es sind charakteristische Mittelstücke von Grad 3 Veränderungen der *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Spermien sowie Mittelstücke von normalen Wildtyp- (*U46A Gpx4^{+/+}+Alox15^{+/+}*) Spermien (Grad 1) dargestellt. Der Maßstab beträgt 2µm.

Zusammenfassung: Durch einen heterozygoten Knockin der *Gpx4* (*U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*) ändert sich die Morphologie des Mittelstücks der Spermien und die Anordnung der Mitochondrien innerhalb der mitochondrialen Kapsel. Die Mitochondrien selbst erscheinen geschwollen und tragen teilweise intramitochondriale Vakuolen. Mit Hilfe der Immunogoldfärbung wurde die *Gpx4* in Zellkern, im Zytosol, in den Mitochondrien und im Plasmotropfen nachgewiesen.

4.6.2.3 Vitalität der *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*- und *U46A Gpx4^{+/+}+Alox15^{+/+}*-Spermien

Mit Hilfe einer Rhodamin-123-Propidiumjodid-Färbung wurde die Vitalität der Spermien untersucht. Rhodamin-123 fluoresziert und färbt aktive Mitochondrien grün an. Propidiumjodid penetriert in den Zellkern von nicht vitalen Spermien und färbt diesen rot. Bei einer untersuchten Anzahl von fünf Tieren pro Genotyp zeigten sich keine Unterschiede in der Anfärbbarkeit der Spermien. Bei der Auswertung der Färbungen fiel auf, dass von einem Teil der Spermien sowohl Rhodamin-123 als auch Propidiumjodid aufgenommen wurde. Diese Spermien wurden als „ehemals aktiv“ eingeordnet, sind aber gerade dabei, ihre Integrität zu verlieren. Dieses Zwischenstadium gab es in ähnlichen Anteilen sowohl bei dem *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*- als auch bei den *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Tieren.

Zusammenfassung: Es finden sich keine Unterschiede in der Vitalität der Spermien im Vergleich von *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*- und *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Mäusen.

4.7 Spermien der *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*-Maus

Bisher wurden Unterschiede in der Motilität und der Morphologie der *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Spermien im Vergleich zu *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Wildtypspermien beschrieben. Obwohl die Expression von LOX im Testis schon vor vielen Jahren beschrieben wurde (Dix et al., 1985), gibt es bisher nur wenig Daten zu Rolle der Alox15 bei der Spermatogenese. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass ein systemischer Knockout der *Alox15* zu einer subtilen Subfertilität der Tiere führt im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (K. A. Fischer et al., 2005; K. Moore et al., 2010). Ob ein homozygoter Knockout der *Alox15* auch die Morphologie von *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Spermien beeinflusst, wurde im Folgenden untersucht.

4.7.1 Veränderung der Testisparameter bei einer zusätzlichen homozygoten Inaktivierung der *Alox15* in heterozygoten *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Mäusen

Wie in 4.5 beschrieben, kam es bei *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*-Mäusen zu einer verbesserten Fertilität (erhöhte Trächtigkeitsrate, erhöhte Nachkommenzahl pro Wurf) im Vergleich zu *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Tieren. Ob sich diese funktionelle

Kompensation der Subfertilität auch morphologisch in Gonaden und Spermienparametern nachweisen lässt, sollte im Folgenden untersucht werden.

Als Übersichtsparemeter für die Gonadenmorphologie wurden dafür zunächst die Hodengewichte quantifiziert. Bei *U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{+/+}*-Mäusen variierten die Hodengewichte zwischen um 3,0 mg/g Körpergewicht (2,7-3,4, 25.– 75. Perzentile, n=8, Abbildung 4-17). Durch einen zusätzlichen systemischen Knockout des *Alox15*-Gens (*U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{-/-}*) erhöhten sich die Hodengewichte signifikant ($p < 0.001$). Bei diesen Tieren lagen Hodengewichte um 4,0 mg/g Körpergewicht (3,7-4,7, 25.– 75. Perzentile, n=11, Abbildung 4-17). *Alox15*-Knockout-Mäuse, die im *Gpx4*-Genort zwei Wildtyp-Allele trugen (*U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{-/-}*), zeigten ein durchschnittliches Testisgewicht von 3,6 mg/g Körpergewicht (3,5-4,0, 25. -75. Perzentile, n=8), wobei sich keine signifikanten Unterschiede ($p = 0.125$) zu *U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{-/-}*-Mäusen nachweisen ließen. Bei der absoluten Zahl der Spermien, die aus dem Testis und den einzelnen Abschnitten der Epididymis (Caput, Cauda) isoliert wurden konnten, ergaben sich keine signifikanten ($p > 0.05$) Unterschiede zwischen den Mäusen verschiedener Genotypen.

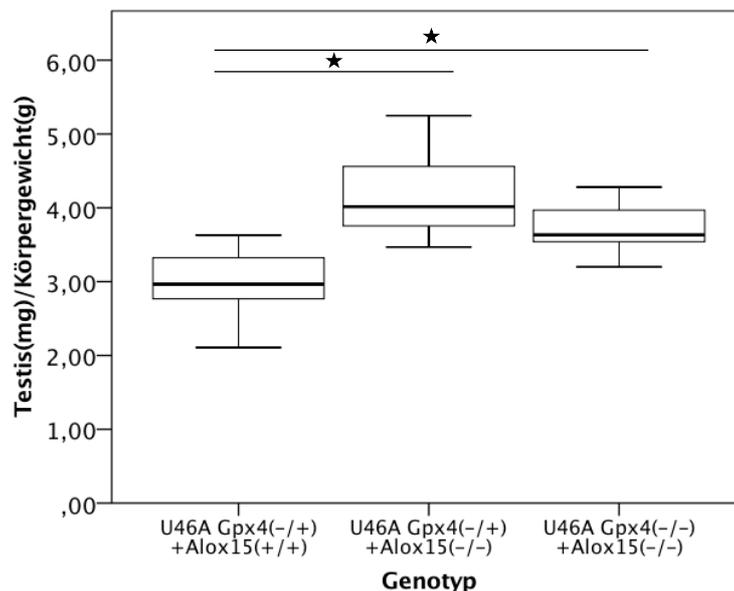


Abbildung 4-17: Testisgewicht in mg/g Körpergewicht bei *U46A Gpx4^{+/-}*-, *U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{-/-}*- und *U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{-/-}*-Mäusen

Nach Entnahme und Präparation wurde das Körpergewicht und das Testisgewicht bestimmt. *U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{-/-}*: 11 Mäuse; *U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{+/+}*: 8 Mäuse, *U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*: 8 Mäuse. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt (* $p < 0,05$).

Durch einen Knockout der *Alox15*^{-/-} kam es unabhängig vom *Gpx4*-Genotyp zu vergrößerten Hoden. In einem morphologischen Vergleich des Verhältnisses von tubulären zu interstitiellen Flächen waren zwischen *U46A Gpx4*^{+/-}+*Alox15*^{-/-}, *U46A Gpx4*^{+/-}+*Alox15*^{+/+}- und *U46A Gpx4*^{-/-}+*Alox15*^{-/-}-Mäusen keine Unterschiede aufgefallen ($p > 0,05$).

Durch Kombination der DAPI-Färbung mit der Durchflusszytometrie können verschiedene Reifestadien der Spermien während der Spermatogenese differenziert werden. Damit war es möglich, Beeinträchtigungen der Effektivität der Spermatogenese zu quantifizieren und einen Arrest des Reifungsprozesses zu definieren. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Spermienreifung bei den verschiedenen Genotypen (n=5).

Zusammenfassung: Die funktionelle Inaktivierung des *Alox15*-Gens führt zu einer Vergrößerung des Testis unabhängig davon, ob der *Gpx4*-Genlocus durch zwei Wildtyp-Allele (*U46A Gpx4*^{-/-}+*Alox15*^{-/-}) oder durch ein Wildtyp-Allel und ein Knockin-Allel (*U46A Gpx4*^{+/-}+*Alox15*^{-/-}) besetzt ist. Es gibt keine signifikanten Unterschiede in der Effektivität der Spermatogenese und der Anzahl der präparierbaren Spermien bei den Tieren mit den drei untersuchten Genotypen (*U46A Gpx4*^{-/-}+*Alox15*^{+/+}, *U46A Gpx4*^{-/-}+*Alox15*^{-/-}, *U46A Gpx4*^{+/-}+*Alox15*^{-/-}).

4.7.1.1 Motilität der *U46A Gpx4*^{+/-}+*Alox15*^{-/-}-Spermien aus Cauda und Caput

Heterozygote *Gpx4*-Knockin Mäuse (*U46A Gpx4*^{+/-}+*Alox15*^{+/+}) zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen (*U46A Gpx4*^{-/-}+*Alox15*^{+/+}) eine verminderte Fertilität (Abbildung 4-12). Die reduzierte Fertilität verbesserte sich jedoch durch einen homozygoten Knockout der *Alox15* (*U46A Gpx4*^{+/-}+*Alox15*^{-/-}). Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die verbesserte Fertilität auf eine Erhöhung der Spermienmotilität zurückzuführen ist.

Die Motilitätsparameter der Caputspermien von *U46A Gpx4*^{+/-}+*Alox15*^{-/-}-Mäuse waren weder im Vergleich zu denen von der *U46A Gpx4*^{+/-}+*Alox15*^{+/+}-Mäuse noch zu denen von *U46A Gpx4*^{-/-}+*Alox15*^{-/-}-Mäuse signifikant verändert (Kruskal-Wallis-H-Test:

$p > 0,05$, n: jeweils fünf Tiere). Bei den *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*-Tieren lag der Prozentsatz aller motilen Spermien bei 54,4 % (45,7-62,0; 25.-75. Perzentile). Der Anteil der progressiv motilen Spermien erreichte hier 34,1 % (25,5-42,8; 25.-75. Perzentile). Es gab einen Anteil von 22,0 % (14,8-30,7; 25.-75. Perzentile) schnell progressiven Spermien und einen Anteil von 45,6 % (38,0-54,3; 25.-75. Perzentile) an immotilen Spermien (siehe Abbildung 4-18).

Während ihrer Wanderung vom Caput zur Cauda des Nebenhodens erhöht sich normalerweise die Motilität der Spermien. Diesen Prozess bezeichnet man als epididymale Spermienreifung. In unseren Experimenten kam es bei der Epididymispassage zu einer Steigerung der progressiven Motilität um 173 % (135-591; 25.-75. Perzentile) bei *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*-Spermien. Diese war vergleichbar mit der Steigerung der progressiven Motilität der *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Spermien ($p > 0,05$). Die Motilität der *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Spermien erhöhte sich um 141 %.

Für die *U46A Gpx4^{+/+}+Alox15^{-/-}*-Tiere lag der Anteil der motilen Spermien bei 46,7 % (28,4-60,5; 25.-75. Perzentile). Es gab 36,1 % (15,7-43,1; 25.-75. Perzentile) progressive Spermien und 20,5 % (6,9-28,0; 25.-75. Perzentile) schnell progressive Spermien. Der Prozentsatz der immotilen Spermien lag bei 53,3 % (39,5-71,6; 25.-75. Perzentile) (siehe Abbildung 4-18, n=5).

Die Motilität der *Alox15^{-/-}*-Spermien aus dem Caput war in folgenden Parametern signifikant besser als die der *Alox15^{+/+}*-Spermien: Anteil an Spermien mit totaler ($p=0,028$), progressiver ($p=0,028$), schnell progressiver ($p=0,047$), lokaler ($p=0,028$) Motilität und Anteil immotiler Spermien ($p=0,028$). Es sind jeweils fünf Tiere untersucht worden. Während im Caput die Motilität signifikant verbessert war, glich sich diese im Cauda bei *Alox15^{+/+}* und *Alox15^{-/-}* wieder an.

Ergebnisse

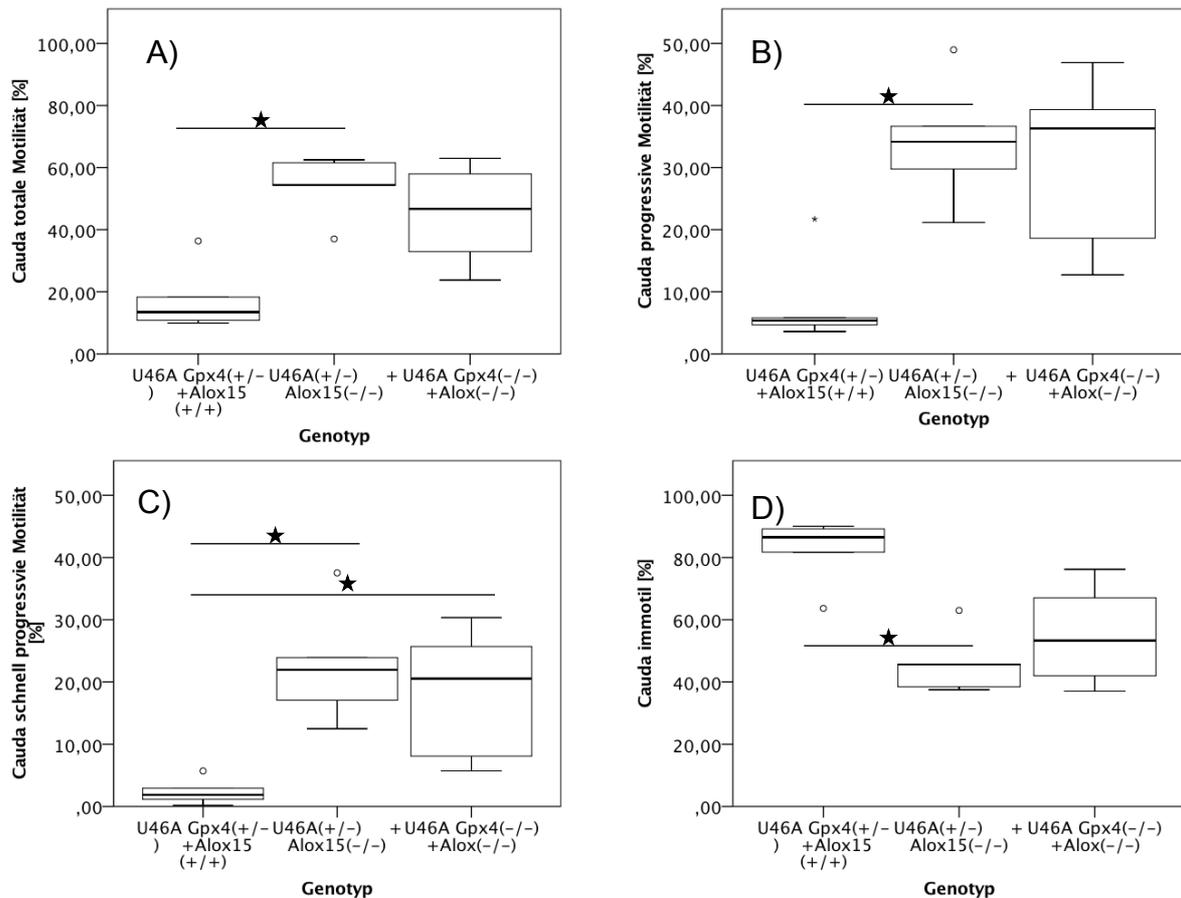


Abbildung 4-18: Motilität der $U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{-/-}$ -Spermien im Vergleich zu den $U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{+/+}$ - und $U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{-/-}$ -Spermien

Spermien wurden extrahiert und ihre Motilitäten computergestützt bestimmt (siehe „Material und Methoden“). Es wurden jeweils von fünf Männchen Spermien entnommen (Männchen mit $U46A Gpx4^{-/-}$ -Genotyp, homozygot defizienten $Alox15$ -Männchen ($Alox15^{-/-}$) und Männchen die sowohl für die $Alox15$ homozygot als auch für die $Gpx4$ heterozygot defizient sind ($U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{-/-}$). Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt (* $p < 0,05$).

- (A) motile Spermien (progressive, kreismotile Spermien und lokal motile)
- (B) progressive (vorwärts motile Spermien: schnell progressiv, langsam progressiv)
- (C) schnell progressive Spermien
- (D) immotile Spermien

Zusammenfassung: Durch eine zusätzliche homozygote $Alox15$ -Defizienz wird die verschlechterte Motilität in den Cauda-Spermien eines $U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{+/+}$ -Tieres verbessert. Ein alleiniger homozygoter Knockout der $Alox15$ ($U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{-/-}$) induziert im Caput eine Verbesserung der Motilität im Vergleich zu einem Wildtyp ($U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}$). In der Cauda gleichen sich deren Werte wieder an.

4.7.2 Morphologische Unterschiede der *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*-Spermien im Vergleich zu *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*- und *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Spermien

4.7.2.1 Morphologie der *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*-Spermien

Für ihre Motilität benötigen Spermien Energie, wobei noch nicht vollständig geklärt ist, ob die mitochondriale Atmung die Hauptquelle für die ATP-Synthese von Spermien ist. Durch systemische Inaktivierung des *Alox15*-Gens bei heterozygoten *U46A Gpx4^{-/+}*-Mäusen (*U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*) verbessert sich die Motilität. Für die Beantwortung der Frage, ob sich die morphologischen Auffälligkeiten der heterozygoten Knockin-Spermien durch einen zusätzlichen Knockout der *Alox15* rückgängig machen lassen, wurden vergleichend *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*-Spermien und *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Spermien (n=5) mit der Spermac[®]-Färbung gefärbt und ihre Morphologie beurteilt.

