

**Etablierung von Mausstämmen defizient für die Selenoproteine  
mitochondriale Thioredoxin-Reduktase und  
Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase (PHGPx)  
und Charakterisierung einer Spermienkern-spezifischen  
Form der PHGPx**

Dissertation der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Marcus Conrad

eingereicht am 27. Juni 2001

**Etablierung von Mausstämmen defizient für die Selenoproteine  
mitochondriale Thioredoxin-Reduktase und  
Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase (PHGPx)  
und Charakterisierung einer Spermienkern-spezifischen  
Form der PHGPx**

Dissertation der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Marcus Conrad

Dissertation eingereicht am: 27. Juni 2001

Erstgutachter: Prof. Dr. Dirk Eick

Zweitgutachter: PD Dr. Hans Weiher

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Oktober 2001

**Meinen Eltern**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Einführung	1
1.2. Biosynthese von Selenoproteinen	2
1.3. Selenocystein-enthaltende Proteine und ihre Funktionen bei Säugetieren	4
1.3.1. Glutathion-Peroxidasen	4
1.3.2. Dejodinasen	6
1.3.3. Sonstige Selenoproteine	7
1.4. Thioredoxin-Reduktase (TR)	7
1.4.1. Expressionsmuster und Struktur der TR	8
1.4.2. Katalytischer Mechanismus der TR	8
1.4.3. Substrate der TR	9
1.4.4. Thioredoxin	10
1.5. Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase (PHGPx)	11
1.5.1. Gewebeexpression, Hierarchie und Struktur der PHGPx	11
1.5.2. Funktionen der PHGPx	12
1.5.3. PHGPx und Spermatogenese	13
1.6. Oxidativer Stress	14
1.7. Spermatogenese	17
1.8. Vorarbeiten	19
1.9. Fragestellung	20
<b>2. Material</b>	<b>22</b>
2.1. Bezugsquellennachweis	22
2.2. Material für Klonierungen	24
2.2.1. Plasmide und verwendete Oligonukleotide	24
2.2.2. Beschreibung der Klonierungsstrategien	27
<b>3. Methoden</b>	<b>32</b>
3.1. Prinzip der Etablierung von <i>knock-out</i> -Mäusen	32
3.2. Molekularbiologische Methoden	36
3.3. Sonstige Methoden	42
3.4. ES-Zellkultur	44

<b>4. Ergebnisse</b>	<b>50</b>
4.1. Thioredoxin-Reduktase 3	50
4.1.1. Klonierung und Sequenzierung der murinen TR3	50
4.1.2. Klonierung der <i>knock-out</i> -Konstrukte	51
4.1.3. ES-Zellkultur und Blastozysteninjektion	53
4.1.4. Etablierung von TR3 <i>knock-out</i> -Mäusen	55
4.2. PHGPx	58
4.2.1. Klonierung des murinen PHGPx-Gens	58
4.2.2. Klonierung der <i>Gene-Targeting</i> Konstrukte (Version 1)	58
4.2.3. ES-Zellkultur und Blastozysteninjektion	60
4.2.4. Chimärenproduktion und Rückkreuzung	61
4.2.5. Chimärenanalyse	63
4.2.6. Klonierung einer Spermienkern-spezifischen PHGPx	72
4.2.7. Klonierung der <i>Gene-Targeting</i> Konstrukte (Version 2)	77
4.2.8. ES-Zellkultur, Blastozysteninjektion und Rückkreuzung	78
<b>5. Diskussion</b>	<b>81</b>
5.1. Etablierung von Thioredoxin-Reduktase 3 defizienten Mäusen	81
5.2. Erster Versuch der Etablierung von PHGPx-defizienten Mäusen	83
5.2.1. Neue Funktionen der PHGPx in der Spermatogenese	85
5.2.2. Mosaik von testikulärer Atrophie bei PHGPx-Chimären	88
5.3. Zweiter Versuch der Etablierung von PHGPx-defizienten Mäusen	90
5.4. Ausblick	91
5.4.1. TR3 <i>knock-out</i>	91
5.4.2. PHGPx <i>knock-out</i>	92
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>93</b>
<b>7. Literatur</b>	<b>95</b>
<b>8. Anhang</b>	<b>106</b>
A Abkürzungsverzeichnis	106
B Lebenslauf	108
C Publikationen	109
D Danksagung	110

## 1. Einleitung

### 1.1. Einführung

Das Element Selen, welches bei der Aufarbeitung von sulfidischen Kupfererzen als Nebenprodukt auftritt, wurde 1817 von Jons Jacob Berzelius entdeckt. Diese rote, amorphe Substanz benannte er nach der griechischen Mondgöttin Selene. In der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts galt Selen noch als toxische, in gewissen Nutzpflanzen natürlich vorkommende Substanz [Franke, 1934], bevor festgestellt wurde, dass es in niedrigen Konzentrationen ein essentielles Spurenelement von Bakterien und höheren Organismen ist. Schwarz und Folz konnten 1957 durch die Fütterung von Ratten mit Selen-depletiertem Futter eine Lebernekrose mit Todesfolge induzieren [Schwarz und Folz, 1957]. Kurz zuvor wurde an Bakterien gezeigt, daß die Synthese der Formiat-Dehydrogenase u.a. von der Verfügbarkeit von Selenit abhängt [Pinsent, 1954]. Fast zwei Jahrzehnte später konnten mehrere Arbeitsgruppen gleichzeitig nachweisen, daß Selen integraler Bestandteil der bakteriellen Glycin-Reduktase [Turner und Stadtman, 1973] und Formiat-Dehydrogenase [Andreesen und Ljungdahl, 1973] sowie der Säugetier Glutathion-Peroxidase ist [Flohé et al., 1973, Rotruck et al., 1973]. Nukleotidsequenzanalysen ergaben, dass das Basentriplett UGA, das bis dahin ausschließlich als STOP-Kodon angesehen wurde, sowohl bei bakteriellen als auch bei eukaryontischen Genen das Kodon für die 21. Aminosäure Selenocystein (SeCys) ist [Zinoni et al., 1986, Chambers et al., 1986]. Die kotranslationale Inkorporation von SeCys erfordert mindestens vier Genprodukte und eine besondere RNA-Sekundärstruktur, das sogenannte SECIS-Element.

Bei Prokaryonten sind bisher 14 SeCys-enthaltende Enzyme bekannt. Bei Säugetieren werden nach [<sup>75</sup>Se]-Markierungen 30-50 SeCys-enthaltende Proteine [Behne et al., 1996] geschätzt, von denen nur für eine Minorität die Primärstruktur und die Funktion bisher ermittelt wurde. SeCys ist aufgrund seiner leichten Ionisierbarkeit Teil des reaktiven Zentrums von Selenoproteinen und in den meisten Fällen hängt die biologische Funktion der Selenoproteine von der Existenz des SeCys-Restes im aktiven Zentrum ab. Dies wurde in gezielten Mutagenese-Experimenten durch den Austausch von SeCys durch Cystein oder andere

Aminosäuren gezeigt. Dabei kommt es entweder zu einem völligen Verlust oder zu einer 100- bis 1000-fachen Reduktion der Enzymaktivität [Maiorino et al., 1995, Zhong et al., 2000].

Chronischer Selenmangel wird vor allem mit zwei endemischen Krankheiten, der Keshan-Krankheit in Teilen Chinas und der Kashin-Beck-Krankheit in Gebieten von Nord-China, Nord-Korea und Ost-Sibirien, in Verbindung gebracht. Coxsackie-Viren werden unter Selenmangelbedingungen virulent und die damit verbundene Keshan-Krankheit zeichnet sich v.a. durch eine chronische oder akute Herzinsuffizienz mit Herzvergrößerung aus [Diplock, 1987]. Dieses geht mit einer Arrhythmie und multifokalen Nekrosen des Myokards einher. Die Kashin-Beck-Krankheit, ausgelöst durch Selen-, möglicherweise kombiniert mit Jodmangel, ist charakterisiert durch eine multiple, fokale Chondronekrose, eine Atrophie von bestimmtem gestreiftem Muskelgewebe und eine chronische, degenerative Osteoarthritis [Litov, 1991].

Inwiefern Selenoproteine im Immunsystem bzw. bei der Initiation einer Entzündung, bei der Atherogenese, in der Schilddrüse und bei der männlichen Fertilität eine Rolle spielen, ist nur zum Teil verstanden. Die Funktionen der einzelnen SeCys-enthaltenden Proteine wird in den folgenden Kapiteln beschrieben. Hinweise auf die Bedeutung der einzelnen Selenoproteine *in vivo* und für die oben genannten Organsysteme erhielt man sowohl nach Selen-Depletion von Ratten und Mäusen als auch durch die gezielte Inaktivierung zweier Selenoproteine im Mausmodell.

## 1.2. Biosynthese von Selenoproteinen

Der Mechanismus der kotranslationalen Inkorporation von SeCys konnte zunächst anhand der bakteriellen Formiat-Dehydrogenase aufgeklärt werden [Böck et al., 1991 a/b]. Damit während der Translation UGA anstatt als STOP-Kodon als Kodon für SeCys erkannt wird, bedarf es vier spezifischer Genprodukte.

Die tRNA<sup>(ser)<sup>sec</sup></sup> (SeIC) wird [Leinfelder et al., 1988], im Gegensatz zu den übrigen 20 Aminosäuren, zunächst mit Serin durch die Seryl-tRNA-Synthetase beladen. Die Selenophosphat-Synthetase (SeID) synthetisiert aus Selenid und ATP Selen-Phosphat, welches die reaktive Form des Selens für die Konversion von Seryl-



tRNA<sup>(ser)sec</sup> zu Selenocysteyl-tRNA<sup>(ser)sec</sup> durch die Selenocystein-Synthase (SelA) darstellt. Ein GTP-abhängiger, dem Elongations-Faktor Tu (EF-Tu) ähnlicher Elongations-Faktor (SelB) konnte durch Komplementation von *E. coli* Mutanten kloniert werden [Forchhammer et al., 1989]. SelB bindet spezifisch Selenocysteyl-tRNA<sup>(ser)sec</sup> und dirigiert sie bei gleichzeitiger Interaktion mit dem SECIS-Element an die Ribosomen, wodurch die Inkorporation des SeCys in die wachsende Polypeptidkette erfolgen kann. Die Inkorporation des SeCys ist somit von der Existenz des sogenannten SECIS-Elements 3' von dem UGA-Kodon abhängig [Heider et al., 1992]. Die stamm- und schleifenförmige RNA-Sekundärstruktur des SECIS-Elements ist bei Eubakterien immer direkt 3' oder maximal ein Kodon hinter dem SeCys-Kodon lokalisiert. Hingegen ist das SECIS-Element bei Archaeobakterien und Eukaryonten immer im 3' untranslatierten Bereich der mRNA in einem Abstand von 500 Bp bis zu 5 kbp vom SeCys-Kodon entfernt zu finden [Wilting et al., 1977, Berry et al., 1993]. Im Gegensatz zu Prokaryonten ist bei Säugern die Inkorporation von SeCys noch von mindestens einem weiteren Faktor (SECIS Binding Protein, SBP-2) abhängig [Copeland et al., 2000], der mit dem SECIS-Element und dem kürzlich klonierten SelB Säugetier-Homolog interagieren kann [Fagegaltier et al., 2000, Tujebajeva et al., 2000].

Die Effizienz der Dekodierung des UGA-Kodons mit Selenocystein wurde am SECIS-Element der bakteriellen Formiat-Dehydrogenase gemessen und lag bei 5% SeCys-Inkorporation verglichen mit einer vorzeitigen Terminierung (95%) an dieser Stelle. Die EF-Tu-vermittelte Serin-Inkorporation ergab hingegen an derselben Position nach Umwandlung von UGA zu einem SeCys-Kodon eine 95-prozentige Inkorporationseffizienz [Suppmann et al., 1999].

Eine Hierarchie innerhalb der Selenoproteine wurde anhand von Tierexperimenten belegt [Burk und Hill, 1993]. Bei Selen-Depletion beobachtet man eine Umverteilung des Selens im Körper und je nach Organ eine unterschiedliche Reduktion individueller Selenoproteine mit unterschiedlichen Kinetiken. Dabei werden Selenoproteine, die hoch in der Hierarchie stehen, möglichst lange in den entsprechenden Geweben zurückgehalten. Dieser Prozess kann durch Selen-Supplementation umgekehrt werden, wobei potenziell wichtige Selenoproteine selektiv schneller als weniger wichtige synthetisiert werden. Das SECIS-Element spielt möglicherweise bei der Regulation der Translation von Selenoproteinen in Abhängigkeit von der Selenverfügbarkeit eine weitere Rolle.

### 1.3. SeCys-enthaltende Proteine und ihre Funktionen bei Säugetieren

Methanogene Archaeobakterien, diverse Gruppen von Eubakterien und mehrere Vertreter der Eukaryonten sind in der Lage, Selenoproteine zu synthetisieren. Die Anzahl der SeCys-enthaltenden Selenoproteine wird nach [<sup>75</sup>Se]-Markierungen bei Säugern auf 30 bis 50 geschätzt [Behne et al., 1988, Behne et al., 1996 a]. Durch Datenbankvergleiche wurden unter Zuhilfenahme der Sequenz des konservierten Teils des SECIS-Elements die cDNA's einiger Selenoproteine identifiziert und durch funktionelle Tests verifiziert [Lescure et al., 1999, Kryukov et al., 1999]. Nur für einen Bruchteil der mit [<sup>75</sup>Se] markierten Selenoproteine bei Säugetieren wurde bisher jedoch eine Primärstruktur ermittelt und eine mögliche Funktion eindeutig zugeordnet (Tabelle 1).

Der Hauptanteil der bisher charakterisierten Selenoproteine bei Säugetieren können der Glutathion-Peroxidase-, Thioredoxin-Reduktase- oder der Dejodinase-Familie zugeordnet werden. Die Mitglieder der Glutathion-Peroxidase-Familie spielen in der Abwehr von reaktiven Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*, ROS) eine Rolle und sind zum Teil auch in Entzündungsprozessen und der Spermatogenese involviert. Die primäre Funktion der Thioredoxin-Reduktasen ist die Bereitstellung von reduziertem Thioredoxin, welches ein Koenzym bei einer Vielzahl von zellulären Prozessen ist. Die Dejodinasen sind für die Aktivierung bzw. Inaktivierung des Schilddrüsenhormons Thyroxin bzw. Trijodthyronin verantwortlich.

Die Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase und die (mitochondriale) Thioredoxin-Reduktase werden aufgrund ihrer Bedeutung für diese Arbeit weiter unten beschrieben (siehe 1.5 und 1.6).

#### 1.3.1. Glutathion-Peroxidasen

Alle Glutathion-Peroxidasen sind in der Lage, unter Verwendung von reduziertem Glutathion  $H_2O_2$  und Alkylhydroperoxide zu  $H_2O$  bzw. zu den entsprechenden Alkoholen zu reduzieren. Sie sind somit maßgeblich an der Abwehr von oxidativen Schäden an Zellbestandteilen beteiligt.

Die Gewebeverteilung der cGPx (Tabelle1) unter Selen-adäquaten Bedingungen ist ubiquitär, unter Selenmangel hingegen wird die cGPx überhaupt nicht mehr oder nur marginal exprimiert.

**Tabelle 1: Identifizierte Selenoproteine bei Säugetieren und ihre mögliche Funktionen.**

Selenoprotein	mögliche Funktion(en)	Referenz
cytosolische Glutathion-Peroxidase (cGPx oder GPx-1)	Reduktion von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und organischen Hydroperoxiden	Mills, 1957
gastrointestinale Glutathion-Peroxidase (gi-GPx oder GPx-2)	"	Chu et al., 1993
Plasma-Glutathion-Peroxidase (pGPx oder GPx-3)	"	Takahashi et al., 1987
Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase (PHGPx oder GPx-4)	Reduktion von Phospholipid- und Cholesterinhydroperoxiden u.a.	Ursini et al., 1982
cytosolische Thioredoxin-Reduktase (TR 1)	Reduktion von oxidiertem Thioredoxin u.a.	Tamura und Stadtman, 1996
Testis-spezifische Thioredoxin-Glutathion-Reduktase (TGR oder TR2)	"	Sun et al., 2001
mitochondriale Thioredoxin-Reduktase (neuerdings TR 3)	"	Miranda-Vizuete et al., 1999
Typ I 5'-Dejodinase (5'-DI)	Dejodierung von T4 zu T3, rT3 zu 3,3'-T2 und T3 zu 3,3'-T2	Arthur et al., 1990
Typ II 5'-Dejodinase (5'-DII)	Dejodierung von T4 zu T3	Davey et al., 1995
Typ I 5'-Dejodinase (5'-DIII)	Dejodierung von T4 zu rT3 und T3 zu 3,3'-T2	Croteau et al., 1995
Selenophosphat-Synthetase (SeID)	Bereitstellung von Selenophosphat	Guimaraes et al., 1996
Selenoprotein P (SeIP)	Reduktion von Peroxinitrit und Phospholipidhydroperoxiden (?)	Motsenbocker und Tappel, 1984 Yang et al., 1987
15 kDa-Selenoprotein	unbekannt	Gladyshev et al., 1998
Selenoprotein W	unbekannt	Vendeland et al., 1995
Selenoproteine N, R, T, X	unbekannt	Lescure et al., 1999, Kryukov et al., 1999

Dasselbe Expressionsverhalten trifft für die pGPx zu, die extrazellulär lokalisiert ist und von Geweben mit intensivem Kontakt zu Körperflüssigkeiten wie der Niere exprimiert wird. Die von der Selenversorgung unabhängig exprimierte und deshalb hoch in der Hierarchie der Selenoproteine stehende gi-GPx wird fast ausschließlich im Epithel des Gastrointestinaltrakts synthetisiert [Wingler et al., 2000].

Derzeit wird kontrovers diskutiert, ob die vier GPx ausschließlich ein System zum Schutz vor oxidativem Stress darstellen. Besonders fraglich ist das für die Aktivität der pGPx mit den limitierenden Mengen an extrazellulärem, reduziertem GSH (etwa 30  $\mu\text{M}$ ) [Übersicht in Brigelius-Flohé, 1999]. Es werden hingegen alternative Funktionen diskutiert wie die Modulation der Lipoxygenase-Aktivität durch pGPx. (siehe auch 1.5). Die Funktion der gi-GPx ist ungeklärt. gi-GPx-defiziente Mäuse zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp [Esworthy et al., 2000].

Der cytosolischen GPx wird eine Vielzahl von Funktionen bei Hydroperoxid-vermittelten zellulären Ereignissen zugeschrieben. Hydroperoxid-induzierte Apoptose in diversen Zelllinien oder der durch Wachstumsfaktor-Entzug induzierte Zelltod bei Pro-B-Lymphozyten, vermittelt durch den intrazellulären Anstieg von Hydroperoxiden, konnte durch Überexpression von GPx-1 verhindert werden. Die Ursache und Bedeutung der bei HIV-infizierten Patienten erniedrigten GSH/GPx-1 Spiegel in T Lymphozyten, ist noch unklar. Eine Modulation der Cyclooxygenase-Aktivität über den intrazellulären Peroxidtonus wird ebenfalls diskutiert, wird aber aufgrund der weitaus größeren Aktivität der PHGPx gegenüber Alkylhydroperoxiden eher der PHGPx zugeschrieben [Übersicht in Brigelius-Flohé, 1999; siehe auch 1.5.].

### **1.3.2. Dejodinase-Familie**

Bei den drei bisher klonierten Dejodinasen handelt es sich ebenfalls um Selenoproteine, wobei die 5'-DI und 5'-DII die Aktivierung des Prohormons Thyroxin (T4) zu aktivem Schilddrüsenhormon 3,3',5-Trijodthyronin (T3) gewährleisten und die 5'-DIII T3 zu nicht-reaktiven Metaboliten inaktiviert. Die drei Dejodinasen unterscheiden sich in ihrer Gewebespezifität und in ihrem Reaktionsmechanismus [Übersichten in Köhrle, 1999 und 2000].