Die Spermien der *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*-Tiere hatten 0,0 % (0,0-78,5, 25. - 75 Perzentile) Spermien mit einem normalen Mittelstück (Grad 1). Grad 2 Mittelstückdefekte gab es im Durchschnitt bei 44,0 % (21,5-63,0, 25. -75 Perzentile) der Spermien. Starke Veränderungen (Grad 3) im Mittelstück gab es bei 36,0 % (00,0-46,5, 25. -75 Perzentile) der Spermien (siehe Abbildung 4-19). Ähnliche Werte ergaben sich auch für die Spermien von *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Tiere.

Daraus konnte geschlossen werden, dass ein zusätzlicher systemischer Knockout des *Alox15*-Gens die morphologischen Defekte, die durch den heterozygoten Knockin des *U46A Gpx4*-Allels induziert wurden, nicht abschwächt (Abbildung 4-19, $p > 0,05$). *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*-Spermien hatten weniger Grad 1-Spermien im Mittelstück ($p = 0,009$) als der Wildtyp (*U46A Gpx4^{-/+}+Alox^{+/+}*). Sie hatten signifikant mehr Spermien mit leichten morphologischen Defekten im Mittelstück (Grad 2: $p = 0,009$). Die große Streuung kam durch eine hohe morphologische Heterogenität der *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*-Spermien zustande.

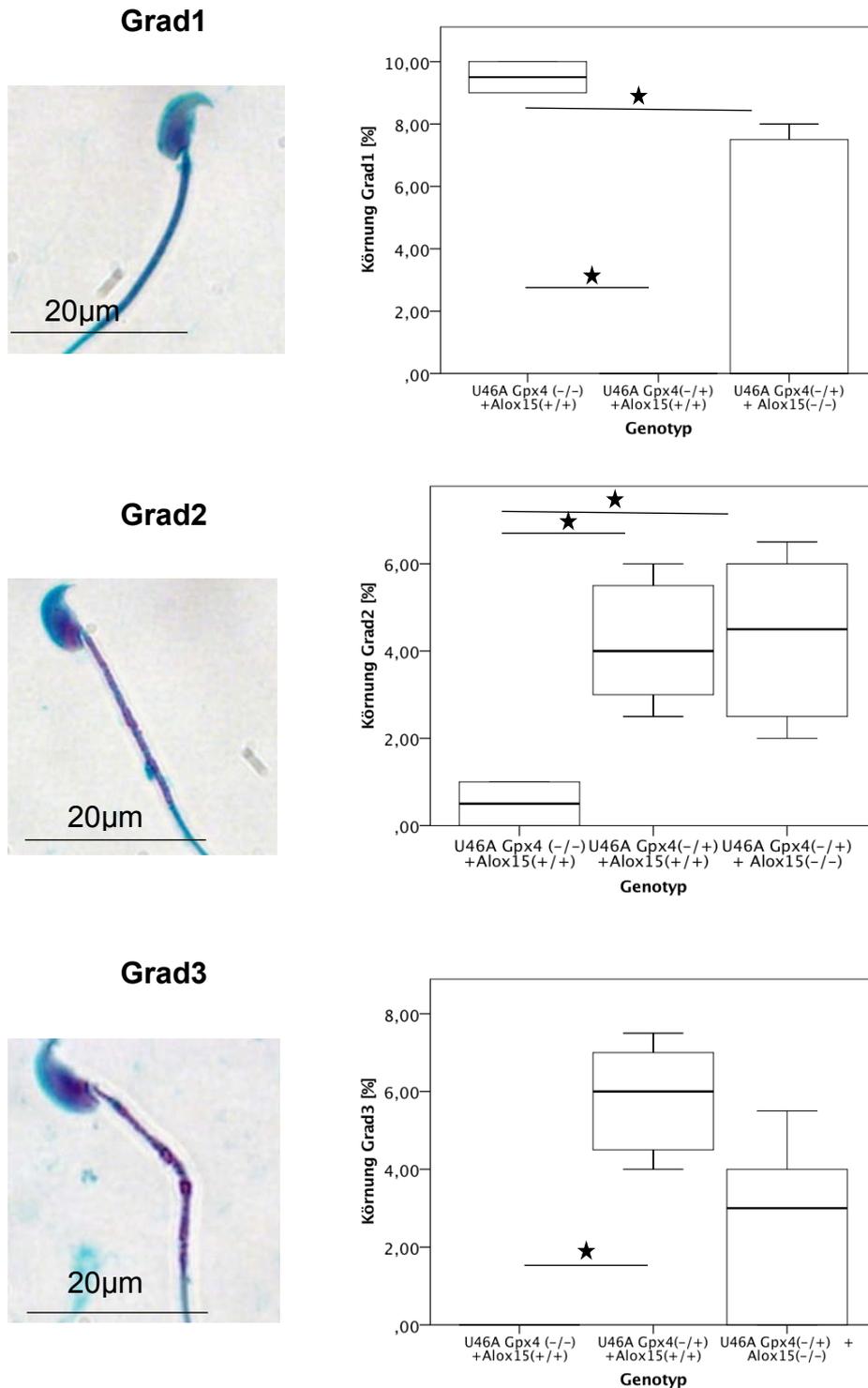


Abbildung 4-19: Morphologie der Mitochondrien der Spermien der $U46A\ Gpx4^{+/+}+Alox15^{-/-}$ -Knockin-Spermien im Vergleich zu $U46A\ Gpx4^{-/-}$ - und $U46A\ Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}$ -Spermien

Spermien wurden aus der Epididymis extrahiert und mit der Spermac®-Färbung gefärbt (siehe „Material und Methoden“). Die Unterscheidung in Grade erfolgte aufgrund der morphologischen Unterschiede im Mittelstück. Grad 1 beschreibt normale Spermien, Grad 2 beschreibt moderate Veränderungen und Grad 3 starke Veränderungen des Mittelstücks. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt (* $p < 0,05$).

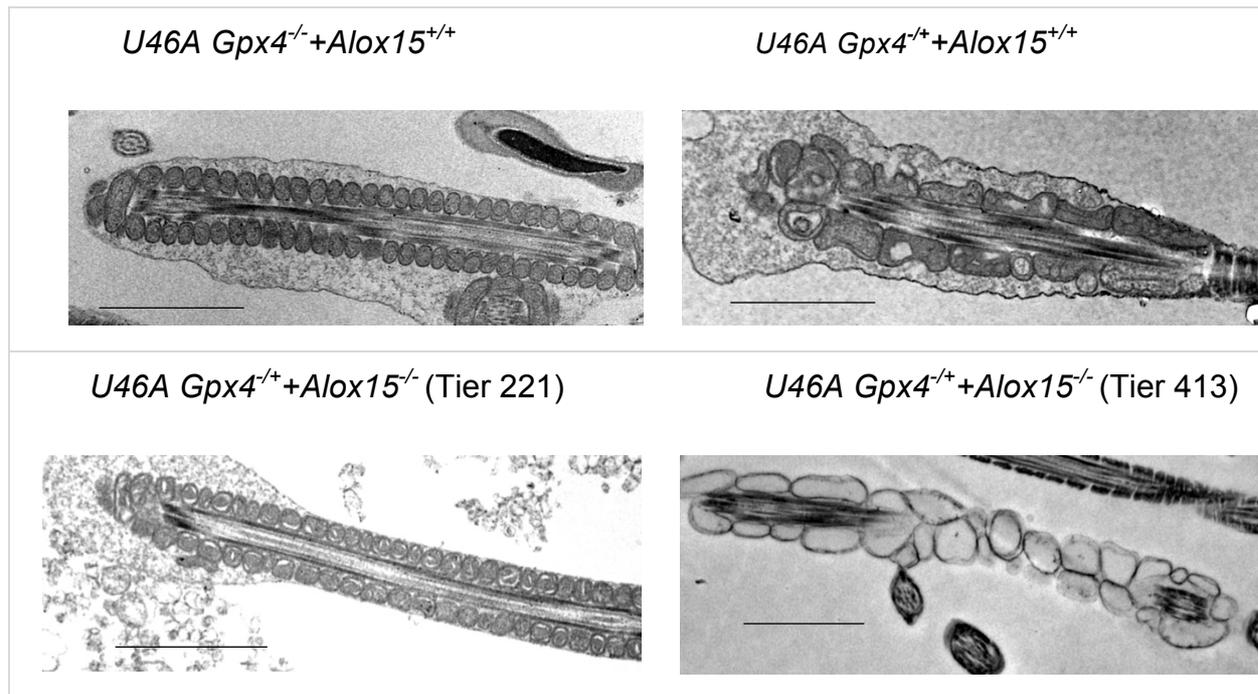


Abbildung 4-20 Transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahmen von Spermien von *U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{-/-}*-Mäusen mit besonderem Augenmerk auf dem Mittelstück

Die Gewinnung der Spermien und die Elektronenmikroskopie ist in 3.2.21 beschrieben. *U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{-/-}*-Tiere wiesen Unterschiede in den Mittelstücken auf. So gibt es Tiere, die Spermien wie *U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*-Tiere (vgl. Tier 413), während andere wie *U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*-Tiere (vgl. Tier 221) hatten. Der Maßstab ist in den Bildern eingefügt und entspricht 2µm.

Wir stellten bei unseren Untersuchungen fest, dass es unter den *U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{-/-}*-Mäusen Tiere gab, deren Spermien wie die von *U46A Gpx4^{+/-}+Alox^{+/+}*-Mäusen aussahen (starke morphologische Veränderungen). Andererseits gab es auch Tiere, deren Spermien morphologisch denen von Wildtyp-Mäusen (*U46A-Gpx4^{-/-}+Alox^{+/+}*)-Mäusen ähnelten (Abbildung 4-20 Tier 221, Abbildung 4-20 Tier 413). Trotz der Heterogenität in der Morphologie der Mittelstücke waren die *U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{-/-}*-Spermien motiler als die Spermien der *U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*-Mäuse.

Zusammenfassung: Ein zusätzlicher homozygoter Knockout der *Alox15^{-/-}* führt bei einem Teil der heterozygoten *U46A-Gpx4^{+/-}-Knockin-Mäuse (U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{-/-})* zu einer Kompensation der morphologischen Veränderungen, die durch einen heterozygoten *U46A Gpx4-Knockin (U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{+/+})* entstehen. Entweder kommt es bei den *U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{-/-}*-Spermien nur zu geringen morphologischen Veränderungen oder die Spermien ähneln denen, die aus *U46A-Gpx^{+/-}*-Tieren präpariert worden sind.

4.7.3 Oxidativer Status der Spermien

Die Alox15 und die Gpx4 sind enzymatische Gegenspieler im Stoffwechsel von Hydroperoxylipden (Kuhn et al., 2002). Während die Alox15 mehrfach ungesättigte Fettsäuren zu den entsprechenden Hydroperoxiden oxidiert, werden die Hydroperoxyfettsäuren von der Gpx4 zu den entsprechenden Alkoholen reduziert. Durch die katalytische Wirkung der Gpx4 reduziert sich der zelluläre Gehalt an Hydroperoxylipden, so dass eine wichtige Quelle von freien Radikalen eliminiert wird. Die freien Radikale könnten in der Folge Sekundärreaktionen initiieren, die eine verstärkte Oxidation von Membranlipiden bewirken könnten. Mit Hilfe der RP-HPLC kann das Verhältnis von oxygenierten Polyenfettsäuren (OH-FA) zu nicht-oxygenierten Polyenfettsäuren (PUFA) bestimmt werden, das als ein verlässliches Maß des Oxygenierungsgrades der Membranlipide angesehen werden kann.

Durch einen heterozygoten Knockin der enzymatisch inaktiven *U46A*-Variante der *Gpx4* kam es weder bei Caput- noch bei Cauda-Spermien zu einer Veränderung des Oxygenierungsgrades der Membranlipide, wenn verschiedene Genotypen miteinander verglichen wurden. So zeigten z.B. Spermien, die aus *U46A-Gpx4^{-/-} + Alox15^{-/-}*-Mäusen isoliert wurden, ein ähnliches OH-PUFA/PUFA-Verhältnis der Membranlipide wie Spermien von *U46A-Gpx4^{-/+} + Alox15^{-/-}*-Mäusen.

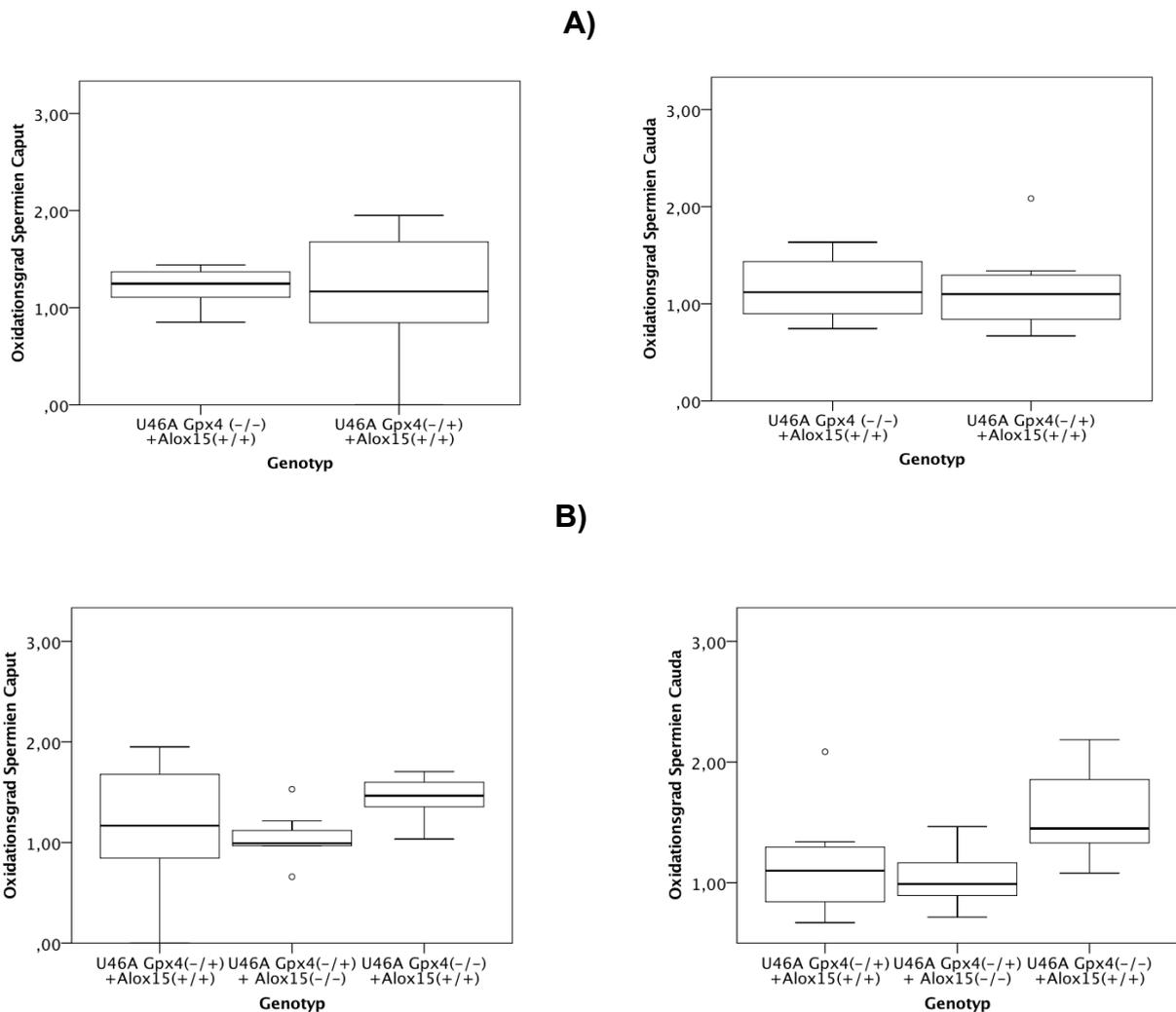


Abbildung 4-21: Membranoxidationsgrad von Spermien aus Cauda und Caput

Nachdem die Spermien und anschließend deren komplette Membranlipide extrahiert wurden, wurden die veresterten Fettsäuren hydrolysiert und die Lysate mit der HPLC analysiert (siehe 3.2.12). Es ist das Verhältnis (in %) von oxygenierten Polyenfettsäuren zu nicht-oxygenierten Polyenfettsäuren in der Lipidmembran der Spermien dargestellt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt (* $p < 0,05$).

(A) Verhältnis von HETE/langkettigen Fettsäuren in Caput und Cauda von *U46A Gpx4*^{-/-} und *U46A Gpx4*^{-/+}*Alox15*^{+/+}-Tieren. (jeweils n=8)

(B) Verhältnis von HETE/langkettigen Fettsäuren in Caput und Cauda von *U46A Gpx4*^{-/-}, *U46A Gpx4*^{+/-}*Alox15*^{-/-} und *Alox15*^{-/-}-Tieren (jeweils n=8)

Zusammenfassung: Weder die heterozygote Expression der katalytisch inaktiven *U46A Gpx4*-Variante, noch der systemische Knockout der *Alox15* induziert in den Spermien einen signifikant veränderten Oxidationsgrad der Membranlipide. Auch die Kombination beider genetischer Manipulationen ein kombinierter Knockout (*U46A Gpx4*^{+/-}*Alox15*^{-/-}) führt zu keiner Änderung.

5 Diskussion

Die Gpx4, als Teil der Familie der Selenoproteine, ist sowohl für die Embryonalentwicklung (Imai et al., 2003; Yant et al., 2003) als auch für das Überleben adulter Mäuse bedeutsam (Yoo et al., 2012). Auf Grund der Funktion der Gpx4 als endogener Lox-Inhibitor (Schnurr et al., 1996; Wendel et al., 2009) könnte es durch ein Defizit der Gpx4 zu einer vermehrten Lipidperoxidation durch die Alox15 oder zu einer erhöhten Leukotrienbiosynthese durch die Alox5 kommen. Weiterhin wird vermutet, dass die Funktionalität anderer LOX-Isoformen (z.B. Alox12b, Alox3) dysreguliert werden könnte, was Probleme bei der epithelialen Differenzierung hervorrufen könnte (Brash et al., 2007; Krieg et al., 2013). Zum anderen könnte ein Fehlen der Gpx4 als Strukturprotein zu für die embryonale Letalität von *Gpx4*-Knockout-Embryonen verantwortlich sein. Zu Beginn meiner Forschungsarbeiten gab es bereits Keimbahn-Knockout-Modelle der *Gpx4*. Es existierte jedoch noch kein In-vivo-Modell mit dem überprüft werden konnte, ob die Expression einer katalytisch inaktiven *Gpx4*-Variante zu ähnlichen funktionellen Veränderungen führen würde wie die systemische Inaktivierung des *Gpx4*-Gens. Hauptziel des ersten Teils meiner Dissertation war es deshalb herauszufinden, ob die homozygote Expression einer katalytisch inaktiven *Gpx4* (*U46A*-Mutante) ähnlich wie der systemische Keimbahn-Knockout zu einem embryonal letalen Phänotyp führt und ob die Inaktivierung des *Alox15*-Gens den *Gpx4*-Mangel ausgleichen kann. Da die *Gpx4* eine wesentliche Rolle bei der Spermatogenese spielt, sollte im zweiten Teil meiner Arbeit untersucht werden, ob heterozygote Knockin-Mäuse, welche die inaktive Enzymvariante exprimieren, Defizite in der Spermatogenese aufweisen. Auch hier sollte anschließend geklärt werden, ob die Inaktivierung des *Alox15*-Gens die defizitäre Spermatogenese normalisieren und damit die Fertilität verbessern kann.

5.1 Bedeutung der *Gpx4* in der Embryogenese

Die *Gpx4* stellt ein besonderes Selenoprotein dar. Neben der Wirkung als Peroxid-reduzierendes Enzym besitzt die *Gpx4* auch eine Funktion als Strukturprotein (Brigelius-Flohe, 1999). Ein systemischer Knockout des *Gpx4*-Gens ist embryonal letal (Garry et al., 2008; Imai et al., 2003; Yant et al., 2003). Aus den bisherigen *Gpx4*-Knockout-Modellen ließ sich jedoch nicht ableiten, ob die embryonale Letalität auf den Verlust der Enzymaktivität oder auf das Fehlen des Strukturproteins zurückzuführen ist.

Mit Hilfe des vorgestellten *U46A Gpx4*-Knockin-Maus-Modells lässt sich diese Frage beantworten. Durch die Verwendung des *U46A Gpx4*-Knockin-Modells konnte erstmals gezeigt werden, dass ein Verlust der enzymatischen Aktivität der Gpx4 zur embryonalen Letalität führt. Die Mutation des Selenocysteins im aktiven Zentrum zum Alanin führt zur kompletten katalytischen Inaktivierung des Enzyms (Scheerer et al., 2007).

Heterozygote *U46A Gpx4^{+/+}*-Knockin-Mäuse sind lebensfähig, fertil und zeigen keine offensichtlichen phänotypischen Auffälligkeiten. Aus dem von uns vorgestellten Knockin-Modell lässt sich schließen, dass die embryonale Letalität auf den Verlust der enzymatischen Funktion der Gpx4 zurückzuführen ist. Der Zeitpunkt der embryonalen Letalität verändert sich im Vergleich zu anderen *Gpx4*-Knockout-Mäusen nicht (Imai et al., 2003; Yant et al., 2003). Die Publikation von Ingold et al. (2015), die kurz nach der ersten Publikation (Brutsch et al., 2015) erschienen ist, konnte dies bestätigen.

Über die genaue Funktion der Gpx4 in der Embryogenese kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Allerdings konnte durch den enzymatischen Knockout gezeigt werden, dass die Gpx4 mit ihrer enzymatischen Funktion für die Embryogenese unerlässlich ist. Als möglicher Ansatzpunkt für eine mechanistische Erklärung der embryonalen Letalität dient der Zeitpunkt des intrauterinen Absterbens der Embryonen: i) Durch den Zeitpunkt der Letalität sowie Nachweise der Gpx4 im Ektoderm kann eine Rolle der Gpx4 in der Entwicklung des zentralen Nervensystems diskutiert werden (Borchert et al., 2006; M. A. Hill, 2015). ii) Auch eine allgemeinere Rolle der Gpx4 in der Gastrulation oder bei der Differenzierung kann möglich sein, da homozygote Embryonen auch eine unzureichende Höhlenbildung in der Gastrulation aufweisen (M. A. Hill, 2015; Imai et al., 2003). Zudem beginnt die Gastrulation zum Zeitpunkt des Absterbens der homozygoten Embryonen. iii) Es werden zu diesem Zeitpunkt die ersten hämatopoietischen Zellen im Dottersack gefunden (M. A. Moore et al., 1970). Zudem kommt es durch eine *Gpx4*-Defizienz zur Nekroptose der Erythrozytenvorläuferzellen (Canli et al., 2015). Durch eine selen-defiziente Diät kommt es zu hämatopoietischen Veränderungen (Kaushal et al., 2011). Eine Rolle der Gpx4 in der Differenzierung der Erythrozyten ist demnach denkbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der homozygote Verlust der enzymatischen Funktion der Gpx4 zur Letalität der Embryonen führt. Dieser Befund

wurde unabhängig voneinander an zwei verschiedenen Knockin-Modellen bestätigt (Brusch et al., 2015; Ingold et al., 2015). Der Zeitpunkt der embryonalen Letalität ändert sich nicht. Die Gpx4 als Strukturprotein hat keinen Einfluss auf die embryonale Letalität der Gpx4.

5.2 Charakterisierung der *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Mäuse

In heterozygoten *Gpx4*-Knockout-Mäusen kam es auf Grund des Verlusts der Expression eines *Gpx4*-Allels zur verminderten mRNA- und Protein-Expression (Yant et al., 2003; Yoo et al., 2012). Bei einem heterozygoten enzymatischen Knockin der *Gpx4* fanden wir ein vergleichbares mRNA-Level bei *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*- und *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Mäusen. Auf Proteinebene konnte eine erhöhte Gpx4-Expression in allen untersuchten Geweben mittels Immunoblotting nachgewiesen werden. Dabei muss betont werden, dass der eingesetzte Antikörper (Borchert et al., 2006) nicht zwischen dem Wildtyp- (*U46*) und dem Knockin-Protein (*U46A*) unterscheiden kann, so dass keine Aussage darüber gemacht werden kann, ob beide *Gpx4*-Varianten in ähnlicher Menge exprimiert werden oder ob eine der beiden Proteinvarianten dominiert. Auf RNA Ebene ist das Verhältnis der Expression von Wildtyp- (*U46*)- und Knockin- (*U46A*)-Allel in den untersuchten Geweben der Knockin-Mäuse identisch (Brusch et al., 2015). Es stellt sich die Frage, ob es posttranslational zu einer verstärkten Expression des *Gpx4*-Gens kommt, um den Verlust an katalytisch aktivem Enzym auszugleichen. Die erhöhte Konzentration des Gpx4-Proteins könnte darauf hinweisen, dass es durch die enzymatische Inaktivierung der Gpx4 zu einer kompensatorisch erhöhten Synthese von Gpx4 kommt. Diese Regulation muss posttranskriptional stattfinden, da wir vergleichbare mRNA-Konzentrationen für die Wildtyp-*Gpx4* (*U46*) und ihre *U46A*-Variante nachweisen konnten. Mechanistisch könnte es zu einer vermehrten Translation beider mRNA-Spezies oder zu einer Stabilisierung der mRNA kommen. Des Weiteren ist es möglich, dass die erhöhte Proteinkonzentration auf Grund einer erhöhten Translationseffizienz des *U46A*-Allels zustande kommt (Gonzalez-Flores et al., 2013). Die geringere enzymatische Aktivität der Gpx4 ist am ehesten auf den heterozygoten Verlust und beziehungsweise oder auf eine nicht vollständige Kompensation zurückzuführen.

In Testis, den Nieren und im Gehirn konnten wir eine verminderte enzymatische Aktivität der Gpx4 nachweisen. In den anderen untersuchten Geweben kam es zu

keinem Unterschied der enzymatischen Aktivität. Auch Garry et al. (2008) zeigten, dass es bei einem heterozygoten Knockout der *Gpx4* in Testis und Leber zu einer verminderten Aktivität kommt. Die Aktivität der *Gpx4* im Gewebe wurde mit Hilfe des gekoppelten optischen Tests unter Verwendung von Phospholipidhydroperoxid als Substrat bestimmt. Phospholipidhydroperoxide werden spezifisch nur von der *Gpx4* umgesetzt (Maiorino et al., 1990). Somit konnten wir sicherstellen, dass die gemessenen Aktivitäten der *Gpx4* nicht durch Aktivitäten der anderen Glutathionperoxidasen beeinflusst werden. Bei einem Austausch des Selenocysteins durch ein Serin kommt es zu einer isolierten verminderten Aktivität in der Leber (Ingold et al., 2015).

Zusammenfassend kann man sagen, dass es durch einen heterozygoten enzymatischen Knockin der *U46A Gpx4* zu einer erhöhten Proteinkonzentration der *Gpx4* bei teilweise verminderter Enzymaktivität kommt.

5.3 Bedeutung der *Gpx4* als endogener LOX-Inhibitor

Die *Alox15* und die *Gpx4* werden als Gegenspieler in der Regulation des Peroxidtonus angesehen (Forman et al., 2014). In embryonalen *Gpx4*-defizienten Fibroblasten wurde gezeigt, dass ein *Gpx4*-Knockout zur Apoptose führt. Durch den Einsatz von LOX-Hemmstoffen konnte der Zelltod verhindert werden (Seiler et al., 2008). Es wurde die These aufgestellt, dass in *Gpx4*-defizienten embryonalen Fibroblasten der Zelltod durch eine *Alox15*-ausgelöste Lipidperoxidation hervorgerufen wird (Seiler et al., 2008). Um in-vivo zu überprüfen, inwiefern eine *Alox15*-Defizienz die embryonale Letalität der homozygoten *U46A Gpx4*-Embryonen verhindern kann, wurden Mäuse gezüchtet, die sowohl einen enzymatischen Knockin der *Gpx4* als auch einen Knockout der *Alox15* besitzen. Unter Verwendung unseres Knockin-Modells konnten wir diese Arbeitshypothese nicht bestätigen. Durch einen zusätzlichen homozygoten Knockout der *Alox15* wird die embryonale Letalität von homozygoten enzymatisch inaktiven *Gpx4*-Knockin-Embryonen weder verhindert noch der Zeitpunkt verschoben. Die molekulare Basis für die zumindest zum Teil widersprüchlichen experimentellen Befunde, die in den In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen erhalten wurden, müssen in der Zukunft näher untersucht werden. Die funktionelle Inaktivierung der *Alox15* durch Hemmstoffe kann zwar in-vitro die Apoptose verhindern, trotzdem ist der genetisch Knockout der *Alox15* nicht in der Lage, die Letalität *Gpx4*-defizienter

Embryonen zu verhindern. Bei der Diskussion dieser Daten muss darauf hingewiesen werden, dass eine Hochregulation der Apoptose, falls diese in-vivo vorkommen sollte, nicht notwendigerweise zur embryonalen Letalität führen muss. Im Gegenteil, die Apoptose nicht benötigter Zellen stellt einen normalen Vorgang im Rahmen der Embryogenese dar und eine Hemmung dieses Prozesses kann zum Tod der Embryonen führen (Armstrong et al., 1995).

Die Interpretation experimenteller Daten, die unter Verwendung von Lox-Inhibitoren erhalten wurden, ist problematisch und folgende Punkte müssen dabei beachtet werden: Bisher gibt es keine kommerziell verfügbaren Hemmstoffe, für die ihre Isoformspezifität überzeugend nachgewiesen wurde. Sendobry et al. (1997) sprachen von PD146176 als einem spezifischen Alox15-Inhibitor. In der Tat konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass PD146176 die gereinigte ALOX15 des Kaninchens in μM -Konzentrationen hemmt. Auf der anderen Seite nutzten sie Zelllysate natürlicher Zellen (Leukozyten, Thrombozyten), um die Wirkung auf die ALOX15 und ALOX5 zu testen. Ein solcher Vergleich, der auf der Wirkung der Substanzen in unterschiedlichen Testsystemen basiert, ist aus verschiedenen Gründen problematisch. In einer kürzlich erschienen Studie wurden alle Lox-Isoformen der Ratte in einer Zelllinie überexprimiert (Gregus et al., 2013). An diesen Zellen testeten die Autoren die gebräuchlichsten Lox-Inhibitoren. Dabei zeigte sich, dass die untersuchten Inhibitoren nur eine geringe Isoformspezifität besitzen. PD146176 zeigte überraschenderweise keinerlei Hemmung der Ratten-Alox15. Warum Alox15-Inhibitoren in verschiedenen Spezies unterschiedlich wirken, muss noch herausgefunden werden. Ein möglicher Ansatz könnte die unterschiedliche Reaktionsspezifität orthologer Enzyme in verschiedenen Spezies sein. Konkret müsste überprüft werden, inwiefern PD146176 auch ein Inhibitor der Alox15 bei der Maus ist. Ein Rückschluss von Mensch auf Maus oder umgekehrt ist für die Alox15 nicht ohne weiteres möglich.

Ein weiteres Problem beim Einsatz von Lox-Hemmstoffen ist, dass die meisten dieser Substanzen hinsichtlich ihres globalen Wirkspektrums noch nicht hinreichend charakterisiert sind. Sie könnten zusätzliche Aktivitäten aufweisen (z.B. antioxidative Funktionen), die noch unbekannt sind. Weiterhin ist es für die Interpretation von Hemmstoffdaten unerlässlich, die Wirkung der Substanzen als Lox-Hemmstoffe in den konkreten experimentellen Systemen zu zeigen. So sollte bei Verwendung eines

Hemmstoffs unbedingt gezeigt werden, dass dieser in dem verwendeten experimentellen System die Lox auch wirklich hemmt.

Zusammenfassend lässt sich zur Verwendung von Lox-Hemmstoffen sagen, dass diese zwar ein wichtiges Werkzeug bei der Untersuchung mechanistischer Zusammenhänge darstellen. Trotzdem sollten die aus Hemmstoffversuchen gezogenen Schlussfolgerungen durch die Anwendung alternativer loss of function-Strategien (genetisches Expressionssilencing) bestätigt werden. Pharmakologische (Hemmstoffexperimente) und genetische (Expressionssilencing) Interventionsstudien stellen dabei eine Einheit dar, wobei beide Strategien Vor- und Nachteile aufweisen. Eine Kombination beider Strategien führt zu den verlässlichsten Schlussfolgerungen.

5.4 Bedeutung der Gpx4 in der Fertilität

Durch heterozygote Expression einer katalytisch inaktiven Gpx4 kommt es zu einer Subfertilität der Männchen. Diese äußert sich in einer verminderten Anzahl an Nachkommen und in der reduzierten Rate von schwangeren Weibchen. Zu Beginn meiner Forschungsarbeiten waren eine Reihe von *Gpx4*-Knockout-Modellen bekannt, bei denen es durch gezielte Inaktivierung des *Gpx4*-Gens zu Unterdrückung der Expression der Gpx4 kam. Homozygote Keimbahn-Knockouts waren nicht lebensfähig (Imai et al., 2003; Yant et al., 2003). Heterozygote Keimbahn-Knockouts waren lebensfähig, entwickelten sich normal und zeigten keine Probleme bei der Reproduktion (Imai et al., 2003; Yant et al., 2003). Heterozygote männliche Infertilität wurde für spermien-spezifische *Gpx4*-Knockout-Mäuse beschrieben (Imai et al., 2009; Schneider et al., 2009). Dabei konnte eine Reduktion der Spermienzahl und des Aktivitätszustandes der Spermien beobachtet werden (Imai et al., 2009). Bei einer Oligoasthenozoospermie beim Menschen wird bei etwa 10% der Patienten eine verminderte Expression der Gpx4 beobachtet (Imai et al., 2001). In heterozygoten Knockin-Mäusen, bei denen ein *Gpx4*-Allel durch ein Konstrukt ersetzt wurde, welches für ein katalytisch inaktives Enzym kodiert (*U46S Gpx4*), kommt es zu einer Subfertilität, die sich unter anderem in einer reduzierten Anzahl schwangerer Weibchen manifestierte (Ingold et al., 2015). Diese Subfertilität konnte durch die im Rahmen meiner Arbeit durchgeführten Versuche in einem ähnlichen Knockin-Modell bestätigt und erweitert werden.

Im Rahmen meiner Experimente ergab sich, dass es sich ausschließlich um eine männliche Subfertilität handelt und dass heterozygote *Gpx4*-Knockin-Weibchen eine ähnliche Fertilität aufweisen wie Wildtypweibchen aus dem gleichen Wurf.