### 1.3.3. Sonstige Selenoproteine

Selenoprotein P (SeP) ist insofern ein außergewöhnliches Selenoprotein, als es je nach Selenverfügbarkeit 10 Selenocysteinreste pro Molekül enthält [Übersicht in Mostert, 2000]. SeP ist ausschließlich im Plasma lokalisiert und enthält 50% des Plasmaselens. Für die Inkorporation von Selenocystein befinden sich im 3'-untranslatierten Bereich der mRNA zwei SECIS-Elemente. Aufgrund des hohen Selengehalts wurde es ursprünglich für ein Selen-Transportprotein gehalten, was aber durch Fütterungsversuche mit radioaktiv markiertem SeP nicht bestätigt werden konnte. Ob die durch die Histidin-Cluster des SeP vermittelte Bindungskapazität von Nickel oder Zink eine signifikante physiologische Funktion hat, ist unklar.

Peroxynitrit, gebildet aus einem Superoxid-Anion und einem Stickstoffmonoxid-Radikal, ist ein reaktives *in vivo*-Intermediat und wichtiger Mediator von inflammatorischen Prozessen. Peroxynitrit kann *in vitro* sehr effizient von SeP detoxifiziert werden. Unbekannt ist bislang, welcher physiologische Elektronendonator für die Reduktion verantwortlich sein könnte. Es wird auch spekuliert, dass SeP durch seine Phospholipid-Hydroperoxid-Reduktase-Aktivität und seine Gewebe-Expression in Gehirn, Pankreas, Herz- und Skelettmuskel antioxidative Eigenschaften besitzt. Die Expression des SeP kann durch proinflammatorische Cytokine und *Transforming Growth Factor  $\beta$*  herunterreguliert werden [Mostert et al., 1999].

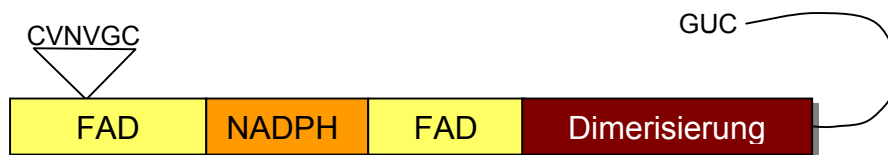
Für die Selenoproteine W, N, R, T und das 15 kD-Selenoprotein konnten bisher zwar die Primärstrukturen entschlüsselt werden, ihre jeweiligen Funktion lassen sich aber noch nicht zuordnen.

### 1.4. Thioredoxin-Reduktase

Die Mitglieder der Thioredoxin-Reduktase-Familie (TR) bei Eukaryonten sind im Gegensatz zum bakteriellen Homolog in *E. coli* allesamt SeCys-enthaltende Pyridin-Nukleotid-Disulfid-Oxidoreduktasen [Übersicht in Mustacich und Powis, 2000]. Mittlerweile konnten bei Säugetieren drei unabhängige TR kloniert werden (Tabelle 1), von welchen wiederum für die TR1 und TR3 jeweils mehrere N-terminale Spleißvarianten durch Datenbankrecherchen identifiziert wurden [Lescure et al., 1999, Sun et al., 2001 b].

### 1.4.1. Expressionsmuster und Struktur der TR

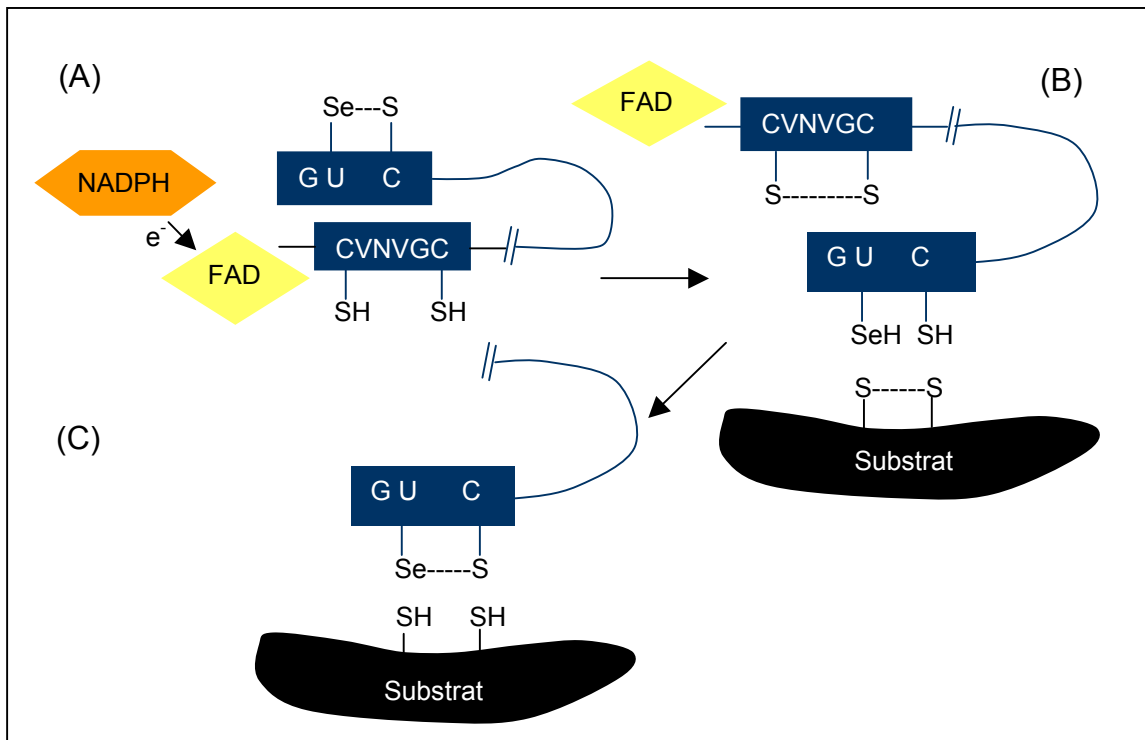
TR1 und TR3 werden ubiquitär exprimiert, wogegen die TR2 bzw. Thioredoxin-Glutathion-Reduktase (TGR), ausschließlich in Testis gefunden wird [Sun et al., 1999, Sun et al., 2001 a/b]. Die menschlichen TR1 und TR2 besitzen zu 80% eine identische Aminosäuresequenz, wohingegen die TR3, welche am stärksten homolog zur *Drosophila melanogaster* TR ist, etwa 50 % identisch zu den beiden anderen ist [Sun et al., 2001 b]. Wie auch die Glutathion-Reduktase gehört die TR zur Familie der Flavoproteine. Die TR liegen immer als Homodimere vor und jedes Monomer trägt als prosthetische Gruppe ein Molekül FAD. Ein vereinfachtes Modell der TR ist in Abb. 1 skizziert.



**Abb. 1: Prinzipieller Aufbau der TR-Domänen.** N-terminal befindet sich eins der beiden konservierten, katalytischen Zentren mit den beiden Cystein-Resten. Die TR besitzt eine hohe Homologie zur Glutathion-Reduktase, der allerdings die C-terminale Verlängerung mit dem SeCys Rest (U) fehlt. (FAD = FAD-Bindedomäne; NADPH = NADPH-Bindedomäne)

### 1.4.2. Katalytischer Mechanismus der TR

Der katalytische Mechanismus der TR ist in Abb. 2 schematisch dargestellt. Das Reduktionsäquivalent  $\text{NADPH}/\text{H}^+$  bindet zunächst an der entsprechenden N-terminalen Domäne der TR. Die Elektronen werden dabei auf das prosthetische FAD übertragen, welches dann die beiden Cystein-Reste in der N-terminalen katalytischen Region reduziert (Abb. 2 A). Daraufhin können die Elektronen vom N-terminalen katalytischen Zentrum durch die freie Beweglichkeit des C-Terminus auf die konservierten, oxidierten Cystein- und SeCys-Reste übertragen werden (B). Bei den Säugetier-TR ist SeCys immer an vorletzter Aminosäureposition zu finden. Beim letzten katalytischen Schritt werden die Elektronen auf das zu reduzierende Substrat übertragen (C). Als Substrat kommen aufgrund der freien Rotationsmöglichkeit des C-Terminus sehr viele Verbindungen in Frage.



**Abb. 2: Postulierter katalytischer Reaktionsmechanismus der TR** [modifiziert nach Gromer et al., 1998].

Die Abspaltung des C-Terminus der TR durch Carboxypeptidase-Behandlung führt zu einer völligen Inaktivierung des Enzyms [Zong et al., 1998].

Eine Regulation der TR-Aktivität erfolgt *in vitro* und *in vivo* eher auf posttranskriptioneller als auf transkriptioneller Ebene [Gallegos et al., 1997, Berggren et al., 1997]. Die Stabilität der TR1 mRNA kann durch die AU-reichen Elemente im 3' nichttranslatierten Bereich, die sonst nur in mRNA's von Cytokinen und Proto-onkogenen mit einer hohen Umsatzrate vorkommen, reguliert werden [Gasdaska et al., 1999].

### 1.4.3. Substrate der TR

Aufgrund der breiten Substratspezifität kann die TR eine Reihe von nieder- und hochmolekularen Molekülen reduzieren [Übersicht in Holmgren und Björnstedt, 1995]. Beispiele hierfür sind neben 5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB), Selenodiglutathion, Selenit, Liponsäure [Arnér et al., 1996], Lipidhydroperoxiden [Björnstedt et al., 1995], das cytotoxische Peptid NK-Lysin [Andersson et al., 1996], Vitamin K<sub>3</sub> [Holmgren, 1979] und auch das Tumorsuppressorgen-Produkt p53 [Casso und Beach, 1996]. Ob dies physiologische Substrate der TR sind, ist unbekannt.

Außerdem kann die TR reduziertes Ascorbat aus den oxidierten Vorstufen Dehydroascorbinsäure oder ascorbylfreies Radikal bereitstellen und trägt somit zum Recycling von Ascorbat, einem zellulären Antioxidans, bei [May et al., 1997].

Das eigentliche Substrat, oxidiertes Thioredoxin (Trx), soll wegen der herausragenden Bedeutung für zahlreiche zelluläre Prozessen anschließend detaillierter beschrieben werden.

#### 1.4.4. Thioredoxin (Trx)

Das Hauptsubstrat der TR, Thioredoxin (Trx1), wurde 1967 zum ersten Mal als 10 kDa großes Redoxprotein in Ratten-Tumoren beschrieben [Moore, 1967]. Erst kürzlich konnte das Gen für ein mitochondriales Thioredoxin (Trx2) kloniert werden [Spyrou et al., 1997]. Die konservierte katalytische Domäne von Trx enthält die Aminosäuren (-W-C-G-P-C-K-), wobei die beiden Cystein-Reste alternierend oxidiert und reduziert werden können [Übersicht in Powis et al., 2000].

Trx1 ist hauptsächlich im Cytosol lokalisiert, kann aber nach Aktivierung von NF $\kappa$ B in den Kern translozieren, indem es an NF $\kappa$ B bindet.

Eine der ersten bekannten Funktionen von bakteriellem Trx ist die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten für die Ribonukleotid-Reduktase [Laurent et al., 1964]. Trx wird von Lymphozyten, Hepatocyten, Fibroblasten und Tumorzellen sezerniert. Trx stimuliert die Proliferation von Lymphozyten, Fibroblasten und einige Tumorzellen. Trx induziert auch die Expression von einer Vielzahl von Cytokinen [Übersicht in Powis et al., 2000]. Überexprimiertes Trx inhibiert ähnlich wie bcl2 die Apoptose von lymphoiden Zellen [Baker et al., 1997]. Trx vermag in reduziertem Zustand an MAPKKK (*Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase*) zu binden und dadurch die TNF $\alpha$ -induzierte Apoptose zu inhibieren, die letztlich über c-Jun-N-terminale-Kinase und p36 vermittelt wird [Saitoh et al., 1998].

Vermutlich reguliert Trx die Wirkung zahlreicher Transkriptionsfaktoren. Die DNA-Affinität von NF $\kappa$ B hängt von dem Redoxstatus eines spezifischen Cysteins an Position 62 der kleinen Untereinheit p50 ab [Qin et al., 1995]. NF $\kappa$ B kann nur dann an die DNA binden, wenn Cys<sup>62</sup> reduziert ist. Der in Zusammenhang mit Wachstum stehende Transkriptionsfaktor AP-1 wird ebenfalls über Redoxvorgänge reguliert, wobei Trx allerdings indirekt über ein weiteres im Kern lokalisiertes Redoxprotein, Ref-1, seine Funktion ausübt [Abate et al., 1990]. Liegt ein spezifischer, N-terminaler



Cystein-Rest des Ref-1 in reduzierter Form vor, kann Ref-1 die Bindungsaffinität von AP1 zu DNA erhöhen.

Für eine neue Klasse von Peroxidasen, den sogenannten Peroxiredoxinen, ist reduziertes Trx vermutlich die einzige Elektronenquelle. Peroxiredoxine sind keine Selenoproteine, werden aber indirekt durch ihre Abhängigkeit von reduziertem Trx von Selenoproteinen reguliert [Rhee et al., 1999; siehe auch 1.6].

Die Bedeutung von Trx1 *in vivo* konnte mit Hilfe transgener Mäuse gezeigt werden. Heterozygote Trx1 *knock-out*-Mäuse zeigen keine offensichtlichen Defekte, wohingegen homozygote Embryos sich nicht einmal bis zum Stadium der Gastrula entwickeln können. Die innere Zellmasse zeigt bei *in vitro* kultivierten, homozygoten Trx1 *knock-out*-Embryonen massive Proliferationsdefekte, was die außerordentliche Stellung von Trx1 in der Entwicklung des Mäuseembryos verdeutlicht [Matsui, et al., 1996].

Die Überexpression von Trx1 reduzierte nicht nur das Ausmaß von Hirnschäden sondern auch die Protein-Oxidation im Hirn von Mäusen bei Ischämie [Takagi et al., 1999].

## 1.5. Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase (PHGPx)

Die Familie der Selen-abhängigen Glutathion-Peroxidasen besteht aus drei tetrameren Glutathion-Peroxidasen und der monomeren PHGPx [Übersichten in Ursini et al., 1997 und Brigelius-Flohé, 1999]. PHGPx wurde ursprünglich von Ursini und seinen Kollegen (1982) als „Peroxidation-inhibierendes-Protein“ beschrieben.

### 1.5.1. Gewebeexpression, Hierarchie und Struktur der PHGPx

Die PHGPx ist ubiquitär, besonders stark in Testis gefolgt von Niere, Herz, Leber und Hirn exprimiert (Abb. 22). Von der PHGPx wurden aus diversen Spezies bisher sowohl eine cytoplasmatische als auch eine mitochondriale Form kloniert [Esworthy et al., 1994].

Die PHGPx steht hoch in der Hierarchie der Selenoproteine, wie in Fütterungs-Versuchen an Ratten ermittelt wurde [Weitzel et al., 1990]. Selen-Depletions-

Experimente zeigten, dass die Menge an PHGPx in Testis und Hirn dadurch nur in geringerem Ausmaße abnimmt. Die daraus ermittelte Gewebe-Hierarchie ergab, daß die PHGPx-Aktivität unter Selenmangelbedingungen in Hirn und Testis gefolgt vom Herzen am längsten aufrechterhalten wird. In Leber, Niere und Lunge wird ein vergleichsweise schneller Abfall der Enzymaktivität beobachtet, jedoch nicht in dem Umfang wie für die cGPx.

Die Homologie der 23 kDa großen PHGPx zu den anderen GPx beträgt weniger als 30%. Wie auch bei den übrigen GPx besteht die katalytische Triade aus den drei Aminosäuren Selenocystein, Tryptophan und Glutamin, die für die volle Aktivität essentiell sind [Maiorino et al., 1990]. Im Gegensatz zu den anderen GPx fehlen bei der PHGPx die das katalytische Zentrum umgebenden Arginine, die für die Bindung des Elektronendonors GSH verantwortlich sind. Dies begründet die breite Spezifität der PHGPx bezüglich des Elektronendonors und auch ihre Fähigkeit, unter GSH-Mangel andere Proteinthiole zu oxidieren [Ursini et al., 1995].

### 1.5.2. Funktionen der PHGPx

Bereits 1989 konnten Ursini und Mitarbeiter synergistische, inhibierende Effekte von PHGPx und Vitamin E gegen eine durch Eisenionen induzierte mikrosomale Lipidperoxidation zeigen [Maiorino et al., 1989].

PHGPx ist neben pGPx die einzige Selen-abhängige GPx, die effizient Phospholipid-Hydroperoxide mit GSH als physiologischem Elektronendonator zu den entsprechenden Alkoholen reduzieren kann [Maiorino et al., 1990]. Dabei werden pro Mol Hydroperoxid zwei Mol GSH oxidiert, das durch die NADPH-abhängige GSH-Reduktase in reduzierter Form bereitgestellt wird.

Aufgrund der breiten Substratspezifität ist die PHGPx nicht nur an der GSH-abhängigen Detoxifikation von Phospholipid-, Cholesteryl- und Alkylhydroperoxiden beteiligt, sondern erfüllt darüber hinaus bei vielen zellulären Prozessen die unterschiedlichsten Funktionen (Abb. 3).

Die PHGPx vermag mit GSH als Elektronendonator sehr effizient HDL- und LDL- (*High* bzw. *Low Density Lipoprotein*) assoziierte Phospholipid-Hydroperoxide und peroxidierte Cholesterylester zu reduzieren [Sattler et al., 1994], die möglicherweise bei der Initiation von arteriosklerotischen Läsionen eine bedeutende Rolle spielen [Steinberg, 1997].

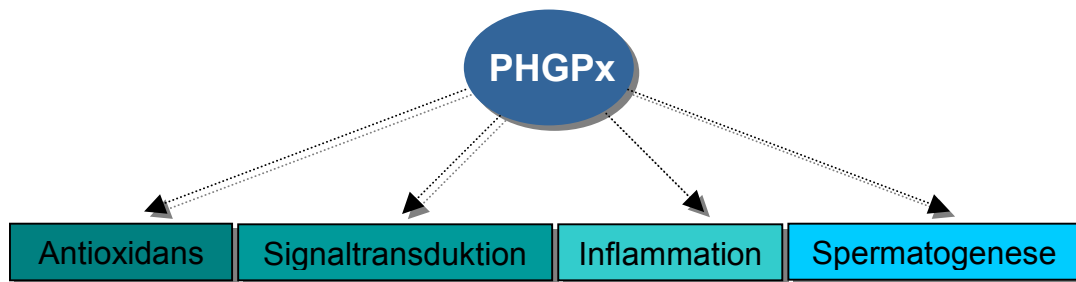


Abb. 3: Funktionen der PHGPx.

In einer humanen, endothelialen Zelllinie konnte die IL-1 induzierte Aktivierung von NF $\kappa$ B durch Überexpression von PHGPx stark abgeschwächt werden [Brigelius-Flohé et al., 1997 a]. Selen-defiziente Zellen reagieren empfindlicher auf eine TNF $\alpha$ -induzierte NF $\kappa$ B-Aktivierung [Makropoulos et al., 1996]. Dass dies einer verminderten PHGPx-Aktivität zugeschrieben werden kann, erscheint plausibel, da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder andere Lipidhydroperoxide an der Aktivierung von NF $\kappa$ B durch Cytokine beteiligt sind [Bäuerle und Henkel, 1994].

Die Enzym-Aktivität der Produkt-aktivierten Lipoxygenasen und Cyclooxygenasen im Arachidonsäure-Metabolismus [Übersicht in Voet und Voet, 1992], die allesamt Lipidhydroperoxid-Intermediate generieren, konnte *in vitro* durch PHGPx abgeschwächt werden [Schnurr et al., 1996, Sakamoto et al., 2000]. Fütterungs-Versuche von Ratten deuten darauf hin, dass die PHGPx für die Modulation dieser Enzymaktivitäten verantwortlich ist [Weitzel und Wendel, 1993], Diese Hypothese wurde durch Überexpression von PHGPx *in vitro* verifiziert [Imai et al., 1998].

### 1.5.3. PHGPx und Spermatogenese

In neueren Arbeiten wurde gezeigt, dass die PHGPx bei der Spermatogenese (siehe auch unter 1.7) eine herausragende Rolle spielt. Ein Zusammenhang zwischen Selenstatus und männlicher Fertilität ist schon länger bekannt. In Fütterungs-Experimenten an Nagetieren mit Selen-defizientem Futter werden mit fortschreitender Selendefizienz massive morphologische Änderungen sowohl im Keimepithel als auch in der Morphologie von Spermatozoen beobachtet, die mit einer

starken Beeinträchtigung der männlichen Fertilität einhergehen [Wallace et al., 1983 a, Watanabe und Endo, 1991, Behne et al., 1996 b].

In reifen Spermatozoen wird der überwiegende Anteil des Selens in Mitochondrien gefunden [Pallini und Bacci, 1979]. Die Mitochondrien in den Spermatozoen sind in eine Keratin-ähnliche Matrix aus mehreren Proteinen (mitochondriale Kapsel) eingebettet und um das Axonem des Mittelstücks gewickelt [Wallace et al., 1983 b]. Ein Cystein-reiches Protein, welches mit der mitochondrialen Kapsel assoziiert ist, wurde ursprünglich als Selenoprotein betrachtet, besitzt jedoch kein im Leseraster befindliches UGA-Kodon [Adham et al., 1996, Cataldo et al., 1996]. Die Analyse von Kapsel-assoziierten Proteinen unter stark reduzierenden Bedingungen zeigte, dass es sich bei dem mitochondrialen Selenoprotein um enzymatisch inaktive, multimerisierte PHGPx handelt [Ursini et al., 1999]. Dadurch konnte das Phänomen der gestörten Morphologie von Spermatozoen vor allem in den Mittelstücken bei Selendefizienz erklärt werden.

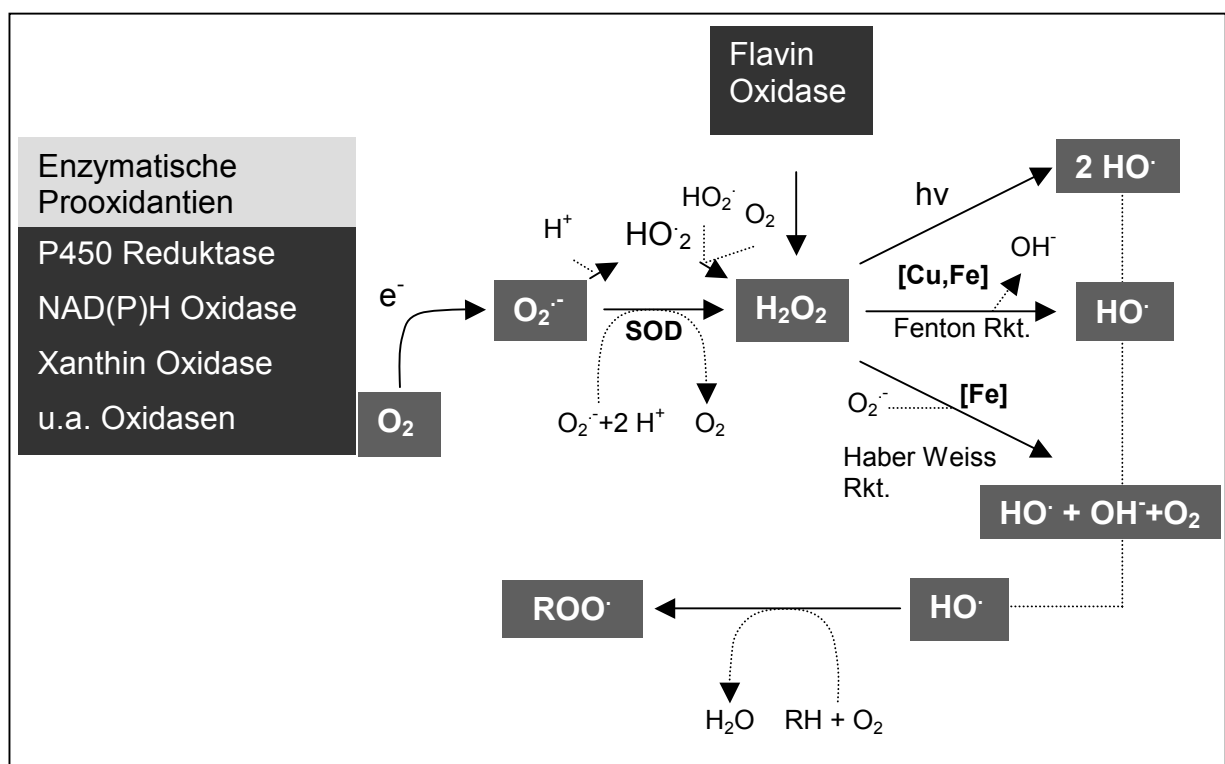
In elektronenmikroskopischen Studien mit Immunogold konnte gezeigt werden, dass die PHGPx auch an das Chromatin von isolierten Spermienkernen gebunden ist. Dies legte die Vermutung nahe, dass die PHGPx durch die räumliche Nähe und ihre breite Substratspezifität an der Protamin-Quervernetzung und somit bei der Chromatin-Kondensation während der Spermiogenese beteiligt sein könnte [Godeas et al., 1996].

Somit erfüllt die PHGPx während der Spermienreifung möglicherweise drei Funktionen: Kondensation des Chromatins durch Protamin-Quervernetzung, mechanische Stabilität der Spermienmittelstücke und Schutz der männlichen Keimbahn vor oxidativen Schäden.

## **1.6. Oxidativer Stress**

Viele der Selenoproteine besitzen aufgrund des reaktiven SeCys-Restes im katalytischen Zentrum potenzielle antioxidative Eigenschaften, und deshalb sollen in diesem Kapitel die grundlegenden Prinzipien der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die ihnen entgegenstehenden antioxidativen Enzymsysteme dargestellt werden.

Der oxidative Katabolismus von Glukose ist zwar hoch effizient, generiert jedoch in der mitochondrialen Atmungskette bei der Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser gleichzeitig ROS, die entgiftet werden müssen. Solche ROS können u.a. Lipide, Kohlenhydrate und Proteine oxidieren, was zur oxidativen Modifikation von einzelnen Aminosäureresten, Multimerisierung von Proteinketten und zur Fragmentierung von Proteinen führen kann [Übersicht in Berlett und Stadtman, 1997]. ROS können auch Schäden an der DNA durch Modifikationen am Zuckergerüst oder an den Basen induzieren [Übersicht in Imlay und Stuart, 1988, Lindahl, 1993]. Eine Übersicht über die prinzipielle Entstehung von ROS bei Säugetieren ist in Abb. 4 gegeben.



**Abb. 4: Entstehung von ROS aus molekularem Sauerstoff** [modifiziert nach Steiling et al., 1999].

Das durch eine Ein-Elektronen-Reduktion aus  $H_2O_2$  entstehende Hydroxyl-Radikal ( $HO^{\cdot}$ ) ist die reaktivste, aktivierte Sauerstoffstufe und kann aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit und starken Reaktivität seine Toxizität nur lokal entfalten. Hingegen kann  $H_2O_2$  über größere Strecken diffundieren und stellt somit immer eine potenzielle Quelle von  $HO^{\cdot}$  dar [Übersicht in Ohlenschläger, 1995]. Neben dem Superoxid-Anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), Perhydroxyl-Radikal ( $HO_2^{\cdot}$ ), Hydroxyl-Radikal ( $HO^{\cdot}$ ) und Wasserstoffperoxid kommt es nach der Lipidperoxidation im Lipidmilieu sekundär zur Entstehung von Lipid- ( $L^{\cdot}$ ) und Perhydroxylradikalen ( $LOO^{\cdot}$ ).

Den ROS werden aber nicht nur toxische Effekte zugeschrieben. In geringen Mengen sind sie auch als Mediatoren bei einer Vielzahl von Gen-Regulationen und Signaltransduktions-Kaskaden beteiligt [Lander, 1997, Übersicht in Allen und Tresini, 2000]. Außerdem werden ROS gezielt zur Keimabwehr generiert und sezerniert.

Neben den niedermolekularen Radikalfängern entstanden im Laufe der Evolution eine ganze Reihe von antioxidativen Systemen. Bei den niedermolekularen, nicht-enzymatischen Radikalfängern handelt es sich meist um Vitamine (E, C), natürlich vorkommende Naturstoffe (Flavonoide, Carotinoide, etc.) und organische endogene Moleküle (L-Cystein, L-Methionin, Selenocystein, GSH etc.).

Die wichtigsten antioxidativen Enzyme sind in Tabelle 2 aufgelistet.

**Tabelle 2: Übersicht über die bisher bekannten antioxidativen Enzymsysteme bei Säugern.**

Antioxidatives Enzym	Funktion	Referenz
Katalasen	$2 \text{H}_2\text{O}_2 \Rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	Übersicht in Michels et al., 1994
Superoxid-Dismutasen (Mn-/CuZn-haltig)	$2 \text{O}_2^{\cdot -} + 2 \text{H}^+ \Rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	Übersicht in Warner, 1994
Selen-abhängige GSH-Peroxidasen	GSH-abhängige Reduktion von $\text{H}_2\text{O}_2$ zu $\text{H}_2\text{O}$ bzw. LOOH zu den entsprechenden Alkoholen	Brigelius-Flohé, 1999
Selen-abhängige PHGPx	GSH-abhängige Reduktion von (P)LOOH und Cholesterylhydroperoxide zu den entsprechenden Alkoholen	Ursini et al., 1982
Selen-unabhängige GSH-Peroxidase (= 1-Cys Peroxiredoxin)	GSH-abhängige Reduktion von $\text{H}_2\text{O}_2$ und (P)LOOH zu den entsprechenden Alkoholen	Fisher et al., 1999
Thioredoxin-Reduktasen	NADPH-abhängige Reduktion von $\text{H}_2\text{O}_2$	Holmgren und Björnstedt, 1995
Selenoprotein P	schwache PHGPx-Aktivität und Reduktion von Peroxynitrit	Mostert, 2000
Trx-abhängige Peroxiredoxine	Trx-abhängige Reduktion von $\text{H}_2\text{O}_2$ zu $\text{H}_2\text{O}$ bzw. (P)LOOH zu den entsprechenden Alkoholen	Chae et al., 1994
GSH-S-Transferasen	$(\text{P})\text{LOOH} + \text{GSH} \Rightarrow (\text{P})\text{LOH} + \text{GSOH}$ $\text{GSOH} + \text{GSH} \Rightarrow \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O}$ (PHGPx-Aktivität)	Hurst et al., 1998

(P)LOOH = (Phospho)Lipid-Hydroperoxid

Ein dritter zellulärer Schutzmechanismus, die Bildung von toxischen Mengen von ROS zu verhindern, ist die Bindung von katalytisch wirksamen Übergangsmetallen, die die Entstehung des Hydroxylradikals (s. Abb. 4) in einer Haber-Weiss- oder in der Fenton-Reaktion fördern. Beispiele von Übergangsmetall-bindenden Proteinen sind Transferrin, das Eisen binden und transportieren kann, und Metallothioneine mit einem Cysteingehalt von 22-33 mol %, die Schwermetalle binden können und effiziente Radikalfänger sind.  $\alpha$ -Liponsäure, ein Koenzym des Pyruvat-Dehydrogenasekomplexes, ist in der reduzierten Form Radikalfänger oder auch Metall-Chelator. GSH und Trx wirken neben ihrer Funktion als Koenzym auch als Radikalfänger.

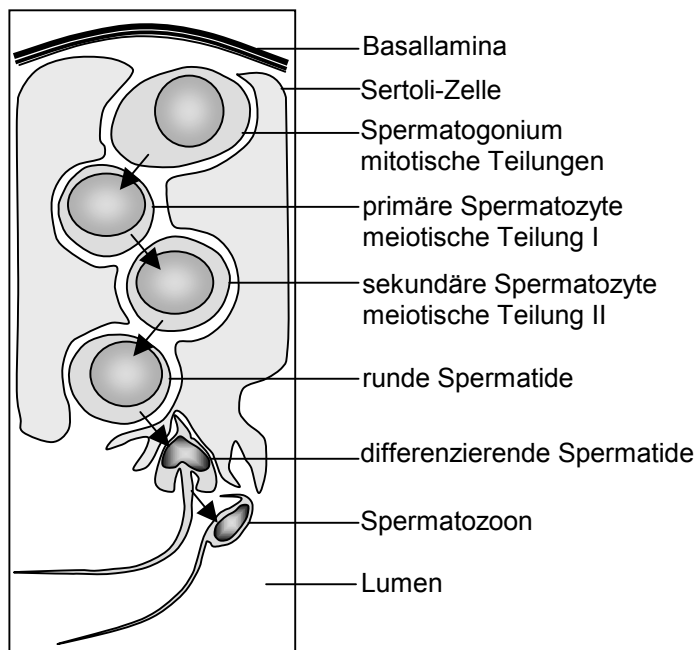
Glutaredoxin (Grx) ist ein ubiquitär exprimiertes, cytosolisches, 11 kD großes GSH-abhängiges Protein und besitzt im aktiven Zentrum das konservierte Motiv -C-P-Y/F-C-. Grx besitzt zum Teil ähnliche Funktionen wie Trx und katalysiert Disulfid-Reduktionen [Park und Levine, 1997]. Grx ist ebenfalls Koenzym der Ribonukleotid-Reduktase und ist beim Recycling von Dehydroascorbat (Vitamin C) beteiligt [Übersicht in Holmgren und Aslund, 1995].

## 1.7. Spermatogenese

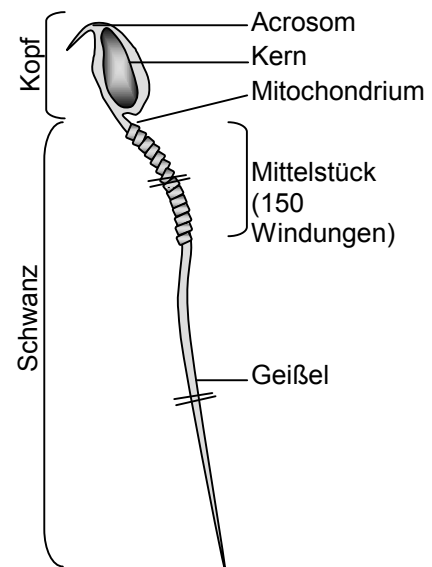
Für das Verständnis der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse und der großen Bedeutung des Spurenelements Selen in der männlichen Fertilität sollen hier die prinzipiellen Schritte der Spermatogenese kurz geschildert werden.

Die Nachkommen der primordialen Keimzellen [Falconer und Avery, 1978], die sogenannten TypA Spermatogonien, erscheinen zum ersten Mal 3 bis 7 Tage nach Geburt und liegen auf der Basallamina der Tubuli seminiferi. Mit Beginn der Pubertät teilen sich die TypA Spermatogonien mitotisch und erzeugen zum einen Nachkommen, die sich unbegrenzt teilen können (Spermatogonien-Stammzellen), und zum anderen intermediäre Spermatogonien, aus denen sich nach einer begrenzten Anzahl von mitotischen Teilungen (Spermatogonien vom TypB) die primären Spermatozyten differenzieren [Übersicht in Alberts et al., 1990; Fawcett, 1993].

In Abb. 5 ist ein stark vereinfachter Querschnitt eines Hodenkanälchens mit den unterschiedlichen Differenzierungsstadien der Spermatogenese gezeigt.



**Abb.5: Stark vereinfachter Ausschnitt aus einem Tubulus seminiferus.** [modifiziert nach Voet und Voet, 1992].



**Abb. 6: Aufbau eines Mäuse-Spermiums.** Charakteristisch für Mäuse-Spermien sind der hakenförmigen Kopf und der lange Schwanz mit einem ebenfalls verlängerten Mittelstück.

Die TypB Spermatogonien lösen sich von der Basalmembran, wandern gestützt von den Sertoli-Zellen Richtung Lumen des Hodenkanälchens und differenzieren sich zu primären Spermatozyten. Diese teilen sich meiotisch und während der Prophase der ersten meiotischen Teilung findet das *crossing-over* der homologen Chromosomen statt. Das Produkt der ersten Teilung sind die sekundären Spermatozyten, aus denen nach Vollendung der zweiten meiotischen Teilung, in welcher die Schwester-Chromatiden getrennt werden, die haploiden Spermatiden hervorgehen. Eine Besonderheit der Spermienentwicklung ist, dass die reifenden Spermien bis zur Freisetzung ins Lumen der Kanälchen über cytoplasmatische Brücken verbunden sind, was durch eine unvollständige Cytokinese gewährleistet wird. Damit können reifende Spermien von den Genprodukten eines diploiden Genoms profitieren, obwohl Spermatiden nur das haploide Genom besitzen [Braun et al., 1989].

Die Schritte der morphologischen, postmeiotischen Veränderungen von runden Spermatiden zu motilen, funktionellen Spermatozoen werden unter dem Überbegriff Spermio-genese zusammengefasst. Die Spermio-genese bei Mäusen wird in 16



unterschiedliche Differenzierungsstadien eingeteilt. Teil-Schritte hierfür sind die Bildung des Acrosoms, die Kondensation der DNA, die Bildung des Axonems mit der mitochondrialen Scheide im Mittelstück, das Abstreifen von überschüssigem Cytoplasma [Oakberg, 1956].

Die Bedeutung von Selen in der männlichen Fertilität ist hinsichtlich PHGPx auf molekularer Ebene zum Teil verstanden (siehe auch 1.5). Der PHGPx wird neben der Funktion als Strukturprotein in der mitochondrialen Kapsel von Spermatozoen, der Schutzfunktion vor oxidativen Schäden des Genoms, der Funktion bei der Kondensation der DNA im Spermienkern auch noch eine Funktion bei der Testosteronbiosynthese zugeschrieben [Behne et al., 1996 b]. PHGPx wie auch Selp sollen in den interstitiellen Leydig-Zellen, dem Ort der Testosteronsynthese, exprimiert sein [Nam et al., 1998; Köhrle, persönliche Mitteilung].

Über die Funktion der ausschließlich im Hoden exprimierten TR2 gibt es noch keinerlei Daten [Sun et al., 2001].

## 1.8. Vorarbeiten

Bornkamm und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Burkitt-Lymphom(BL)-Zellen auf Ausplattieren bei geringen Zelldichten sehr empfindlich reagieren und sehr schnell in Apoptose gehen [Falk et al., 1993].

Zugrundeliegender Mechanismus ist die geringe Aufnahmekapazität von oxidiertem Cystin in BL-Zellen. Die Cystin-Aufnahme ist wiederum der limitierende Schritt für die intrazelluläre GSH-Synthese. In Gegenwart von bestrahlten Fibroblasten können BL-Zellen jedoch auch bei niedrigen Zelldichten überleben. Fibroblasten können Cystin durch den kürzlich klonierten Cystin-Glutamat-Antiporter aufnehmen, intrazellulär reduzieren und dann reduziertes Cystein den BL-Zellen präsentieren, welches durch den Alanin-Serin-Cystein-Transporter effizient in die Zellen aufgenommen werden [Sato et al., 1999].