5.4.1 Unterschiede zwischen einer enzymatischen Inaktivierung der *Gpx4* durch Alanin und Serin

Nachdem durch konventionelle Keimbahn-Knockouts gezeigt werden konnte, dass homozygote *Gpx4*-defiziente Mäuse nicht lebensfähig sind, sondern intrauterin absterben (Garry et al., 2008; Imai et al., 2003; Yant et al., 2003), ergab sich die Frage, ob die embryonale Letalität auf das Fehlen der katalytischen Aktivität der *Gpx4* oder auf das Fehlen der *Gpx4* als Strukturprotein zurückzuführen ist. Um diese Frage zu beantworten, wurden in den letzten Jahren unabhängig voneinander zwei ähnliche Knockin-Modelle entwickelt, bei denen das *Gpx4*-Gen durch ein Konstrukt ersetzt wurde, dessen Expression zu einer katalytisch inaktiven *Gpx4* führt.

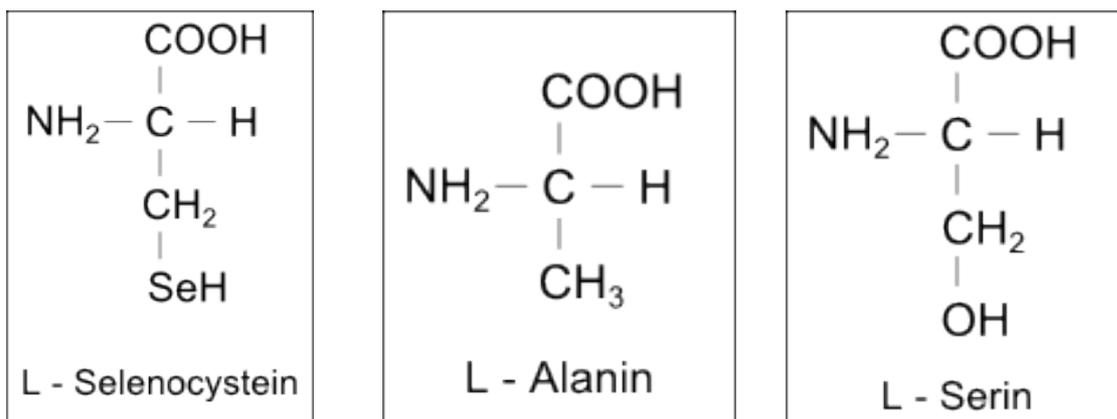


Abbildung 5-1: Gegenüberstellung der Aminosäuren

Abgebildet sind die drei Aminosäuren in der biologisch wichtigeren L-Konfiguration (modifiziert nach dem Ernährungswörterbuch⁵)

Die erste Veröffentlichung zu diesem Thema, die im Dezember 2014 im Internet publiziert wurde, zeigte, dass homozygote Träger des Knockin-Allels (*U46A*-Mutante) nicht lebensfähig waren, sondern zwischen E 6.5 - 7.5 abstarben (Brusch et al., 2015). Kurz danach (April 2015) wurde eine zweite Variante (*U46S*) der enzymatischen Inaktivierung der *Gpx4* veröffentlicht (Ingold et al., 2015). In dieser Arbeit wurde die

⁵ Ernährungswörterbuch. Recherchedatum 1.11.2015, Institut für Ernährungsinformation

embryonale Letalität der Knockin-Mäuse bestätigt und gleichzeitig darüber berichtet, dass heterozygote Merkmalsträger eine reduzierte Fertilität aufweisen. Diese wurde auf morphologische Veränderungen in den Spermien zurückgeführt. Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte *Gpx4*-Knockin-Maus enthält ein Alanin (A) anstelle des katalytisch aktiven Selenocysteins (U). Der Austausch des Selenocysteins gegen ein Serin (S) ist von den Aminosäureeigenschaften her gesehen konservativer als die *U46A*-Mutation, da hier lediglich ein Sauerstoff durch ein Selen ersetzt wird. Beim *U46A*-Austausch wird die gesamte funktionelle Gruppe SeH eliminiert. Andererseits enthält das eingefügte Serin eine OH-Gruppe, die prinzipiell zum Aldehyd bzw. zur Carbonsäure oxidierbar ist. Damit könnte die *U46S*-Mutante noch katalytische Restaktivität besitzen. Bisher liegen keine Aktivitätsmessungen zur *U46S*-Mutante vor. Für die *U46A*-Mutante konnten Scheerer et al. (2007) zeigen, dass es bei einem Austausch des Selenocysteins durch ein Alanin zur kompletten Inaktivierung der *Gpx4* kommt. Aus diesem Grunde wählten wir für eine enzymatische Inaktivierung der *Gpx4* die *U46A*-Mutation.

5.5 Bedeutung der *Gpx4* in der Spermatogenese

In Spermien ist die *Gpx4* als polymerisiertes Protein im Mittelstück der Zellen zu finden (Ursini et al., 1999). Hier ist es an der Bildung der mitochondrialen Kapsel beteiligt, das die Mitochondrien innerhalb des Mittelstücks arretiert und dadurch in einer bestimmten Position festhält. Durch eine enzymatisch inaktive *Gpx4* (*U46S*) kommt es zur fehlerhaften Ausbildung der Mitochondrienkapsel im Mittelstück der Spermien (Ingold et al., 2015). In unserem Mausmodell (*U46A Gpx4*) wurden diese Beobachtungen bestätigt. Die fehlerhaft angeordneten Mitochondrien und die Vakuolen in den Mitochondrien wurden auch bei anderen Knockout-Modellen festgestellt. So kann zum Beispiel eine selen-defiziente Ernährung zu männlicher Infertilität beitragen, was unter anderem dadurch deutlich wird, dass falsch angeordnete und entrundete Mitochondrien im Mittelstück der Spermien zu finden sind (Abbildung 5-2 E). Die dabei beobachteten Auffälligkeiten sind zwar nicht so deutlich und schwerwiegend wie bei einem heterozygoten *U46A Gpx4*^{-/+}-Knockin. Trotzdem sind die Ähnlichkeiten deutlich zu erkennen.

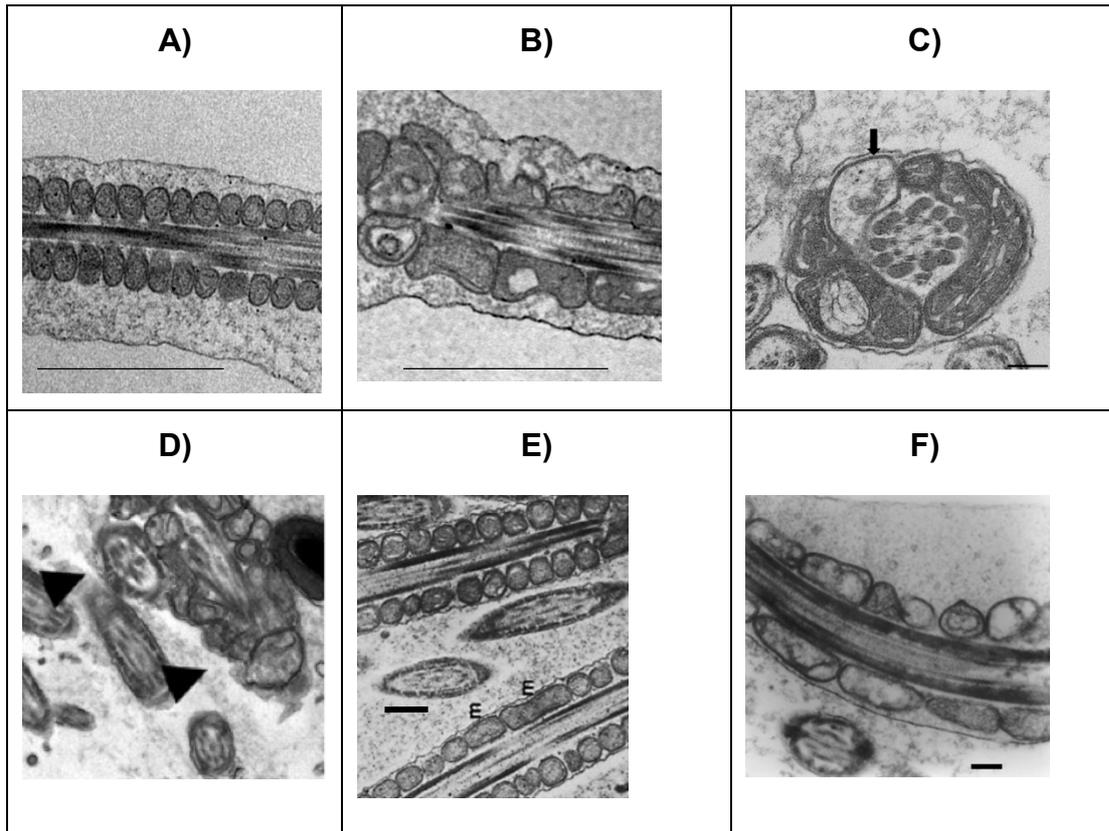


Abbildung 5-2: Darstellung der morphologischen Auffälligkeiten im Mittelstück der Spermien mit dem Elektronenmikroskop

(A) Brutsch et al. (2015): Caudaspermium im Längsschnitt einer Wildtypmaus (*U46A Gpx4^{-/-}*), Maßstab: 2 μm

(B) Brutsch et al. (2015): Caudaspermium im Längsschnitt einer heterozygoten enzymatisch inaktiven *Gpx4*-Knockin-Maus (*U46A Gpx4^{+/-}*), Maßstab 2 μm

(C) Ingold et al. (2015): Caudaspermium im Querschnitt einer heterozygoten enzymatisch inaktiven *Gpx4*-Knockin-Maus, Maßstab: 200 nm

(D) (Schneider et al., 2009): epididymales Spermium im Längsschnitt von *mGpx4*-Knockout-Mäusen. Pfeile weisen auf irreguläre Mitochondrien, Maßstab: nicht angegeben

(E) Wallace et al. (1983): Längsschnitt eines Spermiums (Maus: erste Generation selenodefizient ernährt), Maßstab: 1 μm . E = auffällige Mitochondrien

(F) Imai et al. (2001): Längsschnitt eines humanen Spermiums eines infertilen Mannes mit gestörten *Gpx4*-Expression, Maßstab: 13nm

Zur milderen Ausprägung der Spermienveränderungen könnte die hohe Stellung der *Gpx4* in der Hierarchie der Selenoproteine beitragen (Behne et al., 1988; Behne et al., 2001; K. E. Hill et al., 1992). Anhand der Immunogoldfärbung haben wir eine vergleichbare Verteilung der *Gpx4* in den Spermien sowohl bei Wildtyp-Mäusen (*U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*) als auch in den *Gpx4*-Knockin-Tieren (*U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{+/+}*) gefunden. Zudem wurden keine Unterschiede zwischen Spermien aus Caput und Cauda festgestellt. Das Vorhandensein der *Gpx4* in Nukleus und Mitochondrien was schon bekannt (Behne et al., 1988; Pushpa-Rekha et al., 1995).

Zusätzlich konnten wir die Gpx4 im Plasmotropfen zeigen. Frühere experimentelle Ergebnisse haben gezeigt, dass in diesen temporären Zellorganellen auch die Alox15 enthalten ist (K. A. Fischer et al., 2005).

5.5.1 Bedeutung der Gpx4 in der Fertilität und Motilität der Spermien

Die Motilität der Spermien hängt von der Konzentration der ROS ab und ein Ungleichgewicht im Oxidationsstatus beeinträchtigt die Motilität (Aitken, 1995; Griveau et al., 1994). Sowohl Gpx4 als auch die Alox15 sind Enzyme, die eine wichtige Rolle für den Redox-Status der Zellen spielen (Brigelius-Flohe et al., 2013).

In verschiedenen murinen Knockout-Modellen der *Gpx4* und bei Studien mit infertilen Männern, deren Infertilität auf einen Defekt des *Gpx4*-Gens zurückzuführen war, wurden verminderte Motilitäten der Spermien nachgewiesen (Imai et al., 2009; Imai et al., 2001; Schneider et al., 2009). Diesen Zusammenhang konnten wir bei unseren heterozygoten Knockin-Mäusen (*U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*) bestätigen. Obwohl die strukturellen Veränderungen, die sich als Folge der heterozygoten Expression der katalytisch inaktiven Gpx4 ergaben, sich im Verlauf der Nebenhodenpassage nicht veränderten, verbesserte sich die Motilität der Spermien. Frühere Ergebnisse zur Fluidität und zur Lipidzusammensetzung der Spermienmembranen deuteten darauf hin, dass sich die Membraneigenschaften im Verlauf der Nebenhodenpassage veränderten (Kawano et al., 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Oxygenierungsgrad der Membranlipide verschiedener Spermientypen (Wildtyp vs. Knockin, Caput vs. Cauda) untersucht. Hierbei konnten keine signifikanten Differenzen festgestellt werden. So wirkt sich weder die selektive Defizienz der *Gpx4* noch die selektive Defizienz der *Alox15* auf den Oxygenierungsgrad der Membranlipide aus. Auch die kombinierte Defizienz von *Gpx4* und *Alox15* induzierte keine Veränderungen im Oxygenierungsgrad der Membranlipide (Abbildung 4-21). Damit lässt sich die veränderte Spermienmotilität nicht auf eine Veränderung des Oxygenierungsgrad der Membranlipide zurückführen. Die Motilitätssteigerung der Spermien, die bei normalen Mäusen während der Nebenhodenpassage beobachtet wird, scheint bei den heterozygoten Knockin-Mäusen (*U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*) auszubleiben. Es scheint so, als wäre die epididymale Reifung der Spermien durch den *U46A Gpx4*-Knockin arretiert, auch wenn es keine Unterschiede in den Membranlipiden gibt. Eine mögliche Erklärung der verminderten Motilität könnte in den veränderten Mitochondrien liegen. Durch die morphologischen

Veränderungen könnte die oxidative Phosphorylierung gestört sein. Dies wäre eine mögliche Erklärung, wenn ATP die Hauptenergiequelle für die Motilität der Spermien darstellt. Bisher wurde die Atmungskette als Hauptproduzent der ROS in Spermien beschrieben (Koppers et al., 2008). Zudem konnte bei einem induzierbaren systemischen Knockout der *Gpx4* eine verminderte Aktivität der Komplexe I und III in der Leber nachgewiesen werden (Yoo et al., 2012). Es ist allerdings noch nicht abschließend geklärt, ob ATP oder die anaerobe Glykolyse die Hauptenergiequelle für die Motilität der Spermien liefert (Ford, 2006). Es wäre daher sinnvoll, die morphologisch veränderten Mitochondrien der *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{+/+}*-Spermien auf deren Funktion hin zu überprüfen.

Neben der verminderten Motilität kommt es auch zu einer verminderten Schwangerschaftsrate. Diese könnte einerseits durch eine verminderte Motilität oder eine gestörte Kapazitation oder Fertilisation zustande kommen. Mit Hilfe der in vitro-Fertilisation könnte die Befruchtungsfähigkeit der Spermien untersucht werden. Bei anderen *Gpx4*-Knockout-Modellen wurden bereits Hinweise gefunden, dass eine *Gpx4*-Defizienz diese beeinflusst (Imai et al., 2009; Ingold et al., 2015). Auf der anderen Seite könnte die verminderte Rate der schwangeren Weibchen auch durch eine veränderte Kopulationsrate zustande kommen. Einerseits könnte die *Gpx4* einen Einfluss auf die Sexualhormone haben. Roveri et al. (1992) diskutierten die *Gpx4* im Zusammenhang mit Gonadotropin, einem Hormon, das die Keimzellen stimuliert. Daher könnte eine Analyse der Hormone weitere Hinweise in diese Richtung liefern. Die Kopulationsrate und das Paarungsverhalten, als Indikator für den Sexualtrieb der Tiere an sich, könnte video-dokumentiert analysiert werden (Hull et al., 2007).

Zusammenfassend kann man sagen, dass es durch eine *Gpx4*-Defizienz zu einer geringeren Motilität, veränderten Mitochondrien in den Mittelstücken und zu einer Subfertilität kommt. Es bleibt zu klären in wie fern die Motilität, die Morphologie der Mitochondrien im Mittelstück und die verminderte Fertilität zusammenhängen.

5.6 Bedeutung der antagonisierenden Enzyme *Gpx4* und *Alox15* in der Spermatogenese und Fertilität

Durch einen enzymatischen heterozygoten Knockin der *Gpx4* kommt es zu morphologischen Veränderungen im Mittelstück der Spermien (siehe 4.7.2). Die *Alox15* wird als Antagonist der *Gpx4* im Peroxidstoffwechsel von Lipiden betrachtet (Brigelius-

Flohe, 1999; Brigelius-Flohe et al., 2013) und jüngere Untersuchungen mit Lox-Hemmstoffen scheinen diese Hypothese in verschiedenen In-vitro- und Ex-vivo-Systemen zu bestätigen (Friedmann Angeli et al., 2014; Seiler et al., 2008). Wir konnten zeigen, dass ein homozygoter Knockout der *Alox15* die embryonale Letalität der *U46A Gpx4^{+/-}*-Embryonen in-vivo nicht verhindern kann. Daraus muss gefolgert werden, dass ein homozygoter Knockout des *Alox15*-Gens die funktionellen Defekte, die mit der Expression einer inaktiven Gpx4 verbunden sind, nicht kompensieren kann. Entweder sind die Defekte, welche die Expression einer inaktiven Gpx4 induziert, zu stark um durch den *Alox15*-Knockout aufgehoben zu werden oder die embryonalen Defekte sind unabhängig von Peroxidstoffwechsel.