BL-Zellen können auch bei niedrigen Zelldichten ohne Kokultivierung mit Fibroblasten in Gegenwart von Pyruvat,  $\alpha$ -Thioglycerol ( $\alpha$ -TG) und dem Kupfer-Chelator Bathocuproinsulfat (BCS) überleben und proliferieren [Falk et al., 1998]. Durch  $\alpha$ -TG wird reduziertes Cystin bereitgestellt, durch BCS die Bildung von ROS

verhindert und durch Pyruvat entstehendes  $H_2O_2$  effizient entgiftet [Andrae et al., 1985].

Die Eigenschaft, bei niedriger Zelldichte in Apoptose zu gehen, wurde als Selektionskriterium genutzt, um in einer Expressionsklonierung antiapoptotische Gene zu klonieren und zu identifizieren. Dazu wurde aus Diethylmaleat behandelten HeLa-Zellen eine cDNA-Bank hergestellt und in ein geeignetes episomales Vektorsystem kloniert, in eine BL-Zelllinie transfiziert und überlebende Zellklone unter nicht-permissiven Bedingungen selektioniert. Diethylmaleat setzt die Zellen einem oxidativen Stress aus, und induziert dadurch antiapoptotische Gegenreaktionen auf den oxidativen Stress, einschließlich der Steigerung der Aufnahme von Cystin [Ishii et al., 1991]. Von Brielmeier und Mitarbeiter wurde in dieser Expressionsklonierung das Gen für die PHGPx sowie das Gen für eine putative NADH-Oxidase kloniert, auf die in dieser Arbeit aber nicht näher eingegangen werden soll [Brielmeier et al., 2001].

Für uns überraschend führte die Überexpression der klonierten PHGPx in BL-Zellen nur zu einer maximal zweifachen Erhöhung der PHGPx-Aktivität [Daten nicht gezeigt]. Dies deckt sich mit Befunden von Brigelius-Flohé et al. (1997 b), die die ineffiziente, kotranslationale Inkorporation von SeCys für die Schwierigkeit der Überexpression von Selenoproteinen in Zellkultursystemen verantwortlich machen. Um dennoch die Funktion von Selenoproteinen näher untersuchen zu können, ist die gezielte Inaktivierung von Selenoproteinen (*knock-out*) entweder in Zellen oder im Tier das geeignetste System.

## 1.9. Fragestellung

Im Vordergrund dieser Arbeit stand das Ziel, das Gen für PHGPx gezielt in Mäusen auszuschalten (*knock-out*). Hierzu sollten zwei Strategien verfolgt werden. Bei der ersten *lacZ knock-in*-Strategie sollte das *lacZ*-Gen als Reportergen die Analyse des Expressionsmusters der PHGPX erleichtern. Die zweite konditionale Strategie sollte dazu beitragen, PHGPx-defiziente Mäuse auch dann in die Hand zu bekommen, wenn sich der Verlust der PHGPx als letal oder sogar als embryonal letal erweisen sollte. Die Bedeutung der PHGPx für die mitochondriale Kapselbildung während der Spermatogenese war im Jahre 1998 zu Beginn der Arbeit noch nicht bekannt. Es war

damals in keiner Weise abzusehen, ob sich die PHGPx als lebensnotwendig oder als Teil eines redundanten biologischen Systems erweisen sollte.

Da es sich bei der PHGPx um ein antioxidatives Enzym handelt und sich das Haupt-Augenmerk besonders auf die bei der mitochondrialen Atmungskette entstehenden ROS richtete, war zu vermuten, dass neben der PHGPx das mitochondriale Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase-System für die Entgiftung von mitochondrialen ROS eine bedeutsame Rolle spielen könnte.

Mit den Trx-abhängigen Peroxiredoxinen besteht in diesem Kontext möglicherweise ein redundantes Selen-abhängiges, mitochondriales, antioxidatives System. Im Hinblick auf eine mögliche Redundanz des PHGPx- und Peroxiredoxin-Thioredoxin-Systems sollte parallel zum PHGPx-Gen das Gen für die mitochondriale Thioredoxin-Reduktase (TR3) in Mäusen gezielt zerstört und bei Bedarf PHGPx-TR3 doppel-*knock-out*-Tiere generiert werden.

## 2. Material

### 2.1. Bezugsquellennachweis

#### Chemikalien

Agarose	ICN Biomedicals, Inc. Ohio, USA
Ampicillin	Merck KgaA, Darmstadt
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
$\beta$ -Mercaptoethanol	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Chloroform	Merck KgaA, Darmstadt
DNA-Größenstandard	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Desoxynukleotidtriphosphate	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
ESGRO™ ( <i>Murine Leukemia Inhibitory Factor</i> )	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Ethanol p.a.	Merck KgaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck KgaA, Darmstadt
Fötales Kälberserum	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Gancyclovir Cytovene,	Syntex Hamilton Pharma, Inc., USA
LMP-Agarose	MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot
L-Glutamin	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Lipofektamin	Qiagen GmbH, Hilden
Neomycin (G418)	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Nicht-essenzielle Aminosäuren	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Optimem I-Medium	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$ )	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Phenol	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Sephadex-G50, DNA grade	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Trypsin/EDTA	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
5-Bromo-4-chloro-3-indoyl $\beta$ -D-Galactopyranosid (X-gal)	Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Zellkulturmedien	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe

Alle in der Arbeit genannten und hier nicht aufgeführten Chemikalien werden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen bezogen.

Radioaktive Isotope

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (3000 mCi/mmol, 10 mCi/ml)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-CTP}$ (3000 mCi/mmol, 10 mCi/ml)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Klenow-Enzym	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Restriktionsendonukleasen	MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot
	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
RNAse A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
T4 Polynukleotid-Kinase	New England Biolabs GmbH, Schwalbach

Verbrauchsmaterialien und Kits

3MM-Papier	Whatman Limited, Maidstone, Kentucky, USA
Advantage <sup>®</sup> PCR Enzyme System	Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, USA
DNA Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
DNA Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
DNEasy <sup>™</sup> Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Elektroporationsküvetten, 4 mm	Bio-Rad Laboratories, München
Hybond-N+ Nylonmembran	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Marathon <sup>™</sup> cDNA Amplification Kit	Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, USA
peqGOLDTriFast	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
PolyAtract mRNA Isolation System IV	Promega Corporation, Madison, USA
Random Primed DNA Labeling Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

## 2.2. Material für Klonierungen

### 2.2.1. Plasmide und verwendete Oligonukleotide

#### Zur Verfügung gestellte Plasmide/Phagen-Klone

Name	Größe (Bp)	Ausgangs-Vektor/Bezug	Insert
pSBC-1	3478	C. Karremann	enthält MCS-IRES-MCS-Kassette
JNK-neo	unbekannt	P. Groß	enthält synthetische Translationsstop-Kassette
pPNT	7348	W. Wurst	enthält Neo- und Thymidinkinase-Kassette
pLZ11	9647	R. Schmid	enthält Nls-lacZ-Kassette ohne polyA-Signal und ATG
p410	7880	F. Vauti	enthält frt-flankierte Neo-Resistenzkassette
pCAGGSflpe	7706	F. Stewart	enthält eine Flp-IRES-Puromycin Expressionskassette
peGFPdN	unbekannt	M. Ueffing	enthält codierender Bereich für eGFP
pcDNA3.1	5428	Invitrogen	Expressionsplasmid enthält CMV-Promotor
pBluescript SK+	2961	Stratagene	kleines Phagemid mit hoher Kopienzahl
λ12	unbekannt	M. Brielmeier	enthält etwa 15 kBp genomische Mausequenz mit PHGPx Lokus
λ13	unbekannt	M. Brielmeier	enthält etwa 13 kBp genomische Mausequenz mit PHGPx Lokus

#### Eigene Plasmide

Durchgestrichene Restriktionsschnittstellen sind diejenigen Stellen, die bei den Klonierungsschritten gezielt nicht mehr restauriert werden.

#### **Zur Herstellung von konditionalem TR3 lacZ knock-in (pPNT8.1)**

Name	Größe (Bp)	Ausgangs-Vektor/Bezug	Modifikation
pSBC-1dN	3482	pSBC-1	Deletion der <i>NotI</i> -Restriktionsstelle
pSBC-1dN-STOP	3892	pSBC-1dN	plus synthetisches Translations-STOP-Element, welches aus JNK-neo mittels PCR amplifiziert und über <i>Sall</i> kloniert wurde
pMC48.2	6447	-	Nls-lacZ-Kassette inclusive PGK-polyA
pMC48.5	6445	pMC48.2	plus IRES-Linker ( <del><i>Sall</i></del> - <i>EcoRI</i> - <i>NheI</i> -ATG- <i>EcoRI</i> ) und ATG-Kodon
pMC48.6	7522	pMC48.5	plus STOP-IRES aus pSBC1dN-STOP über <i>EcoRI</i> / <i>NheI</i>
pMC59	19099	-	TR3 Lambda Klon 5 über <i>NotI</i> in pBluescript SK+
pMC64	4044	pMC59	rechter Arm mittels <i>Cfr10</i> / <i>XmaI</i> über <i>XmaI</i> in pBluescript SK+ kloniert
pMC65	15283	pMC59	linker Arm mittels <i>NheI</i> / <i>XmaI</i> über <i>XbaI</i> / <i>XmaI</i> in pBluescript SK+
pMC65-loxP	15331	pMC65	plus loxP-Linker über <i>FseI</i> ( <i>FseI</i> - <i>EcoRI</i> -loxP- <i>FseI</i> )
pPNT5	7397	pPNT	plus loxP-Linker ( <i>NotI</i> - <i>XhoI</i> -loxP- <i>Sall</i> - <i>XhoI</i> ) zwischen <i>NotI</i> und <i>XhoI</i>
pPNT6	8494	pPNT5	x <i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i> ( <i>blunt</i> ) plus rechter Arm aus pMC64 x <i>EcoRI</i> / <i>XbaI</i> ( <i>blunt</i> )

pPNT7	13097	pPNT6	x <i>Sall/SbfI</i> plus STOP-IRES aus pMC48.6 x <i>SbfI/XhoI</i>
pPNT8	25533	pPNT7	plus linker Arm aus pMC65-loxP über <i>NotI/XhoI</i>
pPNT8.1	25838	pPNT8	plus polyA aus pPNT4 über <i>XbaI</i> und <i>XhoI</i> jeweils <i>blunt</i>
pMC67	3411	pMC59	linke Probe aus pMC59 x <i>NheI/HpaI</i> über <i>EcoRV/XbaI</i> in pBluescript SK+
pMC68	3250	pMC59	rechte Probe aus pMC59 über <i>BamHI</i> in pBluescript SK+
pMC33	9136	-	enthält eine SV40-Promotor-MCS-IRES-MCS-eGFP-Kassette
pMC33-STOP	9569	pMC33	STOP-Kassette über <i>Sall</i> kloniert (Kontrollvektor)
pMC48.7	9990	pMC48.6	plus SV40-Promotor aus pMC33 ( <i>blunt</i> )

### Konditionaler TR3 *knock-out* (pPNT11)

pPNT4	7364	-	enthält <i>frt</i> -flankierte Neo-Resistenzkassette und eine loxP-Stelle 5' davon; siehe Abb.7
pPNT9	8446	pPNT4	plus rechter Arm aus pMC64 <i>blunt</i>
pPNT10	8403	pPNT9	plus <i>XhoI</i> -Linker über <i>Sall/NotI</i>
pPNT11	20830	pPNT10	plus linker Arm aus pMC65-loxP über <i>NotI/XhoI</i>

### PHGPx *lacZ knock-in* (pPNT2.4)

pPNT2	7430	pPNT	plus linker Linker ( <i>Sal-Sfi-Sfi-Sbf-NotI</i> )
pPNT2.1	12163	pPNT2	plus rechter Arm aus pMC45 x <i>KpnI/EcoRI</i>
pPNT2.2	12208	pPNT2.1	plus Linker mit selten, in Maus-DNA schneidenden Restriktionsstellen über <i>KpnI</i>
pMC48	6134	pLZ11	plus Nls- <i>lacZ</i> über <i>EcoRI/XbaI</i> in pBluescript SK+
pMC48.1	6142	pMC48	plus rechter Linker (oligo48.1) über <i>XbaI/NotI</i> inkl. <i>SbfI</i> Stelle
pMC48.2	6447	pMC48.1	plus polyA aus p410 (s.u.) über <i>XbaI</i>
pMC48.3	6443	pMC48.2	plus linker Linker [oligo48.3] über <i>XhoI/EcoRI</i> (für Fusion notwendig)
pMC48.4	10470	pMC48.3	plus linker Arm aus pMC54 über <i>Sall/EcoRI</i>
pPNT2.4	19685	pPNT2.2	plus linker Arm inkl. <i>lacZ</i> aus pMC48.4 über <i>Sall/SbfI</i>
pMC45	18279	-	PHGPx Lambda-Klon 12 über <i>NotI</i> in pBluescript SK+
pMC54	6970	pMC45	linker Arm über <i>HindIII/EcoRI</i> in pBluescript SK+
pMC50	3812	pMC42 ( $\lambda$ 12)	rechte Probe über <i>EcoRI/KpnI</i> in pBluescript SK+
pMC53	4514	pMC43 ( $\lambda$ 13)	linke Probe über <i>HindIII/EcoRI</i>

### Konditionaler PHGPx *knock-out* Version 1 (pPNT4.2)

p410.1	unbekannt	p410	plus rechter <i>BamHI</i> -Linker über <i>SmaI</i>
p410.2	unbekannt	p410.1	plus linker loxP/ <i>NotI</i> -Linker über <i>BstBI</i>
pPNT3	7451	pPNT2	plus rechter Linker OligopPNT2 über <i>EcoRI/KpnI</i>
pPNT4	7364	pPNT3	plus loxP- <i>frt</i> -neo- <i>frt</i> -Kassette über <i>NotI/BamHI</i>
pMC46	9282	pMC45	plus rechter Arm über <i>BamHI</i> in pBluescript SK+
pMC46.1	9278	pMC46.1	plus loxP/ <i>HindIII</i> -Linker über <i>HpaI/BsmI</i>
pPNT4.1	13678	pPNT4	plus rechter Arm aus pMC46.1 über <i>BamHI</i>
pMC47	8010	pMC45	linker Arm x <i>EcoRI/NotI</i> in pBluescript SK+
pMC49	6436	pMC47	x <i>HindIII</i> und religiert
pPNT4.2	17149	pPNT4.1	plus linker Arm aus pMC49 über <i>Sall/NotI</i>

**Konditionaler PHGPx knock-out Version 2 (pPNT4.8)**

pMC46.2	9286	pMC46.1	partieller <i>HindIII</i> -Verdau, Klenow und Religation
pMC42	?	-	enthält PHGPx-Lokus ( $\lambda$ 12 x <i>Sall</i> )
pMC38	8087	pMC42	linker Arm über <i>HindIII/HpaI</i> in pBluescript SK+ x <i>EcoRV/HindIII</i>
pMC38.1	9213	pMC38	pMC38 x <i>XbaI</i> ( <i>blunt</i> )/ <i>SbfI</i> plus pMC46.2 x <i>AflII</i> ( <i>blunt</i> )/ <i>SbfI</i>
pPNT4.7	10958	pPNT4.1	pPNT4.1 x <i>AflII</i> (partiell) / <i>BamHI</i> (partiell), Klenow und Religation
pPNT4.8	17206	pPNT4.7	x <i>Sall/NotI</i> plus pMC38.1 x <i>Sall/NotI</i> (partiell)
pMC69	3503	pPNT4.8	interne <i>NheI</i> -Probe in pBluescript SK+ via <i>XbaI</i>

**Nukleäre Lokalisation des alternativen Exons**

pCDNA3.1-EaGFP <sub>f</sub>	unbekannt	pCDNA3.1	N-terminales Fusionsprotein des kompletten alternativen Exons mit eGFP über <i>XhoI/XbaI</i>
pCDNA3.1-EaGFP <sub>s</sub>	unbekannt	pCDNA3.1	N-terminales Fusionsprotein des 5'-trunkierten alternativen Exons mit eGFP über <i>XhoI/XbaI</i>

Verwendete Oligos

Die hier verwendeten loxP-Stellen sind farbig markiert.

Name	Sequenz 5'-3'	Verwendungszweck
OligopPNT1-a	ggcctaggcctcactggccgctgactgtctctgatcaggcctcactggccgcg gccgcttccaacctgca	PHGPx lacZ k.i.
OligopPNT1-b	ggttcgaagcggccgcccagtgaggcctgatcagaagacagtcgacggc cagtgaggccta	PHGPx lacZ k.i.
HpaloxBsm-a	aacaagcttataacttcgtagtagcatacattatacgaagttattg	PHGPx kond. k.o. V1
HpaloxBsm-b	aataacttcgtagtagtagcatacgaagttataagcttgtt	PHGPx kond. k.o. V1
oligorarecut-a	attaattccggacaattgatttaaatctagatatacaagcttg	PHGPx lacZ k.i.
oligorarecut-b	aagcttgatctagatttaaatcaattgtccggaattaatgtac	PHGPx lacZ k.i.
oligoPPNT2-a	gatccgctagcggtagcagctcgaattcatcgatctcgaga	PHGPx kond. k.o. V1
oligoPPNT2-b	aatttctcgagatcgatgaattcgagctcggtagcagctagcg	PHGPx kond. k.o. V1
Oligo410-1a	ccgggatccgcccggca	PHGPx kond. k.o. V1
Oligo410-1b	ccggtgcccggcggatc	PHGPx kond. k.o. V1
Oligo410-2a	cgaagcggccgcataacttcgtagtagcatacattatacgaagttat	PHGPx kond. k.o. V1
Oligo410-2b	cgataacttcgtagtagtagtagcatacgaagttatcgccgctt	PHGPx kond. k.o. V1
Oligo48-1a	ctagacctgcagggc	PHGPx lacZ k.i.
Oligo48-1b	ggccgcccctgcaggt	PHGPx lacZ k.i.
Oligo48-2a	agcttgctagcgaattcagatct	PHGPx lacZ k.i.
Oligo48-2b	aattagatctgaattcagtagca	PHGPx lacZ k.i.
Oligo48-3a	tcgaagctagcgtcgacgaattcagatct	PHGPx lacZ k.i.
Oligo48-3b	aattagatctgaattcagtagcagctagct	PHGPx lacZ k.i.
OligoTR3-3'	gtgtggggcttcatatgcacaggtgatgcagacagtagggatccatcccacctg ctctga	TR3 Klonierung
OligoTR3-5'	agggcgagttccagaaaccaggactttgaatctggagaaggctggcatcagt accaacc	TR3 Klonierung
TR3Oligo1	ctgcatggacgcagataccc	TR3 Sequenzierung
TR3Oligo2	tctgtagggtagatactcagg	TR3 Sequenzierung
TR3Oligo3	tcaaccagatgtagtgatc	TR3 Sequenzierung
TR3Oligo4	gctgagcagttcagcactgg	TR3 Sequenzierung
TR3Oligo5	ataggcatcacattgctgagg	TR3 Sequenzierung



TR3Oligo6	agaagtcacccaaggattgc	TR3 Sequenzierung
TR3Oligo7	acaacgactaactacttacc	TR3 Sequenzierung
TR3Oligo8	ggatccattcctgctggcc	TR3 Sequenzierung
TR3Oligo9	atggaaccagaccctga	TR3 Sequenzierung
TR3Oligo10	caacaggatgacctgcacc	TR3 Sequenzierung
TR3Oligo11	tgtcgggtacatggtgaggc	TR3 Sequenzierung
TR3Oligo12	ataggacatggctgatctgc	TR3 Sequenzierung
TR3Oligo13	cagttctattgagaagagtgg	TR3 Sequenzierung
TR3Oligo14	gctctgccacagttcattcg	TR3 Sequenzierung
TR3Oligo15	caatgctggatgaaccagg	TR3 Sequenzierung
TR3Oligo16	cctgagtgtttgagtgtgg	TR3 Sequenzierung
TR3Oligo17	gtagtacatacagtgtagctgg	TR3 Sequenzierung
TR3Oligo18	ctaacacattgttagtcagg	TR3 Sequenzierung
TR3Oligo19	actctgaggcactgcagctcc	TR3 Sequenzierung
TR3Oligo20	aggctctgtggaagggcagc	TR3 Sequenzierung
TR3Oligo21	cgcaggggtgtgcacattagg	TR3 Sequenzierung
TR3Oligo22	tcacctgtgcatatgaagcc	TR3 Sequenzierung
TR3Oligo23	catgtcaagctgtgtcagg	TR3 Sequenzierung
TR3Oligo24	agcagaggctaattcactcttcc	TR3 Sequenzierung
IRESlinkerATG-a	tcgagaattctggctagccatgggt	TR3 kond. lacZ k.i.
IRESlinkerATG-b	aattaccatggctagccagaattc	TR3 kond. lacZ k.i.
loxPsiteEcoRI-a	ccgaattc <b>cataacttcgtatagcatacattatacgaagttat</b> gaccgg	TR3 kond. lacZ k.i.
loxPsiteEcoRI-b	<b>tcataacttcgtataatgtatgctatacgaagttat</b> gaattcggccgg	TR3 kond. lacZ k.i.
pPNTloxPlinker-a	ggccgcatctcgag <b>ataacttcgtatagcatacattatacgaagttat</b> gtcgaca	TR3 kond. lacZ k.i.
pPNTloxPlinker-b	tcgatctgcag <b>cataacttcgtataatgtatgctatacgaagttat</b> ctcgagatgc	TR3 kond. lacZ k.i.
STOPforw	tatagtcgactcccaccacctgcctcc	TR3 kond. lacZ k.i.
STOPrev	aggagtcgacacttatctacctcaactg	TR3 kond. lacZ k.i.
OligopPNT10a	tcgacgcgccgcatgctcgag	TR3 kond. lacZ k.i.
OligopPNT10b	ggccctcgagcatgcccggcgg	TR3 kond. lacZ k.i.
mPHGPxEaforw1	gggacgctgcagacagcggcgggatcc	3'-RACE
GFPEaforw1	gatctctagaccggcgggcatgggcccgcgcg	Ea <sub>r</sub> -Lokalisation
GFPEarev2	gctcctcgccctgctcaccgaagcccaggaactcggagc	Ea-Lokalisation
GFPEaforw2	gatctctagactcgccggatggagcccattcc	Ea <sub>s</sub> -Lokalisation
GFPEaforw3	gctccgagttcctgggcttggtgagcaagggcgaggagc	Ea-Lokalisation
GFPOligorev1	cctctacaatgtggtatgg	Ea-Lokalisation

## 2.2.2. Beschreibung der Klonierungsstrategien

### Konditionaler TR3 lacZ knock-in (pPNT8.1)

Für die Klonierung dieses aufwändigen *Targeting*-Konstrukts, wurden 4 Ausgangsplasmide parallel modifiziert und sukzessiv zusammengesetzt.

Zunächst wurde die *NotI*-Restriktionsstelle in dem IRES-(*Internal Ribosomal Entry Site*) enthaltenden pSBC-1 Plasmid durch Schneiden, Auffüllen (*blunt*) und Religieren zerstört (pSBC1-dN). Über die 5' von der IRES liegenden *Sall*-Stelle wurde ein künstliches Translations-STOP-Element eingebracht, welches zuvor mittels PCR amplifiziert wurde und wobei der Vektor Jnk-Neo als Matrize diente (pSBC1-dN-STOP). Um zu testen, ob dieses Element die Transkription negativ beeinflusst, wurde dieses Element in die erste Position (MCS1) eines bicistronischen

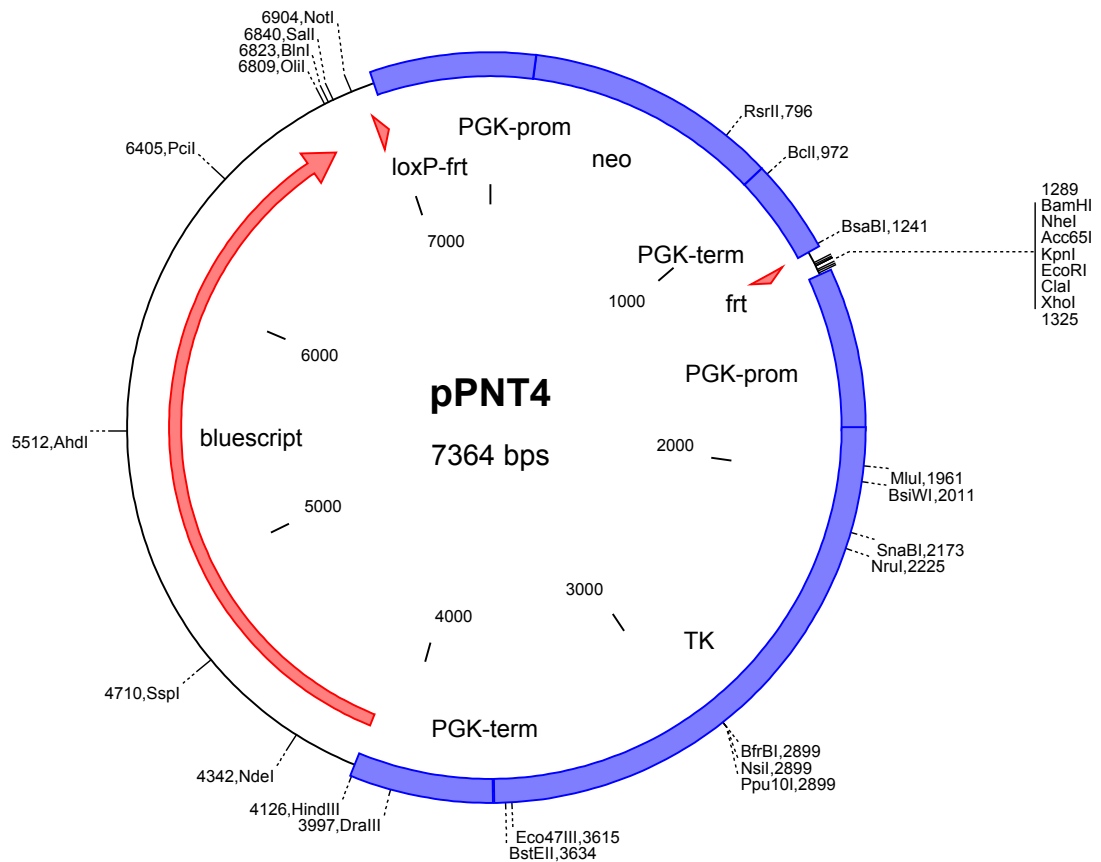
Vektors bestehend aus SV40-Promotor-MCS1-IRES-MCS2-eGFP-SV40polyA kloniert und transient in Hela-Zellen transfiziert (pMC33-STOP). Anhand der GFP-Fluoreszenz konnte eine Interferenz des STOP Elements mit der Transkription ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

Parallel dazu wurde vor die Nls-lacZ-Kassette in Vektor pMC48.2 ein Linker (IRES-LinkerATG a/b) über *Sall/EcoRI* kloniert, wobei die beiden Restriktionsstellen nicht mehr restauriert wurden. Dabei wurden zusätzlich zu einer *NheI*- und *EcoRI*-Stelle ein ATG-Start-Kodon eingeführt, das die IRES-vermittelte Translation der  $\beta$ -Galactosidase ermöglichen soll. Damit soll sichergestellt werden, dass die  $\beta$ -Galactosidase wirklich aktiv ist und ausgeschlossen werden, dass ein N-terminales Fusionsprotein mit der TR3 möglicherweise nicht aktiv ist (pMC48.5). Das STOP-IRES-Element wurde über *EcoRI* und *NheI* aus pSBC1-dN-STOP mobilisiert und 5' vor die Nls-lacZ-Kassette platziert (pMC48.6). Zur Kontrolle wurde vor die STOP-IRES-Nls-lacZ-Kassette der SV40-Promotor aus pMC33 kloniert (pMC48.7), das Plasmid transient in Hela-Zellen transfiziert und die nukleäre Lokalisation der  $\beta$ -Galactosidase mittels LacZ-Färbung verifiziert (Daten nicht gezeigt).

Der für die homologe Rekombination erforderliche rechte Arm wurde aus pMC59, welches den 3'-Bereich der TR3 trägt, mit *Cfr10/XmaI* mobilisiert und über *XmaI* in pBluescript SK+ kloniert (pMC64).

Der lange, linke Arm wurde aus pMC59 mit den Enzymen *NheI/XmaI* isoliert und über *XbaI/XmaI* in pBluescript SK+ subkloniert (pMC65). Über *FseI* wurde der Linker loxPsite*EcoRI* a/b in den linken Arm eingesetzt und die richtige Orientierung durch Sequenzieren bestätigt (pMC65-loxP).

Das die Neo- und TK-Resistenzgene enthaltende Ausgangsplasmid pPNT erforderte mehrere Modifikationen. 3' von der Neo-Kassette wurde der pPNTloxPlinker a/b (*NotI-XhoI*-LoxP-*Sall-XhoI*) kloniert, wobei die zweite *XhoI*-Stelle zerstört wurde (pPNT5). Über *BamHI/EcoRI* (*blunt*) wurde der rechte Arm, welcher zuvor mit *XbaI/EcoRI* (*blunt*) aus pMC64 isoliert wurde, in pPNT5 eingefügt (pPNT6). Das STOP-IRES-Element wurde aus pMC48.6 (*XhoI/SbfI*) in pPNT6 (*Sall/SbfI*) umgesetzt (pPNT7). Der linke Arm (pMC65-loxP) wurde daraufhin über *NotI/XhoI* in pPNT7 kloniert (pPNT8). Das PGK-polyA-Signal wurde aus pPNT4 (*XbaI, blunt*) in pPNT8 (*XhoI, blunt*) einkloniert, wodurch das *Targeting*-Konstrukt pPNT8.1 entstand.



**Abb. 7: Ausgangsvektor für konditionales *Gene-Targeting*.** Exemplarisch ist hier die Genkarte des Vektors pPNT4 dargestellt, der im Gegensatz zum häufig verwendeten pPNT Vektor eine frt-flankierte Neo-Resistenzkassette enthält. Abk.: frt = Erkennungsstelle für Flp-Rekombinase; loxP = Erkennungsstelle für Cre-Rekombinase; neo = Neomycin-Phosphotransferase (positiver Selektionsmarker); TK = Thymidin-Kinase (negativer Selektionsmarker); PGK-1prom bzw. -term = Phosphoglycerinkinase1-Promotor bzw. -Polyadenylierungssignal. Dargestellt sind Restriktionsendonukleasen, die jeweils nur einmal im Vektor schneiden.

### Konditionaler TR3 *knock-out* (pPNT11)

Der rechte Arm wurde *blunt* aus pMC64 in pPNT4 (Abb. 7) kloniert (pPNT9). Über *Sall/NotI* wurde OligopPNT10 a/b (*Sall-NotI-XhoI-NotI*) 3' von der Neo-Resistenz-Kassette einkloniert, wobei die zweite *NotI*-Stelle zerstört wurde (pPNT10). Um das *Targeting*-Konstrukt zu vollenden (pPNT11), wurde der linke Arm aus pMC65-loxP über *NotI/XhoI* eingesetzt.

### PHGPx lacZ knock-in (pPNT2.4)

Die Klonierung des lacZ *knock-in* erforderte die Modifikationen der beiden Vektoren pPNT und pMC48, die im Folgenden detaillierter beschrieben werden.

Zunächst wurde 3' von der Neo-Kassette eine MCS (OligopPNT1 a/b) mit selten in Maus-DNA schneidenden Restriktionsstellen über *Sall/NotI* eingefügt (pPNT2). Der für das *Gene-Targeting* notwendige rechte Arm wurde aus pMC45, welches den kompletten PHGPx-Lokus enthält, über *KpnI/EcoRI* in pPNT2 umgesetzt (pPNT2.1). Um für die Verifizierung der homologen Rekombination in ES-Zellen eine Auswahl von Restriktionsenzymen zu haben, wurde über *KpnI* das Oligorecut a/b eingesetzt (pPNT2.2).

Parallel dazu wurde eine Nls-lacZ-Kassette ohne eigenes Translationsstartkodon aus pLZ11 über *EcoRI/XbaI* in pBluescript SK+ umkloniert (pMC48). Für die spätere Mobilisierung der Kassette wurde sodann 3' von der  $\beta$ -Galactosidase ein Linker (Oligo48.1 a/b), welcher eine *SbfI*-Stelle mit sich bringt, über *XbaI/NotI* eingefügt (pMC48.1). Wie sich aus der Sequenzierung des hinteren Bereichs der  $\beta$ -Galactosidase herausstellte, musste über *XbaI* noch ein PGK-polyA-Signal aus p410 hinzugefügt werden (pMC48.2). Für die Fusion der  $\beta$ -Galactosidase im passenden Leseraster in Exon 2 der PHGPx wurde 3' von der Nls-lacZ-Kassette der Linker Oligo48.3 über *XhoI/EcoRI* eingesetzt (pMC48.3). Der linke Arm, welcher zuvor über *HindIII/EcoRI* aus pMC45 in pBluescript SK+ subkloniert wurde (pMC54), wurde über *Sall/EcoRI* in pMC48.3 umgesetzt (pMC48.4). Der letzte Schritt war die Umklonierung des pMC48.4-Inserts in pPNT2.2 mittels *Sall/SbfI* (pPNT2.4).

### Konditionaler PHGPx knock-out Version 1 (pPNT4.2)

Für die Mobilisierung der frt-flankierten Neo-Resistenzkassette in pPNT2 wurde 3' ein Linker mit einer *BamHI*-Stelle (Oligo410-1a/b) über *SmaI* inkloniert (p410.1) und 5' ein *NotI-loxP*-Linker über *BstBI* eingesetzt (p410.2). Die loxP-frt-neo-frt-Kassette wurde über *NotI/BamHI* in pPNT3 kloniert, welches zuvor aus der Modifikation der 3' MCS des pPNT2 durch Einsetzen eines Linkers (OligopPNT2-a/b) über *EcoRI/KpnI* hervorgegangen war (pPNT4).

Der rechte Arm wurde aus pMC45 über *BamHI* in pBluescript SK+ subkloniert (pMC46), und über *HpaI/BsmI* wurde der loxP-Linker *HpaLoxBsm* a/b inklusive

charakteristischer *HindIII*-Restriktionsstelle in das Intron zwischen Exon 4 und 5 eingefügt (pMC46.1). Dieser modifizierte rechte Arm wurde über *BamHI* in pPNT4 umklontiert (pPNT4.1).

Der linke Arm wurde zunächst über *EcoRI/NotI* aus pMC45 in pBluescript SK+ kloniert (pMC47) und durch einen *HindIII*-Verdau im 5'-Bereich verkürzt (pMC49). Beim letzten Schritt wurde der linke Arm aus pMC49 mit *Sall/NotI* isoliert und über die gleichen Enzyme in den *Targeting*-Vektor pPNT4.2 eingesetzt.

#### Konditionaler PHGPx *knock-out* Version 2 (pPNT4.8)

Bei der zweiten Version des konditionalen PHGPx *knock-outs* wurde auf bereits zum Teil bestehende Vektoren zurückgegriffen, die bei der Klonierung der ersten Version entstanden sind. Für die spätere Verifizierung der homologen Rekombination musste zunächst die neben der loxP-Stelle befindliche *HindIII*-Restriktionsstelle zerstört werden, was aufgrund zweier in pMC46.1 existierender *HindIII*-Stellen durch einen partiellen Verdau mit anschließender Klenow-Behandlung und Religierung erreicht wurde (pMC46.2).

Der linke Arm konnte über *HindIII/HpaI* aus pMC42, welcher den PHGPx-Lokus enthält ( $\lambda$ 12 via *Sall* in pBluescript SK+), in pBluescript SK+ über *EcoRV/HindIII* umklontiert werden (pMC38). Der linke Arm musste sodann um die loxP-Stelle und den Exonbereich 5 bis 7 ergänzt werden, wobei pMC38 mit *XbaI (blunt)/SbfI* und pMC46.2 mit *AflII (blunt)/SbfI* geschnitten und zusammengesetzt wurden (pMC38.1). Um die Neo-Resistenzkassette in den 3' nicht-transkribierten Bereich zu platzieren, wurde pPNT4.1 um ein *AflII/BamHI*-Fragment verkürzt. Da die beiden in Frage kommenden Restriktionsenzyme jeweils zweimal im Vektor vorhanden waren, wurde ein doppelt partieller Restriktionsverdau mit anschließendem Auffüllen und Religieren durchgeführt (pPNT4.7). Der linke Arm inklusive loxP-Stelle wurde mittels *Sall/NotI* mobilisiert und in den Vektor pPNT4.7 über *Sall/NotI* (partiell) umklontiert (pPNT4.8).

### 3. Methoden

#### 3.1. Prinzip der Etablierung von *knock-out*-Mäusen

Bevor die einzelnen Methoden zur Generierung von *knock-out*-Mäusen beschrieben werden, sollen zuerst die prinzipiellen, dafür erforderlichen Schritte anhand eines Schemas dargestellt werden (Abb. 8).

Zunächst ist es notwendig, den genomischen Mausloкус zu klonieren. Dies kann dadurch erreicht werden, dass die gewünschten  $\lambda$ -Phagen aus einer  $\lambda$ -Phagen-Bank, die das ganze Mausgenom mit Fragmenten von etwa 12-15 kBp abdeckt, mit entsprechenden Sonden isoliert werden. Alternativ zur Phagen-Bank werden Cosmid-Banken (Insertgröße 40-50 kBp) oder zunehmend BAC-Klonbanken (Insertgröße  $\sim$  100 kBp) verwendet, wobei die einzelnen Klone auf Filter mit definierten Koordinaten aufgetragen sind. Für die Suche nach den entsprechenden Klonen eignen sich sowohl Proben, die Teile der cDNA des gewünschten Gens abdecken, als auch Proben aus dem Intron-Bereich falls bereits Informationen über die Struktur des Gens in den öffentlichen Datenbanken verfügbar sind. Damit kann bei der Suche nach dem Gen das Risiko, mögliche Pseudogene zu klonieren, minimiert werden.

Erhält man im Falle der  $\lambda$ -Phagen-Bank positive, gereinigte Klone, ist es sinnvoll, sie in Plasmide um- oder subzuklonieren. Die Cosmide können aufgrund ihres bakteriellen *origins* bereits in Bakterien passagiert werden. Für das *Gene-Targeting* muss zumindest eine Restriktionskarte des Maus-Lokus erstellt werden. Für aufwändigere *knock-out*-Strategien, wie zum Beispiel die eines konditionalen *knock-out*-Konstrukts, ist es hilfreicher, wenn die wichtigen Bereiche sequenziert werden.

Die *Targeting*-Strategie richtet sich nach dem zu erwartenden Phänotyp und kann im einfachen Fall ein direkter *knock-out*, ansonsten ein *lacZ knock-in* oder ein konditionaler *knock-out* sein. Bei dem direkten *knock-out* werden die zu deletierenden Exon-Bereiche durch eine Neo-Resistenzkassette ersetzt und dadurch das Gen inaktiviert. Bei der *lacZ knock-in*-Strategie werden die Exons durch das Resistenzgen und das Reporter-gen  $\beta$ -Galactosidase ersetzt, welches im passenden Leseraster ohne eigenes Translationsstartkodon in ein Exon eingesetzt wird, wodurch ein N-terminales Fusionsprotein entsteht.