K. Moore et al. (2010) konnten zeigen, dass es bei *Alox15^{-/-}*-Mäusen zu einer vermehrten Retention des Plasmotropfens während der Spermatogenese kommt. Diese vermehrte Retention wurde als Zeichen einer verzögerten Spermienreifung interpretiert und sie geht einher mit einer Subfertilität der männlichen Mäuse (K. Moore et al., 2010; Rodriguez et al., 2007). In unseren Untersuchungen zur Motilität der Spermien von *Alox15*-defizienten Mäusen konnten wir keine Anhaltspunkte für eine verminderte Beweglichkeit der Spermien erhalten. Im Gegenteil, durch den Knockout des *Alox15*-Gens scheint eine transiente Motilitätssteigerung der Caputspermien induziert zu werden (*U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{-/-}*). Der Motilitätsanstieg geht aber im Verlaufe der epididymalen Spermienreifung wieder verloren, da keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp-Spermien (*U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*) und Knockout-Spermien (*U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{-/-}*) mehr bestehen, wenn die Zellen aus der Cauda des Nebenhodens extrahiert wurden. Durch eine exogene Zufuhr von ATP als auch durch eine cAMP-Steigerung können Epididymis-Spermien motiler gemacht werden. (Esposito et al., 2004; Vadnais et al., 2013). Zudem kommt es durch eine Veränderung der Lipidzusammensetzung der Membran zu einer natürlichen Steigerung der Motilität der Spermien in der Nebenhodenpassage (Kawano et al., 2011). Der Mechanismus, durch den es bei einem Knockout der *Alox15* zu einer erhöhten Motilität der Caputspermien kommt, ist aus unseren Daten nicht zu erfassen.

Die beschriebene Subfertilität der *U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{+/-}*-Männchen, die durch die Anzahl der Nachkommen, die Anzahl der schwangeren Weibchen sowie durch die verminderte Motilität der Cauda-Spermien gezeigt wurde, verbessert sich durch das

zusätzliche Ausschalten des *Alox15*-Gens. Dieses Ergebnis ist aus folgenden Gründen bemerkenswert:

i) Es wurde gezeigt, dass ein alleiniges Ausschalten der *Alox15* zu einer Subfertilität führt (K. Moore et al., 2010). Die Autoren folgerten, dass dies durch ein vermehrtes Vorkommen des Plasmotropfens in *Alox15*^{-/-}-Spermien möglich wäre. Zudem zeigten sie, dass in dem Plasmotropfen die Organellen noch vorhanden sind. Durch einen *Alox15*^{-/-}-Knockout kommt es bei normaler Spermatogenese zu einer fehlerhaften Spermio-genese im Testis, die sich in den vermehrt zurückbleibenden Plasmotropfen äußert. Die Subfertilität durch eine *Alox15*-Defizienz konnten wir bei unseren *U46A Gpx4*^{-/-}+*Alox15*^{-/-}-Mäusen bestätigen (siehe 4.5). Damit kann geschlussfolgert werden, dass der Knockout des *Alox15*-Gens in einem genetischen Wildtyp-Background die männliche Fertilität beeinträchtigt.

ii) Im Gegensatz dazu induziert der *Alox15*-Knockout in einem *Gpx4*-defizienten genetischen Hintergrund eine Erhöhung der Spermienmotilität und gleicht die verminderte Motilität, die durch heterozygote Expression einer katalytisch inaktiven *Gpx4*-Variante induziert worden ist, wieder der Wildtypmotilität an. Es kommt zu einer Wiederherstellung der verminderten Fertilität und zu einer Erhöhung der Spermien-Motilität. Bei der Motilität kommt es nicht nur zu einem Ausgleich, sondern zu einer Steigerung der totalen Motilität in den Cauda-Spermien der *U46A Gpx4*^{+/-}+*Alox15*^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen (*U46A Gpx4*^{-/-}+*Alox15*^{+/+}). Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass die funktionellen Defizite, die eine heterozygote Expression der katalytisch inaktiven *Gpx4* induziert, durch einen *Alox15*-Knockout ausgeglichen, ja sogar überkompensiert werden können. Dies trifft jedoch nicht in vollem Umfang auf die morphologischen Veränderungen zu. Hier gibt es deutliche inter-individuelle Unterschiede. Bei zwei der sieben untersuchten Tiere konnte der *Alox15*-Knockout die morphologischen Veränderungen vollständig ausgleichen. Die Spermien dieser Tiere waren nicht von Spermien zu unterscheiden, die aus Wildtypmäusen (zwei Wildtyp-Allele in beiden Genloci) isoliert wurden. Im Gegensatz dazu konnten bei den Spermien von fünf *U46A Gpx4*^{+/-}+*Alox15*^{-/-}-Mäuse keine signifikanten morphologischen Unterschiede zu *U46A Gpx4*^{+/-}+*Alox15*^{+/+}-Spermien beobachtet werden.

Diese Daten deuten darauf hin, dass die beobachteten morphologischen Veränderungen nicht linear mit der Motilität der Spermien zusammenhängen. Während

sich die Motilität bei *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*-Spermien verbesserte, kam es nicht bei allen Mäusen zu einer Besserung der Morphologie im Mittelstück. Wenn die *Alox15* zusätzlich zur heterozygoten *Gpx4*-Defizienz ausgeschaltet wird, kommt es trotz Mittelstückdefekten zu einer Verbesserung der Motilität. Eine mögliche Erklärung dieses Widerspruchs könnte darin bestehen, dass bei *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*-Mäusen keine *Alox15*-abhängigen Lipidhydroperoxide gebildet werden können. Beim Menschen besteht eine Korrelation zwischen einer erhöhten Lipidperoxidation in Spermien und einer Abnahme der initialen Motilität und andererseits zum Vorhandensein von Mittelstückdefekten (Rao et al., 1989). Allerdings haben wir keinen Anhaltspunkt dafür gefunden, dass bei *Alox15*-defizienten Mäusen die Spermien einer geringeren oxidativen Belastung ausgesetzt sind.

Tabelle 5-1: Auswirkungen der verschiedenen Genveränderungen

Die Änderungen der *U46A Gpx4^{-/+}*-Maus sind in Relation zum Wildtyp (*U46A Gpx4^{-/-}*) beschrieben. Die Angaben der *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*-Maus sind in Relation zur *U46A Gpx4^{-/+}*-Maus zu sehen. Die der *Alox15^{-/-}*-Maus sind auf den Wildtyp (*Alox15^{+/+}*) bezogen.

Ausnahme: Anzahl der schwangeren Weibchen → Es werden nur *U46A Gpx4^{-/+}*- und *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}* miteinander verglichen

(xx = Daten nicht vorhanden)

	homozygot embryonal letal	Fertilität (Anzahl der Nachkommen)	Fertilität (Anzahl der schwangeren Weibchen)	Motilität	Auffälligkeiten Spermienmittelstück	Testisgewicht
<i>U46A Gpx4^{-/-}</i>	nein	→	xx	→	Keine	→
<i>U46A Gpx4^{-/+}</i>	Ja (E 6.5-7.5)	↓	↓	↓	immer	→
<i>U46A Gpx4^{-/+} zusätzlich Alox15^{-/-}</i>	Ja (E 6.5-7.5)	↑	↑	↑	Keine oder immer	↑
<i>Alox 15^{-/-}</i>	nein	↓	xx	↓	xx	↑
<i>Alox 15^{+/+}</i>	nein	→	xx	→	xx	→

Bei In-vitro-Versuchen konnte gezeigt werden, dass Lox-Isoformen einen Einfluss auf die Testosteronproduktion haben (Mele et al., 1997), wobei weder der Mechanismus noch die beteiligten Isoformen bisher bekannt sind (Ivanov et al., 2015).

Wir konnten zeigen, dass *Alox15*^{-/-}-Mäuse unabhängig vom *Gpx4*-Genotyp ein vergrößertes Testisgewicht aufweisen. Trotzdem zeigten sich weder Unterschiede in der Effektivität der Spermatogenese noch in der Spermienzahl. *Alox15*^{-/-}-Männchen haben weder relativ noch absolut gesehen eine erhöhte testikuläre Spermienzahl. Weiterhin sind bei der histologischen Untersuchung des Testis keine Unterschiede aufgefallen. Damit bleiben die molekularen Ursachen der Testisvergrößerung weiterhin unklar. Sie könnte auf ein Testisödem zurückzuführen sein, was durch die Bestimmung des Trockengewichtes relativ einfach abgeklärt werden könnte. Allerdings ergäbe sich in diesem Fall die Frage, warum *Alox15*-defiziente Mäuse ein Testisödem entwickeln sollten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es durch ein zusätzliches Defizit der *Alox15* bei enzymatisch inaktiver *Gpx4* zu einer Umkehr einiger aber nicht aller Veränderungen kommt (siehe Tabelle 5-1). Der zusätzliche Knockout der *Alox15* kann die Motilität und die Fertilität wieder normalisieren. Allerdings ist es nicht möglich, die morphologischen Unterschiede im Mittelstück konsistent rückgängig zu machen.

5.7 Limitationen der Arbeit

5.7.1 Allgemeine Limitationen

In der vorliegenden Arbeit wird das Zusammenspiel von Enzymen des oxidativen Lipidstoffwechsels bei Embryogenese und Spermatogenese untersucht. Es handelt sich dabei um einen Vergleich von verschiedenen gewählten Parametern (homozygote Letalität, Anzahl der Nachkommen, Organgewichtvergleich, Effektivität der Spermatogenese, Motilität der Spermien) in vier verschiedenen gentechnisch veränderten Mausstämmen, bei denen zwei Genloci selektiv verändert wurden (*U46A Gpx4*^{-/-}+*Alox15*^{+/+}, *U46A Gpx4*^{-/+}+*Alox15*^{+/+}, *U46A Gpx4*^{-/-}+*Alox15*^{-/-}, *U46A Gpx4*^{+/+}+*Alox15*^{-/-}). Statistisch gesehen handelt es sich am ehesten um eine explorative Datenanalyse. Das Ziel dabei sollte das allgemeine Erfassen von Unterschieden sein (Behrens, 1997). Daraus ergeben sich Ansätze und Bereiche, die mit gezielteren Fragestellungen tiefergehend bearbeitet werden können. Zusammen mit der geringen Stichprobenzahl, vor allem im zweiten Teil der Arbeit, sollte das als Limitation der Beurteilung der Ergebnisse angesehen werden. Trotz der geringen Stichprobenzahlen ergaben sich häufig hoch signifikante Unterschiede und in der Mehrzahl stehen die erzielten Ergebnisse im Einklang mit denen, die in anderen loss of function-Modellen

erhalten wurden. Diese Übereinstimmung stärkt die Glaubwürdigkeit und Verlässlichkeit der erhaltenen Daten.

5.7.2 Methodenkritik

Wir haben als Modell für die *Alox15*-Defizienz die von Sun et al. (1996) vorgestellten *Alox15*-Knockout-Mäuse genutzt. Diese haben Nachteile, die im Folgenden dargestellt werden sollen. i) Konventionelle Keimbahn-Knockouts sind immer das Resultat eines Selektionsprozesses. Das heißt, murine embryonale Stammzellen werden genetisch manipuliert und Zellen werden ausgewählt, die diese Manipulation überlebt haben. Aus diesen Stammzellen werden dann Tiere gezüchtet. Nicht lebensfähige Stammzellen werden verworfen. Es kann deshalb durchaus sein, dass die selektierten Stammzellen noch andere Veränderungen während der genetischen Manipulation erfahren haben und damit erst lebensfähig wurden. Wir wissen zwar, dass unsere *Alox15*-Knockout-Mäuse keine *Alox15* mehr exprimieren, was oder ob etwas anderes in ihrem Genom verändert ist, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen. ii) Wir kennen nicht wirklich den genetischen Background der *Alox15*-Knockout-Mäuse. Es gibt viele verschiedene Mausstämme und alle haben einen unterschiedlichen genetischen Background. Die genetischen Manipulationen wurden an C57BL/6 x 129/svEv-Stammzellen durchgeführt und die Mäuse wurden dann sieben Mal mit Wildtyp-Black6-Mäusen (C57BL/6N) rückgekreuzt. Dadurch sollte sich ein homogener Black6-Background ergeben haben. Wir wissen aber nicht mit Sicherheit, wie viel des ursprünglichen genetischen Hintergrunds der Stammzellen noch in unseren Mäusen steckt.

Die Präparation von Embryonen, welche frühe Stadien der Individualentwicklung repräsentieren, ist schwierig. Für die Genotypisierung muss darauf geachtet werden, dass die Embryonen kein mütterliches Gewebe mehr umgibt. Das ist vor allem bei Embryonen problematisch, die weniger als sieben Tage alt sind. Bei älteren Embryonen, die sich im Stadium der Resorption befinden, sind ähnliche Probleme zu beobachten. Die Weibchen bei den Letalitätsexperimenten waren heterozygot. In den PCR-Ergebnissen wurden sowohl Wildtypen als auch homozygote Embryonen genotypisiert. Durch eindeutige singuläre Banden konnte sichergestellt werden, dass sauber präpariert wurde. Hätte es bei den Würfen nur heterozygote Embryonen gegeben, wäre eine Verunreinigung mit mütterlichem Gewebe sehr wahrscheinlich

gewesen. Durch die geringen Gewebemengen, die ein Embryo an E 6.5 oder unter Resorption liefert, wurde zum Teil die Nachweisgrenze der PCR erreicht. Die Banden im Gel waren nur sehr schwach zu sehen. Durch eine geringere Menge an Ethidiumbromid im Gel oder eine Erhöhung der PCR-Zyklen konnten Grenzfälle eindeutig dargestellt werden.

Bei einem Vergleich der Mediane des Körpergewichts der Mäuse gab es keine Unterschiede. Allerdings variierten diese zwischen 22 und 39 g. Auch das Testisgewicht rangierte zwischen 0,06 und 0,14 g. Um ausschließen zu können, dass das erhöhte Organgewicht nur ein Effekt auf Grund des erhöhten Gesamtgewichts ist, wurde das Organgewicht auf das Körpergewicht bezogen. Durch die Angabe von einem relativen Organgewicht konnten individuelle Schwankungen, verursacht durch die unterschiedliche Größe der Mäuse, herausgerechnet werden.

Die Einschätzung der morphologischen Veränderungen basiert unter anderem auf Zellzählungen. Diese Methodik ist subjektiv und hängt wesentlich von der Erfahrung des Betrachters ab. Durch das Einführen eines graduellen Systems wurde versucht, der Einschätzung der Veränderungen im Mittelstück der Spermien mehr Objektivität zu verleihen. Zudem wurden die Zählungen einfach blind durchgeführt. Das heißt, dass die Objektträger ohne Kenntnis des Genotyps ausgezählt wurden. Auf Grund der ausgeprägten morphologischen Unterschiede war der Genotyp im *Gpx4*-Genlocus trotzdem eindeutig zu identifizieren. Durch die Auswahl von zehn zufällig ausgewählten Abschnitten der Objektträger wurde versucht, einen möglichst allgemeinen Eindruck zu bekommen. Trotz dieser Maßnahmen lässt sich die Subjektivität morphometrischer Messungen nicht komplett verhindern.

In den Untersuchungen der Spermien der *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*-Mäuse wurden zwei Individuen mit Mittelstücken wie bei einem *Gpx4*-Wildtypgenlocus (*U46A Gpx4^{-/-}*) gefunden. Zur Bestätigung des *Gpx4*-Genotyps der Mäuse wurde eine zweite Genotypisierung mittels PCR durchgeführt.

5.8 Ausblick

Der Literatur ist zu entnehmen, dass *U46A Gpx4^{-/+}+Alox15^{-/-}*-Mäuse subfertil sind, was an der geringeren Wurfgröße und der verminderten Schwangerschaftssequenz abgelesen wurde. In unseren Experimenten haben wir

funktionelle Spermindaten wie Motilitäten, Vitalitätsfärbungen und Effektivität der Meiose, die diese Hypothese bestätigten. Leider konnten wir aus Zeitmangel diese Spermien keiner detaillierten morphologischen Untersuchung unterziehen. In weiteren Experimenten sollten die Mittelstücke der *U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{-/-}*-Spermien nach dem hier entwickelten Bewertungsschema beurteilt werden. Eine mögliche Retention der Plasmotropfen der Spermien von *Alox15^{-/-}*- beziehungsweise der *U46A Gpx4^{+/+}+Alox15^{-/-}*-Männchen wurde nicht untersucht. Es wäre sicherlich spannend zu überprüfen, ob dieses Phänomen, das K. Moore et al. (2010) beschrieb, auch in den hier untersuchten Mausstämmen auftritt.

Während der Forschungsarbeit wurde der Schwerpunkt auf die Auswirkungen der *Gpx4* auf die männliche Maus und die Spermien gelegt. Kreuzt man heterozygote *Gpx4*-Knockin-Weibchen (*U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{+/+}*) mit einem Wildtyp-Männchen (*U46A Gpx4^{-/-}+Alox15^{+/+}*) ergibt sich eine normale Anzahl der Nachkommen. Allerdings haben wir bei diesen Untersuchungen nicht die Schwangerschaftsfrequenz der Weibchen quantifiziert. Um einen Gesamteindruck der Veränderungen des enzymatischen *Gpx4*-Knockins zu gewinnen, sollten aber auch die Auswirkungen auf das Weibchen untersucht werden. Ein möglicher Ansatz wäre die verminderte Anzahl an Schwangerschaften bei terminierter Verpaarung (Schwangerschaftsfrequenz), die bisher noch nicht quantifiziert wurde. Weiterhin bleibt ungeklärt, ob sich das Paarungsverhalten der *Gpx4*-defizienten Mäuse von dem der Wildtypkontrollen unterscheidet. Um diese Frage zu beantworten, müsste das Paarungsverhalten videodokumentiert und Hormonanalysen gemacht werden.

Über welchen molekularen Mechanismus die *U46A Gpx4^{+/-}+Alox15^{-/-}*-Mäuse entweder normale oder die veränderten Mittelstücke bekommen und wie sich diese morphologischen Veränderungen auf die Funktion der Mitochondrien auswirken, ist in weiterführenden Experimenten zu untersuchen. Wie unsere Ultrastrukturuntersuchungen belegen, zeigen die Mitochondrien morphologische Veränderungen, die sich auf ihre Funktion auswirken könnten. Deshalb sollten in der Zukunft Untersuchungen durchgeführt werden, die den Funktionszustand der Zellatmung (Atmungskapazität, Kopplungszustand) und der oxidativen Phosphorylierung einschätzen. Obwohl bislang noch nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob Glykolyse oder oxidative Phosphorylierung die Hauptenergiequelle für

Spermien darstellen, deuten die veränderten Mitochondrien auf Defizite im Energiestoffwechsel der Zellen hin.

Bisher gibt es wenig Literatur über die Auswirkungen eines homozygoten Knockouts der *Alox15* auf die Spermatogenese, die Fertilität und die Gonaden. Wir konnten zeigen, dass die *Alox15* einen Einfluss sowohl auf die Fertilität, die Spermienmotilität und die Hodengewichte zu haben scheint. Ein homozygoter Knockout der *Alox15* könnte damit auch bei der Regulation des Hormonhaushalts eine Rolle spielen. Deshalb sollten ausgewählte Hormone im Blut von *Alox15*-defizienten Mäusen mit denen von Kontrolltieren verglichen werden. Vorläufige Untersuchungen zum Testosteronspiegel haben bislang noch keine signifikanten Unterschiede ergeben. Es wäre daher also interessant, durch weitere Untersuchungen Aufschluss über die Rolle der *Alox15* zu bekommen.

5.9 Schlussfolgerung

Der Redoxstatus von Zellen ist ein wichtiges Kriterium der zellulären Funktion, da über die Veränderung des zellulären Redoxgleichgewichts das Muster der Genexpression und damit die Zellfunktionalität verändert werden kann. Lipoxygenasen als pro-oxidative und Glutathionperoxidasen als anti-oxidative Enzyme sind gemeinsam mit anderen enzymatischen und nicht-enzymatischen Prozessen Regulatoren des zellulären Redoxsystems. Wir haben gezeigt, dass die enzymatische Funktion der Gpx4 für die Embryonalentwicklung unerlässlich ist. Zudem kommt es durch eine heterozygote Expression einer katalytisch inaktiven Gpx4 zu einer Subfertilität sowie zu einer verringerten Motilität der Spermien. Ein zusätzlicher homozygoter Knockout der *Alox15* kann die embryonale Letalität nicht verhindern, war aber sehr wohl dazu in der Lage, die verminderte Fertilität der männlichen Tiere und die kompromittierte Spermienmotilität auszugleichen. Daraus man schließen, dass die Gpx4 in der embryonalen Entwicklung eine andere Funktion besitzt als während der Spermatogenese.

6 Literaturverzeichnis

- Adler, I. D. (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. *Mutat Res*, 352(1-2), 169-172. doi: 10.1016/0027-5107(95)00223-5
- Aitken, R. J. (1995). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev*, 7(4), 659-668.
- Arai, M., Imai, H., Sumi, D., Imanaka, T., Takano, T., Chiba, N., & Nakagawa, Y. (1996). Import into mitochondria of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase requires a leader sequence. *Biochem Biophys Res Commun*, 227(2), 433-439. doi: 10.1006/bbrc.1996.1525
- Armstrong, Jane F, Kaufman, Matthew H, Harrison, David J, & Clarke, Alan R. (1995). High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice. *Current Biology*, 5(8), 931-936.
- Arnold, S. J., & Robertson, E. J. (2009). Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(2), 91-103. doi: 10.1038/nrm2618
- Aygun, C., Celik, F. C., Nural, M. S., Azak, E., Kucukoduk, S., Ogur, G., & Incesu, L. (2012). Simplified gyral pattern with cerebellar hypoplasia in Sedaghatian type spondylometaphyseal dysplasia: a clinical report and review of the literature. *Am J Med Genet A*, 158A(6), 1400-1405. doi: 10.1002/ajmg.a.35306
- Behne, D., Hilmert, H., Scheid, S., Gessner, H., & Elger, W. (1988). Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins. *Biochim Biophys Acta*, 966(1), 12-21.
- Behne, D., & Kyriakopoulos, A. (2001). Mammalian selenium-containing proteins. *Annu Rev Nutr*, 21, 453-473. doi: 10.1146/annurev.nutr.21.1.453
- Behrens, John T. (1997). Principles and procedures of exploratory data analysis. *Psychological Methods*, 2(2), 131.
- Belkner, J., Stender, H., & Kuhn, H. (1998). The rabbit 15-lipoxygenase preferentially oxygenates LDL cholesterol esters, and this reaction does not require vitamin E. *J Biol Chem*, 273(36), 23225-23232.
- Belkner, J., Wiesner, R., Kuhn, H., & Lankin, V. Z. (1991). The oxygenation of cholesterol esters by the reticulocyte lipoxygenase. *FEBS Lett*, 279(1), 110-114.
- Bellve, A. R., Cavicchia, J. C., Millette, C. F., O'Brien, D. A., Bhatnagar, Y. M., & Dym, M. (1977). Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol*, 74(1), 68-85.
- Biesalski, Hans-Konrad, Fürst, P, Kasper, H, Kluthe, R, Pölert, W, Puchstein, C, & Stähelin, HB. (2004). *Therapeutic nutrition: according to the nutritional therapy curriculum of the German Medical Association*. S.171ff: Georg Thieme Verlag.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37(8), 911-917.

- Blottner, S., Hingst, O., & Meyer, H. H. (1996). Seasonal spermatogenesis and testosterone production in roe deer (*Capreolus capreolus*). *J Reprod Fertil*, *108*(2), 299-305.
- Blum, M., Gaunt, S. J., Cho, K. W., Steinbeisser, H., Blumberg, B., Bittner, D., & De Robertis, E. M. (1992). Gastrulation in the mouse: the role of the homeobox gene goosecoid. *Cell*, *69*(7), 1097-1106.
- Boeglin, W. E., Kim, R. B., & Brash, A. R. (1998). A 12R-lipoxygenase in human skin: mechanistic evidence, molecular cloning, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(12), 6744-6749.
- Borchert, A., Kuttner, G., Giessmann, E., Wang, C. C., Wessner, H., Volkmer, R., . . . Kuhn, H. (2010). Defining the immunoreactive epitope for the monoclonal anti-human glutathione peroxidase-4 antibody anti-hGPx4 Mab63-1. *Immunol Lett*, *133*(2), 85-93. doi: 10.1016/j.imlet.2010.07.006
- S0165-2478(10)00193-8 [pii]
- Borchert, A., Savaskan, N. E., & Kuhn, H. (2003). Regulation of expression of the phospholipid hydroperoxide/sperm nucleus glutathione peroxidase gene. Tissue-specific expression pattern and identification of functional cis- and trans-regulatory elements. *J Biol Chem*, *278*(4), 2571-2580. doi: 10.1074/jbc.M209064200
- Borchert, A., Wang, C. C., Ufer, C., Schiebel, H., Savaskan, N. E., & Kuhn, H. (2006). The role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase isoforms in murine embryogenesis. *J Biol Chem*, *281*(28), 19655-19664. doi: 10.1074/jbc.M601195200
- Bosl, M. R., Takaku, K., Oshima, M., Nishimura, S., & Taketo, M. M. (1997). Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (*Trsp*). *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(11), 5531-5534.
- Bouvard, D., Brakebusch, C., Gustafsson, E., Aszodi, A., Bengtsson, T., Berna, A., & Fassler, R. (2001). Functional consequences of integrin gene mutations in mice. *Circ Res*, *89*(3), 211-223.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, *72*, 248-254.
- Brash, A. R., Boeglin, W. E., & Chang, M. S. (1997). Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(12), 6148-6152.
- Brash, A. R., Yu, Z., Boeglin, W. E., & Schneider, C. (2007). The hepoxilin connection in the epidermis. *FEBS J*, *274*(14), 3494-3502. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05909.x
- Brigelius-Flohe, R. (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med*, *27*(9-10), 951-965.
- Brigelius-Flohe, R., & Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta*, *1830*(5), 3289-3303. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.11.020
- Brutsch, S. H., Wang, C. C., Li, L., Stender, H., Neziroglu, N., Richter, C., . . . Borchert, A. (2015). 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*, 22(4), 281-293. doi: 10.1089/ars.2014.5967
- Canli, O., Alankus, Y. B., Grootjans, S., Vegi, N., Hultner, L., Hoppe, P. S., . . . Greten, F. R. (2015). Glutathione peroxidase 4 prevents necroptosis in mouse erythroid precursors. *Blood*. doi: 10.1182/blood-2015-06-654194
- Chawengsub, Y., Gauthier, K. M., & Campbell, W. B. (2009). Role of arachidonic acid lipoxygenase metabolites in the regulation of vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297(2), H495-507. doi: 10.1152/ajpheart.00349.2009
- Choi, J., Chon, J. K., Kim, S., & Shin, W. (2008). Conformational flexibility in mammalian 15S-lipoxygenase: Reinterpretation of the crystallographic data. *Proteins*, 70(3), 1023-1032. doi: 10.1002/prot.21590
- Chu, F. F., Doroshov, J. H., & Esworthy, R. S. (1993). Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem*, 268(4), 2571-2576.
- Claesson, H. E. (2009). On the biosynthesis and biological role of eoxins and 15-lipoxygenase-1 in airway inflammation and Hodgkin lymphoma. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 89(3-4), 120-125. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2008.12.003
- Conrad, D. J., Kuhn, H., Mulkins, M., Highland, E., & Sigal, E. (1992). Specific inflammatory cytokines regulate the expression of human monocyte 15-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(1), 217-221.
- Conrad, M., Moreno, S. G., Sinowatz, F., Ursini, F., Kolle, S., Roveri, A., . . . Bornkamm, G. W. (2005). The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Mol Cell Biol*, 25(17), 7637-7644. doi: 10.1128/MCB.25.17.7637-7644.2005
- Da Silva, N., Pietrement, C., Brown, D., & Breton, S. (2006). Segmental and cellular expression of aquaporins in the male excurrent duct. *Biochim Biophys Acta*, 1758(8), 1025-1033. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.06.026
- Dear, T. N., Campbell, K., & Rabbitts, T. H. (1991). Molecular cloning of putative odorant-binding and odorant-metabolizing proteins. *Biochemistry*, 30(43), 10376-10382.
- Dix, C. J., Habberfield, A. D., Sullivan, M. H., & Cooke, B. A. (1985). Evidence for the involvement of lipoxygenase products in steroidogenesis. *Biochem Soc Trans*, 13(1), 60-63.
- Downey, B. R., Mootoo, J. E., & Doyle, S. E. (1998). A role for lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in porcine ovulation. *Anim Reprod Sci*, 49(4), 269-279.
- El Kebir, D., & Filep, J. G. (2013). Modulation of Neutrophil Apoptosis and the Resolution of Inflammation through beta2 Integrins. *Front Immunol*, 4, 60. doi: 10.3389/fimmu.2013.00060
- Epidemiologic studies on the etiologic relationship of selenium and Keshan disease. (1979). *Chin Med J (Engl)*, 92(7), 477-482.
- Ereso, A. Q., Cureton, E. L., Cripps, M. W., Sadjadi, J., Dua, M. M., Curran, B., & Victorino, G. P. (2009). Lipoxin a(4) attenuates microvascular fluid leak during inflammation. *J Surg Res*, 156(2), 183-188. doi: 10.1016/j.jss.2009.01.009

- Esposito, G., Jaiswal, B. S., Xie, F., Krajnc-Franken, M. A., Robben, T. J., Strik, A. M., . . . Gossen, J. A. (2004). Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(9), 2993-2998. doi: 10.1073/pnas.0400050101
- Faronato, M., Muzzonigro, G., Milanese, G., Menna, C., Bonfigli, A. R., Catalano, A., & Procopio, A. (2007). Increased expression of 5-lipoxygenase is common in clear cell renal cell carcinoma. *Histol Histopathol*, *22*(10), 1109-1118.
- Fischer, B., & Bavister, B. D. (1993). Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil*, *99*(2), 673-679.
- Fischer, K. A., Van Leyen, K., Lovercamp, K. W., Manandhar, G., Sutovsky, M., Feng, D., . . . Sutovsky, P. (2005). 15-Lipoxygenase is a component of the mammalian sperm cytoplasmic droplet. *Reproduction*, *130*(2), 213-222. doi: 10.1530/rep.1.00646
- Ford, W. C. (2006). Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Hum Reprod Update*, *12*(3), 269-274. doi: 10.1093/humupd/dmi053
- Forman, H. J., Ursini, F., & Maiorino, M. (2014). An overview of mechanisms of redox signaling. *J Mol Cell Cardiol*. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.01.018
- Fouchecourt, S., Metayer, S., Locatelli, A., Dacheux, F., & Dacheux, J. L. (2000). Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol Reprod*, *62*(6), 1790-1803.
- Friedmann Angeli, J. P., Schneider, M., Proneth, B., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Hammond, V. J., . . . Conrad, M. (2014). Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat Cell Biol*, *16*(12), 1180-1191. doi: 10.1038/ncb3064
- Funk, C. D., Chen, X. S., Johnson, E. N., & Zhao, L. (2002). Lipoxygenase genes and their targeted disruption. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, *68-69*, 303-312.
- Funk, C. D., Furci, L., & FitzGerald, G. A. (1990). Molecular cloning, primary structure, and expression of the human platelet/erythroleukemia cell 12-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *87*(15), 5638-5642.
- Funk, C. D., Hoshiko, S., Matsumoto, T., Radmark, O., & Samuelsson, B. (1989). Characterization of the human 5-lipoxygenase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *86*(8), 2587-2591.
- Garry, M. R., Kavanagh, T. J., Faustman, E. M., Sidhu, J. S., Liao, R., Ware, C., . . . Deeb, S. S. (2008). Sensitivity of mouse lung fibroblasts heterozygous for GPx4 to oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, *44*(6), 1075-1087. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.002
- Gassmann, Th. (1916). Der Nachweis des Selens im Knochen-und Zahngewebe. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, *97*(6), 307-310.
- Gertow, K., Nobili, E., Folkersen, L., Newman, J. W., Pedersen, T. L., Ekstrand, J., . . . Gabrielsen, A. (2011). 12- and 15-lipoxygenases in human carotid

- atherosclerotic lesions: associations with cerebrovascular symptoms. *Atherosclerosis*, 215(2), 411-416. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.01.015
- Ghosh, J. (2003). Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers prostate cancer cell death through rapid activation of c-Jun N-terminal kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, 307(2), 342-349.
- Ghyselinck, N. B., & Dufaure, J. P. (1990). A mouse cDNA sequence for epididymal androgen-regulated proteins related to glutathione peroxidase. *Nucleic Acids Res*, 18(23), 7144.
- Ghyselinck, N. B., Jimenez, C., Lefrancois, A. M., & Dufaure, J. P. (1990). Molecular cloning of a cDNA for androgen-regulated proteins secreted by the mouse epididymis. *J Mol Endocrinol*, 4(1), 5-12.
- Gilbert, N. C., Bartlett, S. G., Waight, M. T., Neau, D. B., Boeglin, W. E., Brash, A. R., & Newcomer, M. E. (2011). The structure of human 5-lipoxygenase. *Science*, 331(6014), 217-219. doi: 10.1126/science.1197203
- Gillmor, S. A., Villasenor, A., Fletterick, R., Sigal, E., & Browner, M. F. (1997). The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nat Struct Biol*, 4(12), 1003-1009.
- Gonzalez-Flores, J. N., Shetty, S. P., Dubey, A., & Copeland, P. R. (2013). The molecular biology of selenocysteine. *Biomol Concepts*, 4(4), 349-365. doi: 10.1515/bmc-2013-0007
- Gregus, A. M., Dumlao, D. S., Wei, S. C., Norris, P. C., Catella, L. C., Meyerstein, F. G., . . . Dennis, E. A. (2013). Systematic analysis of rat 12/15-lipoxygenase enzymes reveals critical role for spinal eLOX3 hepoxilin synthase activity in inflammatory hyperalgesia. *FASEB J*, 27(5), 1939-1949. doi: 10.1096/fj.12-217414
- Griveau, J. F., Renard, P., & Le Lannou, D. (1994). An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. *Int J Androl*, 17(6), 300-307.
- Haeggstrom, J. Z., & Funk, C. D. (2011). Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. *Chem Rev*, 111(10), 5866-5898. doi: 10.1021/cr200246d
- Hamberg, M., & Samuelsson, B. (1974). Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71(9), 3400-3404.
- Hansen, J., Garreta, A., Benincasa, M., Fuste, M. C., Busquets, M., & Manresa, A. (2013). Bacterial lipoxygenases, a new subfamily of enzymes? A phylogenetic approach. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97(11), 4737-4747. doi: 10.1007/s00253-013-4887-9
- Haynes, R. L., & van Leyen, K. (2013). 12/15-lipoxygenase expression is increased in oligodendrocytes and microglia of periventricular leukomalacia. *Dev Neurosci*, 35(2-3), 140-154. doi: 10.1159/000350230
- Higgs, G. A., Salmon, J. A., & Spayne, J. A. (1981). The inflammatory effects of hydroperoxy and hydroxy acid products of arachidonate lipoxygenase in rabbit skin. *Br J Pharmacol*, 74(2), 429-433.