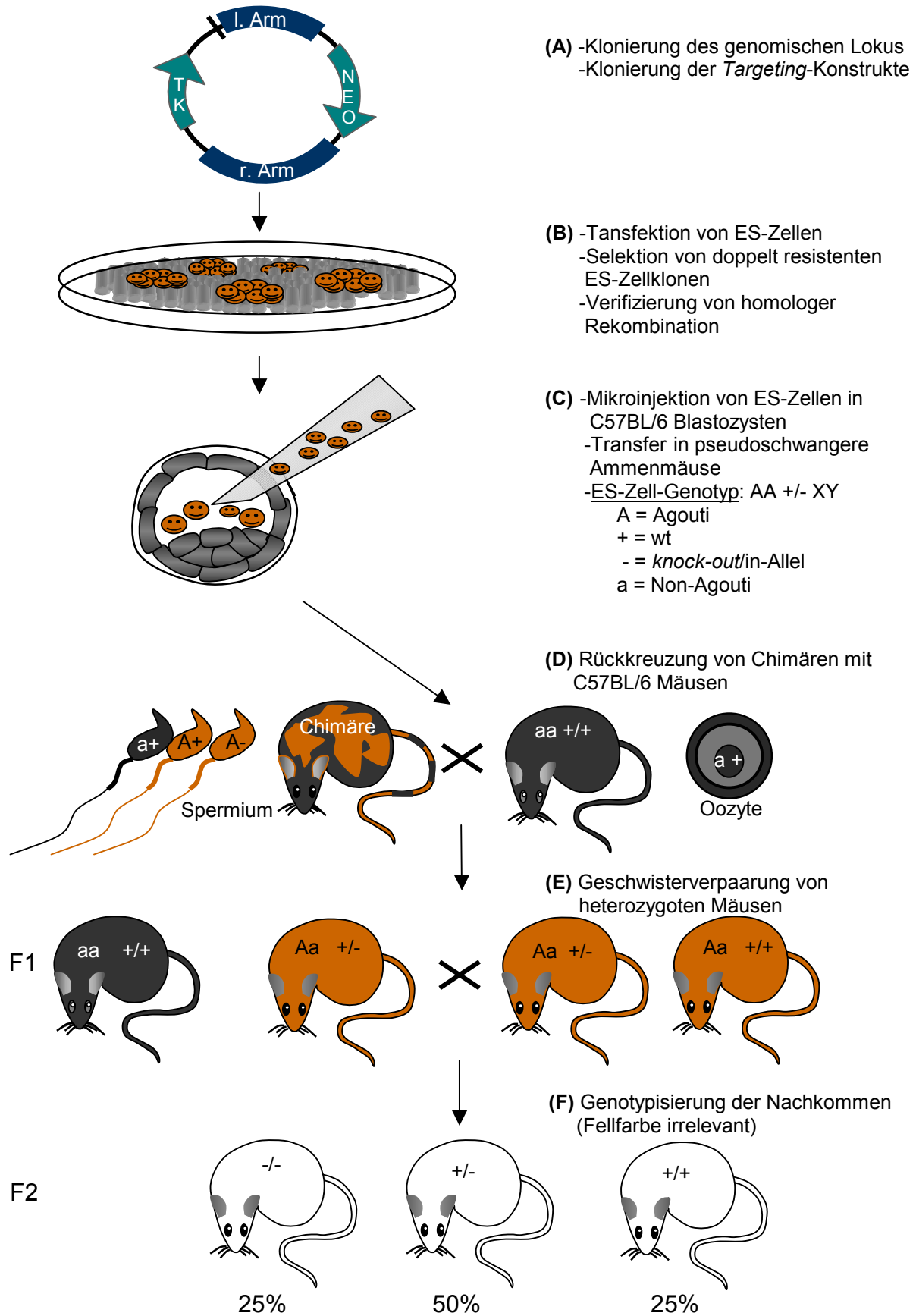


Abb. 8: Prinzipielle Schritte bei der Etablierung von *knock-out*-Mäusen.

Unter Zuhilfenahme einer IRES kann die  $\beta$ -Galactosidase auch in einen Exon- oder Intron-Bereich kloniert werden, wodurch zwar kein Fusionsprotein mehr entsteht, aber die Expression weiterhin von dem endogenen Promotor des zu inaktivierenden Gens abhängt.

Weit aufwändiger ist es, eine konditionale *knock-out*-Strategie zu verfolgen. Beim konditionalen *knock-out* wird die wt-Genstruktur zunächst nur minimal mit sogenannten *frt*- bzw. *loxP*-Stellen verändert [Abremski et al., 1981], um so die endogene Genexpression zunächst möglichst unbeeinflusst zu lassen. Dabei wird die Neo-Kassette, die zusätzlich für die Deletion des Resistenzmarkers noch von zwei *frt*- oder *loxP*-Stellen flankiert sein kann, entweder in ein größeres Intron oder außerhalb des Gens zum Beispiel in den 3'-untranskribierten Bereich gesetzt. *Frt*- und *loxP*-Stellen sind jeweils 34 Bp lange Erkennungssequenzen für Flp- bzw. Cre-Rekombinase. DNA-Bereiche, die von zwei dieser Stellen flankiert sind, werden durch Flp- bzw. Cre-Rekombinase effizient ausgeschnitten, sofern sich die *frt*- bzw. *loxP*-Stellen in gleicher Orientierung befinden. Wird mit dem Flp-*frt*-System gearbeitet [Andrews et al., 1985], befindet sich eine der beiden für die Inaktivierung des Gens notwendigen *loxP*-Stellen in unmittelbarer Nähe der Neo-Kassette. Die zweite *loxP*-Stelle wird in ein Intron kloniert, wodurch die zu deletierenden Exons nun mit zwei *loxP*-Stellen (floxed Allel) flankiert sind. Die Inaktivierung des Gens erfolgt durch Kreuzen von solchen konditionalen *knock-out*-Mäusen mit Cre-transgenen Tieren, die die Cre-Rekombinase ubiquitär [Sauer und Hendersson, 1988], gewebe-spezifisch oder induzierbar exprimieren [Orban et al., 1992; Kühn et al., 1995].

Für die homologe Rekombination in ES-Zellen wird der positive Selektionsmarker oder beim *lacZ knock-in* das Reporter-gen und der Selektionsmarker von den beiden homologen Armen flankiert, die erfahrungsgemäß zusammen mindestens 6 kBp ergeben sollen. Im Falle des konditionalen Konstrukts befindet sich in dem längeren Arm zusätzlich noch die zuvor eingebrachte zweite *loxP*-Stelle.

Für das *Gene-Targeting* (Abb. 8 B) wird die linearisierte DNA in eine totipotente Maus ES-Zelllinie eingebracht und resistente ES-Zellklone selektiert [Thomas und Capecchi, 1987]. Die ES-Zellen werden immer in Gegenwart von sogenannten embryonalen Fibroblasten (*Feeder*) gehalten, die die Totipotenz der ES-Zellen während der *in vitro*-Manipulation erhalten soll. Die ES-Zell-Klone werden mit Neomycin positiv und mit Gancyclovir, einem Nukleotidanalogen, welches von der TK phosphoryliert wird, negativ selektiert. Durch die homologe Rekombination wird der



Bereich zwischen den beiden Armen ins Genom integriert und die übrigen Bereiche des Vektors inklusive dem TK-Gen gehen verloren. Alle illegitim rekombinierten Klone, die die außerhalb der Arme befindliche TK stabil in ihre DNA integrieren, werden durch Gancyclovir ausselektiert. In der Regel lässt sich dadurch der Anteil falsch rekombinierter ES-Zellklone um bis zu 90 % reduzieren. Dann werden erfahrungsgemäß mindestens 400 Einzelzellklone pro Konstrukt gepickt, auf 4 Replikplatten expandiert und die Klone mittels Southern-Blot und einem charakteristischen Restriktionsverdau auf homologe Rekombination getestet. Die Proben müssen sich außerhalb der Arme für die homologe Rekombination befinden, um so sicherstellen zu können, dass die resultierenden *knock-out*-Banden im Southern-Blot nicht durch illegitime Rekombination zufällig entstehen. Die Proben sollen außerdem keine repetitiven Sequenzen enthalten und neben dem Wildtyp-Fragment ein charakteristisches DNA-Fragment erkennen, welches nach der homologen Rekombination zum Beispiel durch das Einbringen einer charakteristischen Restriktions-Erkennungsstelle generiert wird. Einseitig als positiv rekombiniert erkannte ES-Zellklone werden expandiert und dreifach mit einer externen 5'-, einer externen 3'- und einer internen Neo-Probe analysiert, um zusätzliche Integration ausschließen zu können. Bei Bedarf kann der Neo-Resistenzmarker *in vitro* durch transiente Expression von Flp- bzw. Cre-Rekombinase entfernt werden (siehe auch 2.3.4)

Etwa 15 bis 20 solcher manipulierten hemizygoten ES-Zellen werden in Blastozysten mikroinjiziert (Abb. 8 C), die üblicherweise aus C57BL/6 Mäusen isoliert werden. Jeweils 8 bis 10 mikroinjizierte Blastozysten werden in jedes Uterushorn einer pseudoschwangeren Ammenmaus transferiert, die synchron zum Entwicklungsstand der transferierten Blastozysten ist. Daraus entwickeln sich chimäre Tiere, deren Grad an Chimärismus anhand der Fellfarbe abgeschätzt werden kann, da die C57BL/6 Empfängerembryos eine schwarze Fellfarbe und die mikroinjizierten ES-Zellklone in der Regel eine Agouti- oder Chinchilla-Fellfarbe ergeben. Erfahrungsgemäß müssen einige veränderte ES-Zellklone getestet werden, bis man Chimären erhält, die einen hohen Anteil des ES-Zellklons enthalten und bei der folgenden Rückkreuzung mit hoher Wahrscheinlichkeit das veränderte Allel in die Keimbahn weitergeben können. Der Genotyp der verwendeten ES-Zellklone ist männlich, homozygot für die Fellfarbe Agouti (AA) und heterozygot für das veränderte Allel (+/-). Es ist wichtig anzumerken, dass Agouti (Chinchilla) dominant gegenüber der Fellfarbe von C57BL/6 (Non-Agouti,

aa) ist. Der vom Empfängerembryo C57BL/6 abstammende Teil ergibt bei den Chimären eine schwarze Fellfarbe.

Durch das Rückkreuzen der so erhaltenen Chimären mit C57BL/6 Mäusen erhält man in der Regel eine Vielzahl von schwarzen Nachkommen, die von dem C57BL/6 Partner und dem C57BL/6-Anteil der Chimäre abstammen und somit Wildtyp für das entsprechende Gen sind (Abb. 8 D). Agouti Nachkommen sind potenziell hemizygot für das gewünschte Allel, was durch Genotypisierung der Agouti Nachkommen getestet werden kann. Der Genotyp der Agouti Nachkommen ist in jedem Fall Agouti/Non-Agouti (*A/a*), sichtbar durch die braune Fellfarbe, und bei einer idealen Verteilung zu 50 % hemizygot für das veränderte Allel.

Werden hemizygote *knock-out*-Mäuse untereinander verpaart (Abb. 8 E), sollte die Weitergabe des Allels gemäß den Mendelschen Regeln erfolgen, wobei 25 % homozygot, 50 % hemizygot für das veränderte Allel und 25 % Wildtyp-Nachkommen sind (Abb. 8 F).

Bei konditionalen *knock-out*-Mäusen müssen dann noch homo- oder hemizygote konditionale Mäuse mit Cre-transgenen Tieren gekreuzt werden, um zunächst ein Allel durch die Cre-Expression komplett oder gewebespezifisch zu inaktivieren. Da die eingekreuzte Cre-transgene Maus wieder ein Wildtyp-Allel mitbringt, müssen heterozygote *knock-out*-Mäuse wiederum untereinander verpaart werden, um vollständige homozygote *knock-out*-Mäuse zu generieren. Das bedeutet, dass bei einer konditionalen *knock-out*-Strategie *knock-out*-Tiere im Idealfall erst nach einer bis zwei weiteren Mausgenerationen anfallen. Das entspricht einem Zeitraum von mindestens 3 bis 6 Monaten.

### 3.2. Molekularbiologische Methoden

Sofern hier nicht im Detail geschildert, wurden die gängigen Methoden wie zum Beispiel die Klonierung des TR3-Gen-Lokus mittels  $\lambda$ -Bakteriophagen, Bakterienkultur, Bakterien-Transformation, Präparation von Plasmid-DNA etc. nach Sambrook et al. [1989] oder gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

### Klonierungsschritte

In der Regel wurden 10 µg Plasmid-DNA mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen 3- bis 10-fach überverdaut, die Fragmente bei Bedarf mit Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, oder die überhängenden Enden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt (*blunt*), die Fragmente in einem *Low-Melting-Point-Agarose* (LMP) Gel aufgetrennt und mittels Phenol eluiert (modifiziert nach Konecki, persönliche Mitteilung). Es hatte sich gezeigt, dass kommerzielle Elutionskits für die Isolation von DNA-Fragmenten größer als 10 kBp ungeeignet sind und deshalb soll diese hier ausschließlich verwendete Methode kurz beschrieben werden.

Die Fragmente wurden in 0,8 % LMP-Agarose in 1x TAE Puffer bei 80 V aufgetrennt und die zu isolierenden Banden mit einem scharfen Skalpell aus dem Gel herausgetrennt. In der Regel wurden 50 µl Lösung A zu dem Gelstück zugegeben und mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 500 µl aufgefüllt. Das Gel wurde bei 68°C für etwa 10 min geschmolzen und anschließend zweimal mit 0,7 Volumen Phenol extrahiert (vortexen, 3 min bei mehr als 10,000 g zentrifugieren, die obere wässrige Phase nochmals phenolisieren). Anschließend wurde die wässrige Phase mit zweieinhalbfachem Volumen 1-Butanol zwei- bis dreimal nachextrahiert, um Phenol- und Ethidiumbromid-Reste zu entfernen und das Endvolumen für die anschließende Ethanol-Fällung auf das eingangs zugegebene Volumen der Lösung A einstellen zu können. Nach Zugabe von zweieinhalbfachem Volumen 100 % EtOH wurde nochmals für 10 min bei mehr als 10,000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 20 µl TE gelöst. Davon wurden für die Ligation in der Regel 4 µl Insert und 2 µl Vektor und für die Kontrollen nur Vektor oder Insert eingesetzt. Bei *blunt-end* Ligationen und großen Fragmenten war es von Vorteil, die Ligation bei 20°C zu starten und sukzessiv über Nacht auf 4°C abkühlen zu lassen. Ansonsten waren 60-90 min bei Raumtemperatur ausreichend. Aliquote der Ligationsprodukte wurden vor der Transformation in Bakterien in einem analytischen Gel kontrolliert.

**Lösung A:** 1 M NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8,0

**TE:** 10 mM Tris/HCL pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0

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

### Hybridisierung komplementärer Oligonukleotide

Die gelösten, äquimolaren (etwa 1 µg/µl), komplementären Oligonukleotide wurden für 5 min auf 95°C erhitzt und zwei Stunden im Thermomixer gleichmäßig auf RT abgekühlt.

### Radioaktive Markierung von DNA Proben

Für die radioaktive Durchmarkierung von DNA-Fragmenten wurde die Multiprime Methode angewendet [Feinberg und Vogelstein, 1983]. Etwa 10 ng DNA wurden mit dem *Random Primed DNA Labeling Kit* (Roche) und 50 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-CTP nach den Angaben des Herstellers markiert. Die überschüssigen Nukleotide wurden über eine Sephadex G-50 Säule (Pasteurpipette, Säulenvolumen: 2 ml, Laufpuffer: 1x TE) abgetrennt. Die inkorporierte Radioaktivität wurde in einem Benchtop Radioisotop Counter gemessen, und die Probe vor der Hybridisierung 5 min bei 95°C denaturiert.

### Radioaktive 5'-Endmarkierung von Hybridisierungsproben

Für die Klonierung des TR3-Lokus, wurden unter anderem radioaktiv endmarkierte Oligonukleotide verwendet. In 20 µl Endvolumen wurden 50 ng Oligonukleotide mit 2 µl 10x Kinasepuffer, 50 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (3000 mCi/mmol, 10 mCi/ml) und 10 Units T4-Polynukleotid-Kinase gemischt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die nicht-inkorporierten Nukleotide wurden wiederum über eine Sephadex G-50 Säule abgetrennt und die Radioaktivität in einem Benchtop Radioisotop Counter gemessen.

### PCR

Das Primer-Design für die PCR wurde nach folgenden Kriterien gemacht: Die Primer sollten etwa 25 Bp lang sein, keine repetitiven Elemente enthalten und am 3'-Ende zwei bis drei Purin-Basen haben. Für die Amplifikation von Fragmenten mit zellulärer DNA als Matrize war eine Schmelztemperatur zwischen 60 und 70°C von Vorteil. Die Zyklen waren wie folgt: 3 min initiale Denaturierung bei 95°C, anschließend 35 Zyklen mit: Denaturierung bei 95°C für 20 sec, Primer-Annealing für 20 sec bei

Primer-entsprechender Temperatur, 1 min Elongation pro 1 kbp Insertlänge bei 72°C und ein finaler Elongationsschritt für 5 min bei 72°C. Danach wurde die Reaktion auf 4°C abgekühlt. Die Konzentrationen der notwendigen Komponenten wurden gemäß den Herstellerangaben (Advantage 2 Polymerase, Clontech) eingestellt.

### Isolierung genomischer DNA

Bei der Isolierung von zellulärer DNA aus ES-Zellen und DNA von Mäuseschwänzen wurde unterschiedlich verfahren:

Auf einer 6-Loch-Platte konfluent gewachsene ES-Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und über Nacht in der Platte bei 55°C in Lyse-Puffer lysiert. Für eine spätere Southern-Blot-Analyse oder PCR-Analyse war es vollkommen ausreichend, die DNA mit einem 2-fachen Volumen 100 % EtOH/150mM NaCl Gemisch zu fällen. Nach mehrfachem Schütteln, konnte die präzipitierte DNA mit einer Pipette abgenommen werden. Die DNA wurde daraufhin dreimal mit 70 % EtOH gewaschen, kurz bei 50°C getrocknet und in 500 µl TE gelöst. Kurze Inkubation bei 55°C ermöglichte ein fast vollständiges Lösen der DNA.

Für die Präparation von DNA aus Mäuseschwänzen wurden zwei unterschiedliche Techniken verwendet. Dabei hatte es sich gezeigt, dass die Lyse in oben angegebenem Puffer mit anschließender mehrfacher Phenol/Chloroform-Extraktion zwar eine gute Ausbeute an DNA ergab, aber die Qualität der DNA unter Verwendung eines DNA-Isolations-Kits aus Gewebe (DNeasy, Qiagen) besser war. Für die anschließende Southern-Blot-Analyse wurde die dadurch erhaltene DNA mit 2,5-fachem Volumen 100% EtOH und 300 mM Ammoniumacetat gefällt und in einem kleinen Volumen von 30 µl TE aufgenommen. Davon wurden 10 µg zelluläre DNA für die Southern-Blot-Analyse eingesetzt.