- Hill, K. E., Lyons, P. R., & Burk, R. F. (1992). Differential regulation of rat liver selenoprotein mRNAs in selenium deficiency. *Biochem Biophys Res Commun*, *185*(1), 260-263.
- Hill, M.A. . (2015). Embryology Mouse Timeline Detailed. Retrieved 6.11.2015 https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Mouse_Timeline_Detailed
- Horn, T., Adel, S., Schumann, R., Sur, S., Kakularam, K. R., Polamarasetty, A., . . . Heydeck, D. (2014). Evolutionary aspects of lipoxygenases and genetic diversity of human leukotriene signaling. *Prog Lipid Res*, *57C*, 13-39. doi: 10.1016/j.plipres.2014.11.001
- Hull, E. M., & Dominguez, J. M. (2007). Sexual behavior in male rodents. *Horm Behav*, *52*(1), 45-55. doi: 10.1016/j.yhbeh.2007.03.030
- Imai, H., Hakkaku, N., Iwamoto, R., Suzuki, J., Suzuki, T., Tajima, Y., . . . Nakagawa, Y. (2009). Depletion of selenoprotein GPx4 in spermatocytes causes male infertility in mice. *J Biol Chem*, *284*(47), 32522-32532. doi: 10.1074/jbc.M109.016139
- Imai, H., Hirao, F., Sakamoto, T., Sekine, K., Mizukura, Y., Saito, M., . . . Nakagawa, Y. (2003). Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene. *Biochem Biophys Res Commun*, *305*(2), 278-286.
- Imai, H., Narashima, K., Arai, M., Sakamoto, H., Chiba, N., & Nakagawa, Y. (1998). Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *J Biol Chem*, *273*(4), 1990-1997.
- Imai, H., Suzuki, K., Ishizaka, K., Ichinose, S., Oshima, H., Okayasu, I., . . . Nakagawa, Y. (2001). Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males. *Biol Reprod*, *64*(2), 674-683.
- Ingold, I., Aichler, M., Yefremova, E., Roveri, A., Buday, K., Doll, S., . . . Conrad, M. (2015). Expression of a Catalytically Inactive Mutant Form of Glutathione Peroxidase 4 (Gpx4) Confers a Dominant-negative Effect in Male Fertility. *J Biol Chem*, *290*(23), 14668-14678. doi: 10.1074/jbc.M115.656363
- Ivanov, I., Heydeck, D., Hofheinz, K., Roffeis, J., O'Donnell, V. B., Kuhn, H., & Walther, M. (2010). Molecular enzymology of lipoxygenases. *Arch Biochem Biophys*, *503*(2), 161-174. doi: 10.1016/j.abb.2010.08.016
- Ivanov, I., Kuhn, H., & Heydeck, D. (2015). Structural and functional biology of arachidonic acid 15-lipoxygenase-1 (ALOX15). *Gene*, *573*(1), 1-32. doi: 10.1016/j.gene.2015.07.073
- Ivanov, I., Shang, W., Toledo, L., Masgrau, L., Svergun, D. I., Stehling, S., . . . Kuhn, H. (2012). Ligand-induced formation of transient dimers of mammalian 12/15-lipoxygenase: a key to allosteric behavior of this class of enzymes? *Proteins*, *80*(3), 703-712. doi: 10.1002/prot.23227
- Jin, G., Arai, K., Murata, Y., Wang, S., Stins, M. F., Lo, E. H., & van Leyen, K. (2008). Protecting against cerebrovascular injury: contributions of 12/15-lipoxygenase to edema formation after transient focal ischemia. *Stroke*, *39*(9), 2538-2543. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.514927

- Jisaka, M., Kim, R. B., Boeglin, W. E., Nanney, L. B., & Brash, A. R. (1997). Molecular cloning and functional expression of a phorbol ester-inducible 8S-lipoxygenase from mouse skin. *J Biol Chem*, 272(39), 24410-24416.
- Johnson, E. N., Brass, L. F., & Funk, C. D. (1998). Increased platelet sensitivity to ADP in mice lacking platelet-type 12-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(6), 3100-3105.
- Kaushal, N., Hegde, S., Lumadue, J., Paulson, R. F., & Prabhu, K. S. (2011). The regulation of erythropoiesis by selenium in mice. *Antioxid Redox Signal*, 14(8), 1403-1412. doi: 10.1089/ars.2010.3323
- Kawano, N., Yoshida, K., Miyado, K., & Yoshida, M. (2011). Lipid rafts: keys to sperm maturation, fertilization, and early embryogenesis. *J Lipids*, 2011, 264706. doi: 10.1155/2011/264706
- Khanna, S., Roy, S., Slivka, A., Craft, T. K., Chaki, S., Rink, C., . . . Sen, C. K. (2005). Neuroprotective properties of the natural vitamin E alpha-tocotrienol. *Stroke*, 36(10), 2258-2264. doi: 10.1161/01.STR.0000181082.70763.22
- Kim, G. H., Ryan, J. J., & Archer, S. L. (2013). The role of redox signaling in epigenetics and cardiovascular disease. *Antioxid Redox Signal*, 18(15), 1920-1936. doi: 10.1089/ars.2012.4926
- Kinzig, A., Heidt, M., Furstenberger, G., Marks, F., & Krieg, P. (1999). cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of a novel murine epidermis-type lipoxygenase. *Genomics*, 58(2), 158-164. doi: 10.1006/geno.1999.5816
- Köhnlein, Wolfgang, Traut, Horst, & Fischer, Manfred. (2001). *Die Wirkung niedriger Strahlendosen*. S. 123: Springer.
- Koppers, A. J., De Iuliis, G. N., Finnie, J. M., McLaughlin, E. A., & Aitken, R. J. (2008). Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab*, 93(8), 3199-3207. doi: 10.1210/jc.2007-2616
- Koutouby, A., Habibullah, J., & Moinuddin, F. A. (2000). Spondylometaphyseal dysplasia: Sedaghatian type. *Am J Med Genet*, 90(3), 199-202.
- Krieg, P., & Furstenberger, G. (2014). The role of lipoxygenases in epidermis. *Biochim Biophys Acta*, 1841(3), 390-400. doi: 10.1016/j.bbali.2013.08.005
- Krieg, P., Rosenberger, S., de Juanes, S., Latzko, S., Hou, J., Dick, A., . . . Schneider, H. (2013). Aloxe3 knockout mice reveal a function of epidermal lipoxygenase-3 as hepxilin synthase and its pivotal role in barrier formation. *J Invest Dermatol*, 133(1), 172-180. doi: 10.1038/jid.2012.250
- Kriska, T., Cepura, C., Magier, D., Siangjong, L., Gauthier, K. M., & Campbell, W. B. (2012). Mice lacking macrophage 12/15-lipoxygenase are resistant to experimental hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302(11), H2428-2438. doi: 10.1152/ajpheart.01120.2011
- Kronke, G., Katzenbeisser, J., Uderhardt, S., Zaiss, M. M., Scholtysek, C., Schabbauer, G., . . . Schett, G. (2009). 12/15-lipoxygenase counteracts inflammation and tissue damage in arthritis. *J Immunol*, 183(5), 3383-3389. doi: 10.4049/jimmunol.0900327

- Kryukov, G. V., Castellano, S., Novoselov, S. V., Lobanov, A. V., Zehtab, O., Guigo, R., & Gladyshev, V. N. (2003). Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, *300*(5624), 1439-1443. doi: 10.1126/science.1083516
- Kuhn, H. (1996). 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. *Prog Lipid Res*, *35*(3), 203-226.
- Kuhn, H., Banthiya, S., & van Leyen, K. (2014). Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochim Biophys Acta*. doi: 10.1016/j.bbali.2014.10.002
- Kühn, H., Barnett, J., Grunberger, D., Baecker, P., Chow, J., Nguyen, B., . . . Sigal, E. (1993). Overexpression, purification and characterization of human recombinant 15-lipoxygenase. *Biochim Biophys Acta*, *1169*(1), 80-89.
- Kuhn, H., & Borchert, A. (2002). Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radic Biol Med*, *33*(2), 154-172.
- Kuhn, H., & O'Donnell, V. B. (2006). Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases. *Prog Lipid Res*, *45*(4), 334-356. doi: 10.1016/j.plipres.2006.02.003
- Kuhn, H., Salzmann-Reinhardt, U., Ludwig, P., Ponicke, K., Schewe, T., & Rapoport, S. (1986). The stoichiometry of oxygen uptake and conjugated diene formation during the dioxygenation of linoleic acid by the pure reticulocyte lipoxygenase. Evidence for aerobic hydroperoxidase activity. *Biochim Biophys Acta*, *876*(2), 187-193.
- Lax, Y., Grossman, S., Rubinstein, S., Magid, N., & Breitbart, H. (1990). Role of lipoxygenase in the mechanism of acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Biochim Biophys Acta*, *1043*(1), 12-18.
- Leitzmann, Claus. (2003). *Ernährung in Prävention und Therapie: ein Lehrbuch; 165 Tabellen*: Georg Thieme Verlag.
- Levander, O. A., & Beck, M. A. (1997). Interacting nutritional and infectious etiologies of Keshan disease. Insights from coxsackie virus B-induced myocarditis in mice deficient in selenium or vitamin E. *Biol Trace Elem Res*, *56*(1), 5-21. doi: 10.1007/BF02778980
- Lomize, Andrei, Lomize, Mikhail, & Pogozeva, Irina. (2005-2013). Orientation of proteins in membranes. Retrieved 12.11.2015 <http://opm.phar.umich.edu/protein.php?search=2p0m>
- Lubos, E., Loscalzo, J., & Handy, D. E. (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, *15*(7), 1957-1997. doi: 10.1089/ars.2010.3586
- Ludwig, P., Hohne, M., Kuhn, H., Schewe, T., & Rapoport, S. M. (1988). The biological dynamics of lipoxygenase in rabbit red cells in the course of an experimental bleeding anaemia. Unexpected effects of the calcium ionophore A 23187. *Biomed Biochim Acta*, *47*(7), 593-608.

- Mack, S. R., Han, H. L., De Jonge, J., Anderson, R. A., & Zaneveld, L. J. (1992). The human sperm acrosome reaction does not depend on arachidonic acid metabolism via the cyclooxygenase and lipoxygenase pathways. *J Androl*, *13*(6), 551-559.
- Maddipati, K. R., Gasparski, C., & Marnett, L. J. (1987). Characterization of the hydroperoxide-reducing activity of human plasma. *Arch Biochem Biophys*, *254*(1), 9-17.
- Maddipati, K. R., & Marnett, L. J. (1987). Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. Purification and properties of a selenium-dependent glutathione peroxidase. *J Biol Chem*, *262*(36), 17398-17403.
- Maiorino, M., Aumann, K. D., Brigelius-Flohe, R., Doria, D., van den Heuvel, J., McCarthy, J., . . . Flohe, L. (1995). Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biol Chem Hoppe Seyler*, *376*(11), 651-660.
- Maiorino, M., Gregolin, C., & Ursini, F. (1990). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, *186*, 448-457.
- Maiorino, M., Ursini, F., Bosello, V., Toppo, S., Tosatto, S. C., Mauri, P., . . . Flohe, L. (2007). The thioredoxin specificity of Drosophila GPx: a paradigm for a peroxiredoxin-like mechanism of many glutathione peroxidases. *J Mol Biol*, *365*(4), 1033-1046. doi: 10.1016/j.jmb.2006.10.033
- Maiorino, M., Wissing, J. B., Brigelius-Flohe, R., Calabrese, F., Roveri, A., Steinert, P., . . . Flohe, L. (1998). Testosterone mediates expression of the selenoprotein PHGPx by induction of spermatogenesis and not by direct transcriptional gene activation. *FASEB J*, *12*(13), 1359-1370.
- Mele, P. G., Dada, L. A., Paz, C., Neuman, I., Cymeryng, C. B., Mendez, C. F., . . . Podesta, E. J. (1997). Involvement of arachidonic acid and the lipoxygenase pathway in mediating luteinizing hormone-induced testosterone synthesis in rat Leydig cells. *Endocr Res*, *23*(1-2), 15-26.
- Meruvu, S., Walther, M., Ivanov, I., Hammarstrom, S., Furstenberger, G., Krieg, P., . . . Kuhn, H. (2005). Sequence determinants for the reaction specificity of murine (12R)-lipoxygenase: targeted substrate modification and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, *280*(44), 36633-36641. doi: 10.1074/jbc.M508260200
- Mills, G. C. (1957). Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem*, *229*(1), 189-197.
- Moore, K., Lovercamp, K., Feng, D., Antelman, J., Sutovsky, M., Manandhar, G., . . . Sutovsky, P. (2010). Altered epididymal sperm maturation and cytoplasmic droplet migration in subfertile male Alox15 mice. *Cell Tissue Res*, *340*(3), 569-581. doi: 10.1007/s00441-010-0972-x
- Moore, M. A., & Metcalf, D. (1970). Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol*, *18*(3), 279-296.

- Moskowitz, M. A., Kiwak, K. J., Hekimian, K., & Levine, L. (1984). Synthesis of compounds with properties of leukotrienes C4 and D4 in gerbil brains after ischemia and reperfusion. *Science*, 224(4651), 886-889.
- Nadel, J. A., Conrad, D. J., Ueki, I. F., Schuster, A., & Sigal, E. (1991). Immunocytochemical localization of arachidonate 15-lipoxygenase in erythrocytes, leukocytes, and airway cells. *J Clin Invest*, 87(4), 1139-1145. doi: 10.1172/JCI115110
- Nassar, G. M., Morrow, J. D., Roberts, L. J., 2nd, Lakkis, F. G., & Badr, K. F. (1994). Induction of 15-lipoxygenase by interleukin-13 in human blood monocytes. *J Biol Chem*, 269(44), 27631-27634.
- New, D. A., & Coppola, P. T. (1970). Effects of different oxygen concentrations on the development of rat embryos in culture. *J Reprod Fertil*, 21(1), 109-118.
- Noguchi, N., Yamashita, H., Hamahara, J., Nakamura, A., Kuhn, H., & Niki, E. (2002). The specificity of lipoxygenase-catalyzed lipid peroxidation and the effects of radical-scavenging antioxidants. *Biol Chem*, 383(3-4), 619-626. doi: 10.1515/BC.2002.064
- o.V. Ernährungslexikon. Retrieved 1.11.2015, from Institut für Ernährungsinformation <http://www.ernaehrung.de/lexikon/ernaehrung/>
- o.V. Online Embryologiekurs für Studierende der Medizin. Retrieved 22.10.2015 <http://www.embryology.ch/allemand/cgametogen/spermato02.html>
- o.V. (2003). Miller-Keane Encyclopedia and Dictionary of Medicine, Nursing, and Allied Health. Retrieved 06.11.2015 <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/spermatogenesis>
- o.V. (2015). Retrieved 02.11.2015, from Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. <https://http://www.dge.de/wissenschaft/referenzwerte/selen/>
- Olsen, L. F., Issinger, O. G., & Guerra, B. (2013). The Yin and Yang of redox regulation. *Redox Rep*, 18(6), 245-252. doi: 10.1179/1351000213Y.0000000059
- Pfeifer, H., Conrad, M., Roethlein, D., Kyriakopoulos, A., Brielmeier, M., Bornkamm, G. W., & Behne, D. (2001). Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J*, 15(7), 1236-1238.
- Piomelli, D., Shapiro, E., Feinmark, S. J., & Schwartz, J. H. (1987). Metabolites of arachidonic acid in the nervous system of Aplysia: possible mediators of synaptic modulation. *J Neurosci*, 7(11), 3675-3686.
- Powell, W. S., & Rokach, J. (2015). Biosynthesis, biological effects, and receptors of hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) and oxoeicosatetraenoic acids (oxo-ETEs) derived from arachidonic acid. *Biochim Biophys Acta*, 1851(4), 340-355. doi: 10.1016/j.bbali.2014.10.008
- Pushpa-Rekha, T. R., Burdsall, A. L., Oleksa, L. M., Chisolm, G. M., & Driscoll, D. M. (1995). Rat phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. cDNA cloning and identification of multiple transcription and translation start sites. *J Biol Chem*, 270(45), 26993-26999.