**Lyse-Puffer:** 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM EDTA pH 8,0, 10 mM NaCl, 0,5 % SDS, 200 µg/ml Proteinase K

### Southern-Blot-Analyse

Zehn µg zelluläre DNA oder 100 ng Plasmid-DNA wurden mit dem entsprechenden Restriktionsenzym in Gegenwart von RNase A über Nacht geschnitten. Wegen der schlechten Qualität von Mäuseschwanz-DNA ist es notwendig, 4 mM Spermidin

Endkonzentration für einen besseren Zugang der Restriktionsenzyme zur DNA zu verwenden. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA in TAE wurde die DNA aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran (Hybond N+) nach der Methode von Southern transferiert [Southern, 1975]. Dabei wurde zunächst das Gel für 15 min in 0,25 N HCl geschwenkt, um DNA-Strangbrüche zu induzieren, wodurch sich ursprünglich große Fragmente besser transferieren ließen. Anschließend wurde die DNA durch einstündige Behandlung des Gels mit 1,5 M NaCl/0,5 N NaOH denaturiert. Der Transfer erfolgte über Nacht, wobei es sich gezeigt hatte, dass die Qualität des Blots von der Art des Transfers abhängt. Die Nylonmembran wurde direkt blasenfrei auf das Gel und darauf zwei Whatman-Papiere und Zellstoff gelegt. Die Menge der im Gel enthaltenen Denaturierungslösung war für einen Transfer der DNA vollkommen ausreichend. Beim Transfer wurde die DNA unter den denaturierenden Bedingungen kovalent mit der Membran verbunden. Nach dem Blotten wurde die Membran kurz in 2x SSC geschwenkt und für 1 h in einer Hybridisierungsröhre in Hybridisierungspuffer prähybridisiert. Anschließend wurde die vorher für 5 min bei 95°C denaturierte, radioaktiv markierte Probe in Hybridisierungspuffer über Nacht in einem Rotationshybridisierungssofen bei 65°C hybridisiert. Die Blots wurden in der Regel dreimal mit 0,5% SDS/0,2x SSC bei 65°C gewaschen, bevor sie dann bei -80°C in Kassetten mit Verstärkerfolie autoradiographiert wurden.

**20x SSC:** 3 M NaCl, 300 mM Trinatriumcitrat/NaOH pH 7,0

**Hybridisierungspuffer:** 400 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 200 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,1, 7% (w/v) SDS, 1 mM EDTA/NaOH pH 8,0

### Isolierung gesamtzellulärer RNA

Mausgewebe wurde nach der Präparation sofort in Aluminiumfolie verpackt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Das tiefgefrorene Gewebe wurde mechanisch zerkleinert und sofort in saures Phenol-Guanidiniumthiocyanat (peqGOLDTriFast; peqlab) überführt und in einem Polytron Homogenisator homogenisiert. Die weiteren Schritte, wie Phasentrennung mittels Chloroform, RNA-Präzipitation und Waschen mit 70% EtOH erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers. Die gewaschene und getrocknete RNA wurde in RNase-freiem H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -80°C gelagert.

### Northern-Blot-Analyse

Zwanzig µg Gewebe-RNA wurden mit 30 µl Ladepuffer versetzt, für 10 min bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert, um so mögliche Sekundärstrukturen zu verhindern. Die Auftrennung erfolgte über Nacht in einem 1 % Formaldehyd-Agarosegel in 1x MOPS-Puffer bei 40 V. Der RNA-Transfer auf eine Nylonmembran (Hybond N+) wurde mittels 10x SSC über Nacht gewährleistet. Die Membran wurde nach dem Blotting in 5x SSC geschwenkt und durch UV-Licht kovalent an die Membran gebunden. Die weiteren Schritte entsprachen denen des Southern-Blots.

**10x MOPS-Puffer:** 0,4 M MOPS (freie Säure), 100 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA pH 8,0, pH 7,0

**Formaldehyd-Agarosegel:** 2,2 M Formaldehyd, 1x MOPS-Puffer, 1% (w/v) Agarose

**RNA-Ladepuffer:** 50% (v/v) Formamid, 2,2 M Formaldehyd, 1x MOPS-Puffer, 50 µg/ml Ethidiumbromid, 0,2% (w/v) Bromphenolblau

### Rapid Analysis of C-terminal Ends (RACE)

Für die Amplifikation von cDNA's war es hilfreich, wenn zuvor die mRNA aus Gesamt-RNA isoliert wurde, was mit dem *PolyAtract mRNA Isolation System IV* (Promega) bewerkstelligt wurde. Diese Gesamt-mRNA wurde sodann gemäß den Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben, mit Adaptoren versehen und die gewünschte cDNA mit der Kombination aus Adaptor- und Gen-spezifischen Primern amplifiziert (Marathon<sup>TM</sup> cDNA Amplification Kit, Clontech).

Die RACE wurde mit einem modifizierten PCR-Protokoll durchgeführt, bei welchem die Schmelztemperatur der ersten 10 Zyklen so gewählt wurde, dass der Adaptor-Primer (61°C Schmelztemperatur) im Gegensatz zum Gen-spezifischen Primer noch nicht binden kann (*Touch Down PCR*). Erst bei den weiteren Zyklen wurde die Schmelztemperatur entsprechend dem Adaptor-Primer gewählt, so dass eine spezifische Amplifikation erreicht werden konnte (Advantage<sup>®</sup> PCR Enzyme System, Clontech).

### 3.3. Sonstige Methoden

#### $\beta$ -Galactosidase-Färbung von Zellen und Geweben

Zunächst wurden die Präparate einmal mit PBS gewaschen. Zellen wurden für 5 min und Gewebe für 15-60 min in ungefähr zehnfachem Probenvolumen in Lösung B bei RT fixiert. Zellen wurden dreimal für 5 min und Gewebe je nach Gewebegröße dreimal 15-30 min in Lösung C bei Raumtemperatur gewaschen. Lösung C wurde durch die Färbelösung D ersetzt und die Präparate bei 37°C für 1-24 h inkubiert. Nach dem Färben wurden die Präparate in Lösung C gewaschen und konnten für mehrere Tage bei 4°C gelagert werden. Für längere Lagerungszeiten wurden die Proben mit 4% Paraformaldehyd für 2 h durchfixiert und in 70% EtOH aufbewahrt.

**PBS (Mg<sup>2+</sup>-frei):** 0,8% (w/v) NaCl, 0,02 % (w/v) KCl, 0,114 % (w/v) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,024 % (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4

**Lösung A<sup>+</sup>:** 0,1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3, 5 mM EGTA/pH 8, 0,2 mM MgCl

**Lösung B:** Lösung A<sup>+</sup>, 0,2 % (v/v) Glutaraldehyd

**Lösung C:** Lösung A<sup>+</sup>, 0,01 % (w/v) Na-Desoxycholat, 0,02 % (w/v) Nonidet P-40

**Lösung D:** Lösung C, 0,5 mg/ml X-gal, 10 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 10 mM K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]

#### Kultivierung und Transfektion von HeLaS3- bzw. NIH3T3-Zellen

Die adhärenenten, humanen HeLaS3- und murinen NIH3T3-Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Partialdruck in einem wasserdampfgesättigten Inkubator kultiviert, alle 3-4 Tage trypsiniert und je nach Dichte ausplattiert.

Die Transfektion der Zellen mit Plasmid-DNA wurde mit Hilfe von LipofektAMIN (Qiagen) durchgeführt. Die Zellen wurden auf 10 cm Zellkultur-Platten bis zu einer Dichte von etwa 50 % kultiviert. Das Kulturmedium wurde durch Serum-freies Optimem1 Medium (GibcoBRL) ersetzt und für 2 h unter Standardbedingungen inkubiert. 5 µg Plasmid-DNA wurden mit 30 µl LipofektAMIN und 1 ml Optimem gemischt, für 20 min bei RT inkubiert und auf die Zellen gegeben. Nach 4 h wurde das Transfektionsgemisch durch Zellkulturmedium ersetzt.

**Zellkulturmedium:** DMEM plus 10 % FKS, 100 u/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin, 2 mM Glutamin



### Präparation von Metaphase-Chromosomen aus ES-Zellen

Für die Präparation von Metaphase-Chromosomen aus ES-Zellen (ES-Zellkultur s.u.) wurden exponentiell wachsende Zellen für 25 min mit Colcemide (0,05 µg/ml) inkubiert, indem dieses direkt in das Medium gegeben und durch vorsichtiges Schwenken verteilt wurde. Nach der Behandlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mittels Trypsin/EDTA vereinzelt, das Trypsin mit Medium inaktiviert, die Zellen zentrifugiert und das Medium möglichst vollständig abgenommen. Das Zellpellet wurde zunächst in einem kleinem Volumen 0,56 % KCl resuspendiert, auf 10 ml mit 0,56 % KCl aufgefüllt und für 6 min bei RT inkubiert. Aufgrund der hypotonen Behandlung, die die Zellen fragil macht, erfolgten die folgenden Zentrifugationsschritte bei 1000 rpm für jeweils 5 min. Nach der Zentrifugation wurde möglichst vollständig die KCl-Lösung abgenommen, das Pellet gelöst und die Zellen mit Fixativ (etwa 10 ml) überschichtet und für 5 min inkubiert. Danach folgten 3 Waschschrte, bei denen jeweils das Fixativ erneuert wurde, und nach dem letzten Schritt wurde das Pellet in 2 ml Fixativ aufgenommen. Dabei war darauf zu achten, dass die Zellen aufgrund ihrer Brüchigkeit sehr vorsichtig gehandhabt wurden und die Bildung von Luftblasen während des Resuspendierens der Pellets vermieden wurden. Die *Feeder*-Zellen in der fixierten ES-Zellsuspension ließ man dann für mindestens 30 min absinken, bevor mit dem Aufbringen der ES-Zellen auf Objektträger begonnen wurde. Die Objektträger sollten sauber und fettfrei sein und in 70% EtOH gelagert werden. Man gab einen Tropfen aus dem Überstand der Zellsuspension mit einem Abstand von 5 cm auf einen getrockneten Objektträger, ließ den Tropfen durch die Wärme einer Tischlampe antrocknen bis Newtonsche Ringe erschienen. Darauf gab man dann einen weiteren Tropfen Fixativ, wobei durch die mikroskopische Wellenbewegung von der Mitte nach außen die Metaphase-Chromosomen voneinander räumlich separiert wurden. Die Tropfen wurden sodann nochmals unter der Tischlampe getrocknet und die Zelldichte unter einem Mikroskop abgeschätzt. Für die FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) wurden die Präparate dann für etwa eine Woche bei RT und danach präferentiell in 70% EtOH gelagert .

**Hypotone Lsg.:** 0,56% (w/v) KCl in H<sub>2</sub>O (jeweils frisch präpariert)

**Fixativ:** 3:1 Methanol/Eisessig, kalt oder auch RT (jeweils frisch präpariert)

### Präparation von Gewebeschnitten für die Histologie und REM-Analyse

Die Mäuse wurden mit CO<sub>2</sub> getötet und sezirt. Die präparierten Gewebe wurden unverzüglich in PBS gepuffertem 4-prozentigem Formalin fixiert. Vor der Paraffin-einbettung wurden die Präparate in aufsteigender EtOH-Reihe entwässert. Das Paraffin-eingebettete Gewebe wurde freundlicherweise von Fr. Samson (Institut für Pathologie, GSF) geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin für die Histologie gefärbt. Die für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) bestimmten Gewebe und Spermien wurden freundlicherweise von Dr. U. Heinzmann (Institut für Pathologie, GSF) weiterbehandelt und die Struktur ermittelt.

### Tierhaltung

Die Mäuse wurden in einer SPF-Barrierhaltung in Typ 2 Polycarbonatkäfigen in vollklimatisierten Räumen gehalten. Die Mäuse bekamen Standard-Nager-Futter (Altromin GmbH, Lage) und Wasser *ad libitum* und waren einem zwölfstündigem Hell-Dunkel-Zyklus ausgesetzt.

## 3.4. ES-Zellkultur

Aufgrund der Komplexität und der außerordentlichen Bedeutung für diese Arbeit soll die ES-Zellkultur an dieser Stelle ausführlicher beschrieben werden.

Die Zellen wurden immer bei 5% CO<sub>2</sub> Partialdruck und 37°C in einem wasserdampf-gesättigten Inkubator kultiviert. Sämtliche Zentrifugationsschritte erfolgten bei 1200 rpm (270g) für 4 min.

Sämtliche Medien, Trypsin/EDTA und PBS (ohne Ca<sup>2+</sup>, ohne Mg<sup>2+</sup>) wurden von GibcoBRL bezogen. Für die ES-Zellkultur wurden ausschließlich Einmalplastik-Pipetten und Zellkulturschalen benutzt.

### Kultivierung von embryonalen Fibroblasten (*Feeder*)

Primäre Fibroblasten aus 15 p.c. Mäuseembryos werden routinemäßig als Serviceleistung am Institut für Säugetiergenetik präpariert, aliquotiert (5x10<sup>6</sup> Zellen/

Aliquot) und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Drei Tage vor Gebrauch wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, sofort in 10 ml *Feeder*-Medium überführt, abzentrifugiert und auf 5x 15 cm Platten in *Feeder*-Medium kultiviert. Nach drei Tagen wurden die *Feeder*-Zellen für die Mitomycin-Behandlung (MMC) mit PBS gewaschen und für 2,5 h in Medium inklusive MMC (0,01 mg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, 5 min trypsinisiert, durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt, das Trypsin durch Zugabe von mindestens dem gleichen Volumen *Feeder*-Medium inaktiviert und die Zellen abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in einer Konzentration von  $0,8 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in *Feeder*-Medium ausplattiert. Die *Feeder*-Zellen adhärten über Nacht und konnten bis zu 4 Tage nach MMC-Behandlung für die Kokultivierung mit ES-Zellen benutzt werden.

**Feeder-Medium:** 500 ml DMEM (*high glucose*), 2 mM Glutamin, 57 ml FKS, 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren (GibcoBRL)

### Kultivierung von ES-Zellen

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche ES-Zelllinien TBV2 und E14 verwendet [Hooper et al., 1987]. Bei TBV2 handelte es sich um eine in der GSF von der Gruppe von W. Wurst's Labor etablierte und häufig verwendete ES-Zelllinie. ES-Zellen sollten aus Differenzierungsgründen möglichst immer auf MMC-behandelten *Feeder*-Zellen kokultiviert werden, da die *Feeder*-Zellen nicht nur differenzierungs-inhibierende Faktoren produzieren, sondern auch Rezeptoren für das Adhären von ES-Zellen. Um den pluripotenten Phänotyp zu erhalten, wurden die ES-Zellen zusätzlich in Gegenwart von *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF, GibcoBRL) bei einer Konzentration von 1000 U/ml kultiviert [Williams et al., 1988, Moreau et al., 1988, Smith et al., 1988].

Ein ES-Zell-Aliquot wurde im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und sofort in 10 ml Medium abzentrifugiert, in 5 ml ES-Zellmedium aufgenommen und auf eine 6 cm *Feeder*-Platte gegeben und inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium durch 5 ml frisches ES-Zellmedium ersetzt. Am zweiten Tag nach dem Auftauen sollten undifferenzierte ES-Zellkolonien mit klar abgegrenzten Oberflächen erscheinen. Um ein potenzielles Differenzieren zu verhindern, wurden die ES-Zellen jeden zweiten Tag vereinzelt. Die Zellkulturplatte wurde einmal mit PBS gewaschen,

für etwa 10 min mit Trypsin/EDTA behandelt und die ES-Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren (10-20 x) vereinzelt. Durch Überführen in mindestens zweifaches Volumen Medium (3 ml) wurde das Trypsin inaktiviert. Nach dem Zentrifugieren wurden die ES-Zellen in der Regel 1:4 verdünnt und auf frische *Feeder*-Platten gegeben. Am darauffolgenden Tag wurde wieder das Medium gewechselt etc.

**ES-Zellmedium:** 500 ml DMEM (*high glucose*), 2 mM Glutamin, 1000 U/ml LIF (GibcoBRL), 0,1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol (GibcoBRL), 75 ml GibcoBRL ES-FKS (hitzeinaktiviert für 30 min bei 56°C) bzw. 75 ml Roche ES-FKS (hitzeinaktiviert für 30 min bei 56°C) für TBV2 oder E14 respektive

### Elektroporation von ES-Zellen (*knock-out*-Konditionen)

Eingefrorene ES-Zellen wurden auf einer 6 cm *Feeder*-Platte aufgetaut, tags darauf Medium gewechselt und am nächsten Tag 1:4 verdünnt. Nach 2 weiteren Tagen wurden sie 1:2 auf frische *Feeder* gegeben und 24 h später für die Elektroporation vorbereitet. Die ES-Zellen wurden mit PBS gewaschen, trypsiniert, zentrifugiert und nochmals mit kaltem PBS gewaschen. Pro Elektroporation wurden  $7 \times 10^6$  ES-Zellen und 20  $\mu$ g zuvor linearisiertes *Targeting*-Plasmid in einem Endvolumen von maximal 900  $\mu$ l in eiskaltem PBS in einer 0,4 cm Küvette gemischt. Die Elektroporation wurde in einem BioRad Gene Pulser bei 240 V und 500  $\mu$ F durchgeführt und sollte eine Zeitkonstante von etwa 6 msec ergeben. Nach 10 min Inkubation in der Küvette bei RT wurden die ES-Zellen vorsichtig in ES-Zellmedium überführt und auf zwei 10 cm Gelatine-beschichtete oder G418-resistente *Feeder*-Platten ausgesät. Neuerdings existieren G418 resistente *Feeder*-Zellen [C57BL/6-TgN(pPGKneobpA)3Ems; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA], so dass die ES-Zellen auch während der anschließenden G418 Selektion von *Feeder*-Zellen profitieren konnten. Einen Tag nach der Elektroporation wurde das Medium gewechselt und am zweiten mit der Selektion begonnen. Als positive Selektion wurde G418 (GibcoBRL) mit einer Endkonzentration von 200  $\mu$ g/ml und als negative Selektion Gancyclovir (2  $\mu$ M) eingesetzt. Gancyclovir ist ein Substrat der TK und tötet Zellen durch Doppelstrangbrüche in der DNA [Mansour et al., 1989]. Als Kontrolle wurde eine Platte nur mit G418 selektioniert, wodurch etwa zehnmals mehr resistente Einzelzellkolonien erscheinen sollten, als auf den doppelt selektionierten Platten

(siehe 2.3.2). Jeden Tag wurde das Selektionsmedium gewechselt und nach 6-8 Tagen Selektion wurden doppelt resistente Einzelzellklone sichtbar.

#### Picken, Expandieren und Analyse der ES-Einzelzellklone

Etwa 400-500 resistente Einzelzellklone wurden sodann unter dem Binokular mit einer 20 µl Pipette einzeln gepickt und auf 96-Lochplatten mit *Feeder* und 150 µl ES-Zellmedium gegeben. Am darauffolgenden Tag wurde das ES-Zellmedium vorsichtig abgesaugt, und die Klone mit jeweils 25 µl Trypsin/EDTA vereinzelt und auf frische 96-Lochplatten mit *Feeder* gegeben. Einen Tag später wurde das Medium erneut gewechselt und am zweiten Tag nach dem Vereinzeln wurde jeder Klon auf 4 Replika-Platten gebracht. Zwei Platten davon waren 96-Lochplatten mit *Feeder*-Zellen für das spätere Einfrieren, die beiden anderen waren gelatinierte 96-Lochplatten für die Southern-Blot-Analyse im 96-Loch-Maßstab. Zwei bis drei Tage nachdem die Klone 1:4 aufgeteilt wurden, wurden die ES-Zellklone auf den *Feeder*-Platten eingefroren. Dazu wurden die Klone mit PBS gewaschen, für 5 min mit 30 µl trypsinisiert und das Trypsin mit 70 µl kaltem ES-Zellmedium inaktiviert. Nach Zugabe von 100 µl kaltem 2x Einfriermedium, dreimaligem Auf- und Abpipettieren und Versiegeln der Platten mit Paraffin, wurden sie in Zellstoff gewickelt, in Pappschachteln verpackt und auf diese Weise bei -80°C eingefroren. Einen Tag später wurden die ES-Zellen auf den Gelatine-Platten mit PBS gewaschen und mit 50 µl Lyse-Puffer (siehe 2.3.2) pro Loch über Nacht bei 55°C lysiert. Die DNA wurde im 96-Loch-Maßstab wie unter 2.3.2 beschrieben gefällt, dreimal mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in einem Restriktionsansatz von 30 µl Gesamtvolumen mit 20 U Enzym pro Loch über Nacht verdaut. Zwischen den einzelnen Waschschrritten mit 70% EtOH wurden die Platten in einem Plattenrotor für 3 min bei 3000 g zentrifugiert. Die verdaute DNA wurde mit einer Zwölfkanalpipette direkt auf ein Agarose-Gel mit 100 Taschen (*The Centipede™ Wide Format Electrophoresis System*, OWL Scientific, Inc.) pipettiert, wodurch 96 Einzelzellklone simultan mittels Southern-Blot analysiert werden konnten. Das weitere Vorgehen ist unter 2.3.2 beschrieben.