- Rao, B., Soufir, J. C., Martin, M., & David, G. (1989). Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Res*, 24(2), 127-134. doi: 10.1002/mrd.1120240202
- Rodriguez, C. I., & Stewart, C. L. (2007). Disruption of the ubiquitin ligase HERC4 causes defects in spermatozoon maturation and impaired fertility. *Dev Biol*, 312(2), 501-508. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.09.053
- Romanov, S., Wiesner, R., Myagkova, G., Kuhn, H., & Ivanov, I. (2006). Affinity labeling of the rabbit 12/15-lipoxygenase using azido derivatives of arachidonic acid. *Biochemistry*, 45(11), 3554-3562. doi: 10.1021/bi052152i
- Roveri, A., Casasco, A., Maiorino, M., Dalan, P., Calligaro, A., & Ursini, F. (1992). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. Gonadotropin dependence and immunocytochemical identification. *J Biol Chem*, 267(9), 6142-6146.
- Roveri, A., Maiorino, M., & Ursini, F. (1994). Enzymatic and immunological measurements of soluble and membrane-bound phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 233, 202-212.
- Saam, J., Ivanov, I., Walther, M., Holzhutter, H. G., & Kuhn, H. (2007). Molecular dioxygen enters the active site of 12/15-lipoxygenase via dynamic oxygen access channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(33), 13319-13324. doi: 10.1073/pnas.0702401104
- Sachs-Olsen, C., Sanak, M., Lang, A. M., Gielicz, A., Mowinckel, P., Lodrup Carlsen, K. C., . . . Szczeklik, A. (2010). Eoxins: a new inflammatory pathway in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 126(4), 859-867 e859. doi: 10.1016/j.jaci.2010.07.015
- Sattler, W., Maiorino, M., & Stocker, R. (1994). Reduction of HDL- and LDL-associated cholesterylester and phospholipid hydroperoxides by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and Ebselen (PZ 51). *Arch Biochem Biophys*, 309(2), 214-221. doi: 10.1006/abbi.1994.1105
- Scheerer, P., Borchert, A., Krauss, N., Wessner, H., Gerth, C., Hohne, W., & Kuhn, H. (2007). Structural basis for catalytic activity and enzyme polymerization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase-4 (GPx4). *Biochemistry*, 46(31), 9041-9049. doi: 10.1021/bi700840d
- Schewe, T., Halangk, W., Hiebsch, C., & Rapoport, S. (1977). Degradation of mitochondria by cytosolic factors in reticulocytes. *Acta Biol Med Ger*, 36(3-4), 563-572.
- Schewe, T., Halangk, W., Hiebsch, C., & Rapoport, S. M. (1975). A lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria. *FEBS Lett*, 60(1), 149-152.
- Schneider, M., Forster, H., Boersma, A., Seiler, A., Wehnes, H., Sinowatz, F., . . . Conrad, M. (2009). Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *FASEB J*, 23(9), 3233-3242. doi: 10.1096/fj.09-132795
- Schnurr, K., Belkner, J., Ursini, F., Schewe, T., & Kuhn, H. (1996). 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*, 271(9), 4653-4658.
- Schon, J., Goritz, F., Streich, J., & Blottner, S. (2004). Histological organization of roe deer testis throughout the seasonal cycle: variable and constant components of tubular and interstitial compartment. *Anat Embryol (Berl)*, 208(2), 151-159. doi: 10.1007/s00429-004-0385-2
- Schradin, C., Eder, S., & Muller, K. (2012). Differential investment into testes and sperm production in alternative male reproductive tactics of the African striped mouse (*Rhabdomys pumilio*). *Horm Behav*, 61(5), 686-695. doi: 10.1016/j.yhbeh.2012.03.002
- Schuckelt, R., Brigelius-Flohe, R., Maiorino, M., Roveri, A., Reumkens, J., Strassburger, W., . . . Flohe, L. (1991). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a selenoenzyme distinct from the classical glutathione peroxidase as evident from cDNA and amino acid sequencing. *Free Radic Res Commun*, 14(5-6), 343-361.
- Schwarz, Klaus, & Foltz, Calvin M. (1957). Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J Am Chem Soc*, 79(12), 3292-3293.
- Seiler, A., Schneider, M., Forster, H., Roth, S., Wirth, E. K., Culmsee, C., . . . Conrad, M. (2008). Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell Metab*, 8(3), 237-248. doi: 10.1016/j.cmet.2008.07.005
- Sendobry, S. M., Cornicelli, J. A., Welch, K., Bocan, T., Tait, B., Trivedi, B. K., . . . Daugherty, A. (1997). Attenuation of diet-induced atherosclerosis in rabbits with a highly selective 15-lipoxygenase inhibitor lacking significant antioxidant properties. *Br J Pharmacol*, 120(7), 1199-1206. doi: 10.1038/sj.bjp.0701007
- Shang, W., Ivanov, I., Svergun, D. I., Borbulevych, O. Y., Aleem, A. M., Stehling, S., . . . Skrzypczak-Jankun, E. (2011). Probing dimerization and structural flexibility of mammalian lipoxygenases by small-angle X-ray scattering. *J Mol Biol*, 409(4), 654-668. doi: 10.1016/j.jmb.2011.04.035
- Shen, J., Herderick, E., Cornhill, J. F., Zsigmond, E., Kim, H. S., Kuhn, H., . . . Chan, L. (1996). Macrophage-mediated 15-lipoxygenase expression protects against atherosclerosis development. *J Clin Invest*, 98(10), 2201-2208. doi: 10.1172/JCI119029
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*, 82(2), 291-295.
- Sigal, E., Dicharry, S., Highland, E., & Finkbeiner, W. E. (1992). Cloning of human airway 15-lipoxygenase: identity to the reticulocyte enzyme and expression in epithelium. *Am J Physiol*, 262(4 Pt 1), L392-398.
- Sloane, D. L., Browner, M. F., Dauter, Z., Wilson, K., Fletterick, R. J., & Sigal, E. (1990). Purification and crystallization of 15-lipoxygenase from rabbit reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 173(2), 507-513.
- Smith, A. C., Mears, A. J., Bunker, R., Ahmed, A., MacKenzie, M., Schwartzentruber, J. A., . . . Graham, G. E. (2014). Mutations in the enzyme glutathione peroxidase 4 cause Sedaghatian-type spondylometaphyseal dysplasia. *J Med Genet*, 51(7), 470-474. doi: 10.1136/jmedgenet-2013-102218

- Sun, D., & Funk, C. D. (1996). 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*, 271(39), 24055-24062.
- Takayama, H., Gimbrone, M. A., Jr., & Schafer, A. I. (1987). Vascular lipoxygenase activity: synthesis of 15-hydroxyeicosatetraenoic acid from arachidonic acid by blood vessels and cultured vascular endothelial cells. *Thromb Res*, 45(6), 803-816.
- Thomas, M., Jain, S., Kumar, G. P., & Laloraya, M. (1997). A programmed oxyradical burst causes hatching of mouse blastocysts. *J Cell Sci*, 110 (Pt 14), 1597-1602.
- Toppo, S., Vanin, S., Bosello, V., & Tosatto, S. C. (2008). Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily. *Antioxid Redox Signal*, 10(9), 1501-1514. doi: 10.1089/ars.2008.2057
- Trebus, F., Heydeck, D., Schimke, I., Gerth, C., & Kuhn, H. (2002). Transient experimental anemia in cholesterol-fed rabbits induces systemic overexpression of the reticulocyte-type 15-lipoxygenase and protects from aortic lipid deposition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 67(6), 419-428.
- Tsao, C. H., Shiau, M. Y., Chuang, P. H., Chang, Y. H., & Hwang, J. (2014). Interleukin-4 regulates lipid metabolism by inhibiting adipogenesis and promoting lipolysis. *J Lipid Res*, 55(3), 385-397. doi: 10.1194/jlr.M041392
- Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., & Flohe, L. (1999). Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science*, 285(5432), 1393-1396.
- Ursini, F., Maiorino, M., Valente, M., Ferri, L., & Gregolin, C. (1982). Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim Biophys Acta*, 710(2), 197-211.
- Utomo, A., Jiang, X., Furuta, S., Yun, J., Levin, D. S., Wang, Y. C., . . . Lee, W. H. (2004). 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*, 279(42), 43522-43529. doi: 10.1074/jbc.M407141200
- Vadnais, M. L., Aghajanian, H. K., Lin, A., & Gerton, G. L. (2013). Signaling in sperm: toward a molecular understanding of the acquisition of sperm motility in the mouse epididymis. *Biol Reprod*, 89(5), 127. doi: 10.1095/biolreprod.113.110163
- van Leyen, K. (2013). Lipoxygenase: an emerging target for stroke therapy. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 12(2), 191-199.
- van Leyen, K., Arai, K., Jin, G., Kenyon, V., Gerstner, B., Rosenberg, P. A., . . . Lo, E. H. (2008). Novel lipoxygenase inhibitors as neuroprotective reagents. *J Neurosci Res*, 86(4), 904-909. doi: 10.1002/jnr.21543
- van Leyen, K., Kim, H. Y., Lee, S. R., Jin, G., Arai, K., & Lo, E. H. (2006). Baicalein and 12/15-lipoxygenase in the ischemic brain. *Stroke*, 37(12), 3014-3018. doi: 10.1161/01.STR.0000249004.25444.a5

- Vergouwen, R. P., Huiskamp, R., Bas, R. J., Roepers-Gajadien, H. L., Davids, J. A., & de Rooij, D. G. (1993). Postnatal development of testicular cell populations in mice. *J Reprod Fertil*, *99*(2), 479-485.
- Virmani, J., Johnson, E. N., Klein-Szanto, A. J., & Funk, C. D. (2001). Role of 'platelet-type' 12-lipoxygenase in skin carcinogenesis. *Cancer Lett*, *162*(2), 161-165.
- Wallace, Edith, Cooper, George W, & Calvin, Harold I. (1983). Effects of selenium deficiency on the shape and arrangement of rodent sperm mitochondria. *Gamete Res*, *7*(4), 389-399.
- Walther, M., Wiesner, R., & Kuhn, H. (2004). Investigations into calcium-dependent membrane association of 15-lipoxygenase-1. Mechanistic roles of surface-exposed hydrophobic amino acids and calcium. *J Biol Chem*, *279*(5), 3717-3725. doi: 10.1074/jbc.M309564200
- Wang, H., Li, J., Follett, P. L., Zhang, Y., Cotanche, D. A., Jensen, F. E., . . . Rosenberg, P. A. (2004). 12-Lipoxygenase plays a key role in cell death caused by glutathione depletion and arachidonic acid in rat oligodendrocytes. *Eur J Neurosci*, *20*(8), 2049-2058. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03650.x
- Wasilewicz, M. P., Kolodziej, B., Bojulko, T., Kaczmarczyk, M., Sulzyc-Bielicka, V., Bielicki, D., & Ciepiela, K. (2010). Overexpression of 5-lipoxygenase in sporadic colonic adenomas and a possible new aspect of colon carcinogenesis. *Int J Colorectal Dis*, *25*(9), 1079-1085. doi: 10.1007/s00384-010-0980-z
- Wecksler, A. T., Jacquot, C., van der Donk, W. A., & Holman, T. R. (2009). Mechanistic investigations of human reticulocyte 15- and platelet 12-lipoxygenases with arachidonic acid. *Biochemistry*, *48*(26), 6259-6267. doi: 10.1021/bi802332j
- Weitzel, Frank, & Wendel, Albrecht. (1993). Selenoenzymes regulate the activity of leukocyte 5-lipoxygenase via the peroxide tone. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(9), 6288-6292.
- Wendel, M., & Heller, A. R. (2009). Anticancer actions of omega-3 fatty acids--current state and future perspectives. *Anticancer Agents Med Chem*, *9*(4), 457-470.
- Winkler, F. K., D'Arcy, A., & Hunziker, W. (1990). Structure of human pancreatic lipase. *Nature*, *343*(6260), 771-774. doi: 10.1038/343771a0
- Xiao, L., Chen, D., Hu, P., Wu, J., Liu, W., Zhao, Y., . . . Yuan, Z. (2011). The c-Abl-MST1 signaling pathway mediates oxidative stress-induced neuronal cell death. *J Neurosci*, *31*(26), 9611-9619. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0035-11.2011
- Yang, G., Yin, S., Zhou, R., Gu, L., Yan, B., Liu, Y., & Liu, Y. (1989). Studies of safe maximal daily dietary Se-intake in a seleniferous area in China. Part II: Relation between Se-intake and the manifestation of clinical signs and certain biochemical alterations in blood and urine. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis*, *3*(3), 123-130.
- Yang, H. W., Hwang, K. J., Kwon, H. C., Kim, H. S., Choi, K. W., & Oh, K. S. (1998). Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod*, *13*(4), 998-1002.
- Yant, L. J., Ran, Q., Rao, L., Van Remmen, H., Shibatani, T., Belter, J. G., . . . Prolla, T. A. (2003). The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and

- protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic Biol Med*, 34(4), 496-502.
- Yoo, S. E., Chen, L., Na, R., Liu, Y., Rios, C., Van Remmen, H., . . . Ran, Q. (2012). Gpx4 ablation in adult mice results in a lethal phenotype accompanied by neuronal loss in brain. *Free Radic Biol Med*, 52(9), 1820-1827. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.043
- Yu, Z., Schneider, C., Boeglin, W. E., & Brash, A. R. (2006). Human and mouse eLOX3 have distinct substrate specificities: implications for their linkage with lipoxygenases in skin. *Arch Biochem Biophys*, 455(2), 188-196. doi: 10.1016/j.abb.2006.09.002

7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Simone Hanna Brütsch, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zur antagonistischen Rolle von Glutathionperoxidase-4 (Gpx4) und 12/15-Lipoxygenase (Alox15) in der Embryogenese und Spermatogenese von gentechnisch veränderten Mausmodellen“ 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 beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

30.11.2015

Simone Hanna Brütsch

Liste aller Publikationen

Brütsch SH, Wang CC, Li L, Stender H, Neziroglu N, Richter C, Kuhn H, Borchert A. (2015) 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.* 22, 281-93 (IF: 7.4).

Brütsch SH, Rademacher M., Roth S., Müller, K, Eder S., Viertel D., Franz C., Kuhn¹, H., Borchert A. (2015) Male subfertility induced by heterozygous expression of catalytically inactive glutathione peroxidase 4 is rescued *in vivo* by inactivation of the *Alox15* gene. *Antioxid Redox Signal.* Submitted (IF: 7.4).

8 Publikationsliste

Simone Hanna Brütsch hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Brütsch SH, Wang CC, Li L, Stender H, Neziroglu N, Richter C, Kuhn H, Borchert A. (2015) 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.* 22, 281-93 (IF: 7.4).

a) Konzeption und Planung der Arbeiten: Die Planung der Arbeiten und die Festlegung der Forschungsstrategie erfolgte in gemeinsamer Absprache der federführenden Autoren **S.H.B.**, A.B. und H.K.

b) Durchführung der Experimente und deren Auswertung: Die Experimente wurden überwiegend von **S.H.B.**, C.C.W. und A.B. durchgeführt, An der Datenauswertung war zusätzlich H.K. beteiligt.

c) Schreiben der Publikationen: An der Konzeption der Publikation waren vor allem **S.H.B.**, A.B. und H.K. beteiligt. Die Erstellung des ersten Entwurfs des Manuskripts und der Datentabellen bzw. Abbildungsentwürfe wurde von **S.H.B.** vorgenommen. Auf dieser Grundlage wurde von A.B. und H.K. der finale MS Entwurf erstellt, der dann an alle Koautoren zur Ergänzung und Verbesserung geschickt wurde. Die Endredaktion wurde abschließend von **S.H.B.**, A.B. und H.K. durchgeführt. An der Revision des MS entsprechend der Gutachterkommentare und an den zusätzlichen Experimenten waren vor allem **S.H.B.**, C.C.W., A.B. und H.K. beteiligt.

Publikation 2

Brütsch SH, Rademacher M., Roth S., Müller, K, Eder S., Viertel D., Franz C., Kuhn¹, H., Borchert A. (2015) Male subfertility induced by heterozygous expression of catalytically inactive glutathione peroxidase 4 is rescued *in vivo* by inactivation of the *Alox15* gene. *Antioxid Redox Signal.* Submitted (IF: 7.4).

a) Konzeption und Planung der Arbeiten: Die Planung der Arbeiten und die Festlegung der Forschungsstrategie erfolgte in gemeinsamer Absprache der

federführenden Autoren **S.H.B.**, A.B., K.M. und H.K.

b) Durchführung der Experimente und deren Auswertung: Die Experimente wurden überwiegend von **S.H.B.** S.E. C.F. unter Anleitung von K.M. und A.B. durchgeführt, einzelne Experimente wurden von M.R und S.R durchgeführt. An der Datenauswertung waren vor allem **S.H.B.**, A.B., K.M. und H.K. beteiligt.

c) Schreiben der Publikationen: An der Konzeption der Publikation waren vor allem **S.H.B.**, K.M. A.B und H.K beteiligt. Die Erstellung des ersten Entwurfs des Manuskripts und der Datentabellen bzw. Abbildungsentwürfe wurde von **S.H.B.** vorgenommen. Auf dieser Grundlage wurde von A.B. und H.K der finale MS Entwurf erstellt, der dann an alle Koautoren zur Ergänzung und Verbesserung geschickt wurde. Die Endredaktion wurde abschließend von **S.H.B.**, K.M., A.B und H.K. durchgeführt.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin (Simone Hanna Brütsch)

9 Lebenslauf

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

10 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Hartmut Kühn für das spannende und interessante Promotionsthema bedanken. Ganz besonders möchte ich mich für die tolle Betreuung, für die Hilfe bei Fragen und Anregungen bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an Frau Dr. Astrid Borchert. Für ihre großartige Betreuung, die Geduld und Tipps im Labor aber auch für ihre Unterstützung abseits des Labors. Durch ein Lachen oder Gespräch wurde so manch lange Stunde oder schwierige Situation überbrückt.

Zudem möchte ich mich bei der gesamten AG Kühn für die vielen tollen Stunden und die stets offenen Ohren und vielen Anregungen und Antworten auf Fragen bedanken. Alles in allem bin ich glücklich, dass ich die Chance, die mir geboten wurde, genutzt habe. In den letzten Jahren habe ich viele spannende Erfahrungen machen dürfen, die ich nicht missen möchte.

Ein weiterer großer Dank geht an das Team aus dem IZW Berlin rund um Dr. Karin Müller. Es war mir stets eine große Freude gemeinsam mit allen im Labor zu arbeiten, zu diskutieren und nicht zuletzt viel zu lernen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Danke für die Aufmunterungen, wenn sie nötig waren und für das Gesellschaftleisten in der Bibliothek oder im Labor. Danke für die psychische und physische Unterstützung vor Ort, von weit weg und vom anderen Ende der Welt. Insbesondere möchte ich mich am Schluss bei meinen Eltern bedanken. Danke, dass Ihr stets für mich da seid, in guten wie in schlechten Zeiten, ob nah oder fern.