**2 x Einfriermedium:** 80% FKS, 20% DMSO

### Expandieren von homolog rekombinierten ES-Zellklonen

Die eingefrorenen 96-Lochplatten wurden auf vorgewärmten Messingblöcken oder alternativ im Wasserbad aufgetaut und die positiven Klone markiert. Die Platten wurden im Plattenrotor bei 270 g zentrifugiert, anschließend das DMSO-enhaltende Einfriermedium bei den positiven Klonen vorsichtig abgesaugt, die ES-Zellen mit 150 µl frischem ES-Zellmedium resuspendiert und auf frische *Feeder* überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und am zweiten Tag wurden die ES-Zellen auf eine 48-Lochplatte mit *Feeder* gebracht. Je nach Zelldichte wurden die Klone individuell behandelt und sukzessiv auf eine 24-Lochplatte, dann auf eine 6-Lochplatte, danach auf eine 6 cm *Feeder*-Platte expandiert. Beim letzten Expansionsschritt auf eine 10 cm Platte wurde ein Aliquot auf eine 6-Lochplatte für die spätere Southern-Blot-Analyse der expandierten Klone abgezweigt. Nach zwei weiteren Tagen auf der 10 cm *Feeder*-Platte wurden die ES-Zellen in vier Aliquots pro 10 cm Platte zunächst bei  $-80^{\circ}\text{C}$  im Einfriercontainer (Nunc) eingefroren, bevor sie dann in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

### Transiente Expression von Flp-Rekombinase in ES-Zellen

Da bei dieser Arbeit zum Teil *frt*-flankierte Neomycin-Resistenzkassetten verwendet wurden, bestand die Möglichkeit, den positiven Resistenzmarker bereits in der Zellkultur durch transiente Expression von Flp-Rekombinase zu deletieren, um so die ursprüngliche Wildtyp-Genstruktur so wenig wie möglich durch das *Gene-Targeting* zu verändern. Da bisher noch keine effizienten transgenen Flp-*Deleter* Mäuse erhältlich sind, wurde dieser Weg *in vitro* beschritten.

Positiv homolog rekombinierte ES-Zellklone wurden mit einem zirkulären Flp-IRES-Puromycin-N-Acetyltransferase Expressionsplasmid (pCAGGSFLPe) unter den identischen Bedingungen wie oben beschrieben erneut elektroporiert. Allerdings wurde jeder Elektroporationsansatz 1:8 verdünnt ausplattiert. 24 h nach der Elektroporation wurden transfizierte ES-Zellen transient für die Dauer von 48 h mit 1 µg/ml Puromycin selektioniert. Puromycin selektioniert sehr effektiv transfizierte ES-Zellen bei dieser Konzentration, wohingegen *Feeder*-Zellen Konzentrationen von bis zu 4 µg/ml gut tolerieren [Taniguchi et al., 1998]. Sieben bis acht Tage nach

Elektroporation wurden pro Ausgangsklon 200 Einzelzellklone gepickt, expandiert, analysiert und wiederum positiv rekombinierte ES-Zellklone expandiert.

Zwei Tage vor der Blastozysteninjektion wurden die Klone jeweils auf 6 cm *Feeder*-Platten aufgetaut und am Tag der Injektion mit Trypsin/EDTA vereinzelt.

## 4. Ergebnisse

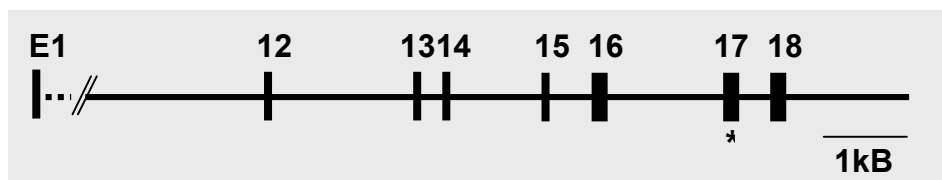
Im ersten Ergebnisteil wird die Etablierung von Mäusen beschrieben, die defizient für die mitochondriale Thioredoxin-Reduktase sind. Der zweite Teil beschäftigt sich einerseits mit der Etablierung von PHGPx *knock-out*-Mäusen und andererseits mit der Charakterisierung einer Spermienkern-spezifischen alternativen Form der PHGPx.

### 4.1. Thioredoxin-Reduktase 3

#### 4.1.1. Klonierung und Sequenzierung

Für eine gezielte Veränderung der Primärstruktur von Mäusegenen muss zunächst der zu untersuchende genomische Locus kloniert, die Exon-Intron-Struktur ermittelt und eine Restriktionskartierung durchgeführt werden. Für aufwändigere *Targeting*-Konstrukte ist es sehr hilfreich, wenn zuvor die Nukleotidsequenz ermittelt wird.

Anhand der *Rattus norvegicus* cDNA [Lee et al., 1999] für die mitochondriale Thioredoxin-Reduktase der Ratte und zweier sequenzierter, humaner Cosmide (AC00078 und AC00090), die den gesamten Exonbereich der humanen TR3 abdecken, wurde eine mögliche Exon-Intron-Struktur der TR3 für Maus *in silico* erstellt. Die Grundlage dafür ist, dass die TR3 zwischen den Spezies Ratte, Maus und Mensch ausreichend konserviert ist. Das humane Gen umfasst einen Bereich von etwa 75 kBp und besteht aus 18 Exons. Wie auch bei den Thioredoxin-Reduktasen von Maus und Ratte kodiert das vorletzte Kodon für SeCys, welches sich bei der TR3 auf dem 17. Exon befindetet (Abb. 9).



**Abb. 9: Genstruktur 3'-Bereich der *Mus musculus* TR3.** Der vollständige Exon-Bereich der Thioredoxin-Reduktase 3 umfasst 75 kBp, wovon etwa 16 kBp aus dem 3'-Bereich mit den letzten sieben Exons (E) kloniert und sequenziert wurden (pMC59). Auf Exon 17 befindet sich das SeCys-Kodon (\*) und auf Exon 18 das SECIS-Element.



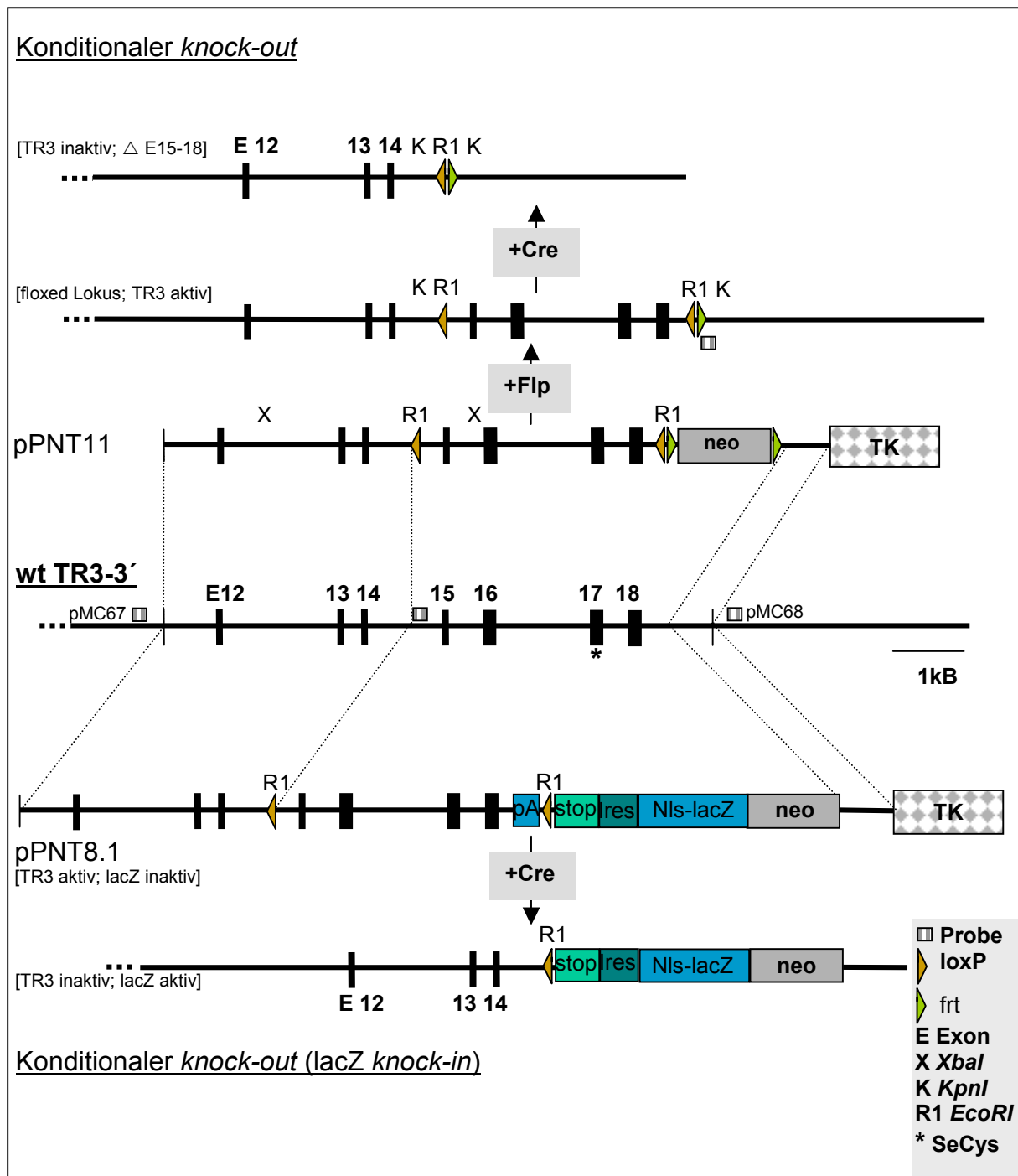
Besonders großes Interesse galt dem 3'-Bereich der TR3, wo sich die für die SeCys-Inkorporation notwendigen Elemente und das SeCys-Kodon befinden. Mittels eines mEST-Klons (IMAGp998N131993; RZPD Berlin), welcher als Gensonde die Exons 10 bis 18 abdeckt, wurde eine 129/SvJ  $\lambda$ -Phagen Bank auf  $\lambda$ -Klone mit den entsprechenden Genfragmenten untersucht. Fünf  $\lambda$ -Klone, von denen einer auch das letzte Exon und 2 kbp nicht-transkribierte Sequenz im 3'-Bereich enthielt (pMC59), konnten isoliert und gereinigt werden (Daten nicht gezeigt).

Die Inserts sämtlicher 5  $\lambda$ -Klone wurden vollständig in pBluescript SK+ umklont, um so ausreichend DNA für die weiteren Schritte zur Verfügung zu haben. pMC59 wurde für die Konzeption konditionaler TR3 *knock-out*-Strategien vollständig sequenziert (Daten nicht gezeigt).

#### 4.1.2. Klonierung der *knock-out*-Konstrukte

Es gibt verschiedene Strategien, Mäuse zu generieren, die defizient für ein ganz bestimmtes Gen sind. Sogenannte klassische, direkte *knock-outs* können zwar mit geringem Aufwand kloniert werden, sind aber im Falle einer embryonalen oder perinatalen Letalität nicht geeignet, die *in vivo*-Funktion des gewünschten Gens zu studieren. Konditionale *knock-outs* sind hingegen in der Herstellung weitaus aufwändiger und zeitintensiver, erlauben aber im Falle der Letalität eine gewebe- und zeitspezifische Inaktivierung des Zielgens. Dies wird durch das Verpaaren von Mäusen mit loxP-flankierten Allelen mit Cre-transgenen Mäusen erreicht. Bezüglich der TR3 wurde sowohl das Cre-loxP-Rekombinationssystem aus dem Coliphagen P1 als auch das Flp-*frt*-System aus Hefe benutzt [Abremski et al., 1981, Andrews et al., 1985].

Die beiden Strategien für TR3 sind in Abb. 10 schematisch dargestellt. Bei pPNT11 handelt es sich um ein konditionales *knock-out*-Konstrukt. Die letzten 4 Exons mit dem SeCys-Kodon und dem für die Inkorporation unerlässlichen SECIS-Element auf Exon 18 werden dabei von zwei loxP-Stellen flankiert. Der positive Selektionsmarker Neomycin-Phosphotransferase, der für die Selektion von homolog rekombinierten ES-Zellklonen notwendig ist, ist zusätzlich noch von zwei *frt*-Stellen umgeben. Die Resistenzkassette kann somit bei Bedarf durch die Überexpression von Flp-Rekombinase *in vivo* oder *in vitro* entfernt werden. Dies kann notwendig sein, falls der konstitutiv exprimierte Selektionsmarker mit der endogenen Expression der TR3



**Abb. 10: TR3 *knock-out*-Strategien.** Ausgehend von der Wildtyp-Situation in der Mitte (wtTR3-3') ist die Strategie für den konditionalen *knock-out* (pPNT11) nach oben und die Strategie für den konditionalen lacZ *knock-in* (pPNT8.1) nach unten dargestellt. Bei der ersten Strategie (pPNT11) wurden die Exons 15 bis 18 mit zwei loxP-Stellen für die spätere Deletion durch Cre-exprimierende transgene Mäuse flankiert. Ferner kann der frt-flankierte positive Selektionsmarker *in vitro* oder *in vivo* durch Flp-Expression deletiert werden. Bei der zweiten Strategie (pPNT8.1) wurden wiederum die letzten vier Exons mit loxP-Stellen flankiert. In den nicht transkribierten 3'-Bereich wurde eine Transkriptionsstop(pA)-Translationsstop(stop)-IRES-Nls-lacZ-Kassette eingesetzt. Diese soll durch Cre-vermittelte Inaktivierung der TR3 gleichzeitig aktiviert werden, um so die gewebe- und zeitspezifische Expression der TR3 studieren zu können. (Neo = Neomycin-Resistenzkassette; TK = Thymidin-Kinase-Kassette).

negativ interferiert. Die 5'-loxP-Stelle wurde so positioniert, dass sie sich nicht in näherer Umgebung der Verzweigungsstelle für das Spleißen befindet [Übersicht in Knippers, 1993]. Nach Verpaarung mit Cre-exprimierenden Mäusen können die letzten 4 Exons der TR3 deletiert werden.

Dasselbe trifft auch für die zweite Strategie zu (pPNT8.1). Allerdings soll im Unterschied zur „klassischen“ konditionalen Strategie bei Cre-induzierter Gen-Inaktivierung gleichzeitig eine lacZ-Kassette aktiviert werden, deren Expression von dem endogenen Promotor der TR3 reguliert wird. Durch das Kreuzen von Cre-transgenen Mäusen mit Mäusen, die dieses TR3-Allel (pPNT8.1) besitzen, soll gleichzeitig mit dem endogenen Polyadenylierungssignal (polyA-Signal) der TR3 das einklonierte polyA-Signal entfernt werden, um die Transkription der STOP-IRES-Nls-lacZ-Kassette zu ermöglichen. Das zusätzlich eingeführte polyA-Signal soll bewirken, dass die RNA-Polymerase an dieser Stelle gestoppt und die Transkription der IRES-Nls-lacZ-Kassette vor der Cre-induzierten Inaktivierung der TR3 verhindert wird. Diese Strategie soll verhindern, dass durch alternatives Spleißen (*Splicing Around*) eine vorzeitige, unerwünschte Inaktivierung der TR3 bei gleichzeitiger Aktivierung der LacZ-Kassette erfolgt. Nach Cre-induzierter Inaktivierung der TR3 soll das Translations-STOP-Element die Ribosomen vor der IRES terminieren. Die IRES erlaubt eine vom N-Terminus der TR3 unabhängige, jedoch weiterhin von den Regulationselementen der TR3 abhängige Expression der  $\beta$ -Galactosidase.

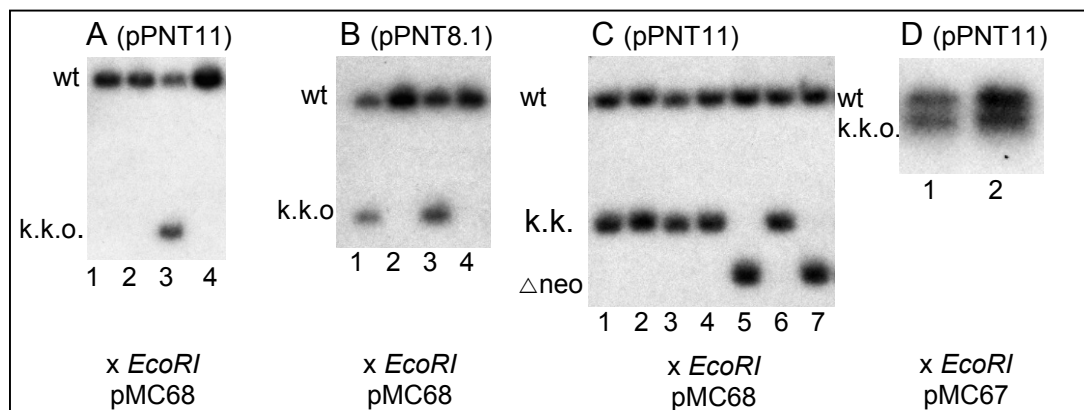
Beide Konstrukte wurden für das *Gene-Targeting* in ES-Zellen eingebracht, um auf heterozygote, konditionale ES-Zellklone selektionieren zu können.

#### **4.1.3. ES-Zellkultur und Blastozysteninjektion**

Beide linearisierten *Targeting*-Konstrukte wurden in zwei unterschiedliche ES-Zelllinien elektroporiert. TBV2 Zellen haben eine hohe Rekombinationsfrequenz, differenzieren allerdings im Gegensatz zu der E14 ES-Zelllinie bei hoher Zelldichte leicht [W. Wurst, persönliche Mitteilung]. Die E14 Zelllinie soll eine weitaus niedrigere Rekombinationsfrequenz haben, was bei dieser Arbeit hingegen nicht festgestellt wurde. E14 ES-Zellen tolerieren eher sowohl Wachstum bei größerer Dichte als auch höhere Passagenzahlen hinsichtlich ihrer Keimbahntransmissivität.

Pro Konstrukt und Zelllinie wurden jeweils 500 Einzelzellklone gepickt und hinsichtlich homologer Rekombination analysiert. Die Frequenz der korrekten homologen Rekombination lag für pPNT11, gemessen mit einer 3'-externen Probe, für beide ES-Zelllinien bei 5 % der im Southern-Blot getesteten G418- und Gancyclovir resistenten Einzelzellklone. Die Rekombinationsfrequenz für beide ES-Zelllinien lag für pPNT8.1 bei 8%. Positive ES-Zellklone wurden expandiert und homologe Rekombination zusätzlich mit der linken externen 5'-Probe überprüft (Abb. 11). Zusätzliche zufällige, illegitime Integrationen konnten durch eine Sonde, bestehend aus dem Gen für die Neomycin-Phosphotransferase, ausgeschlossen werden.

Zwei für pPNT11 hemizygote ES-Zellklone wurden daraufhin mit einem Flp-IRES-Puromycin-N-Acetyltransferase Expressionsplasmid (pCAGGSFLPe) transfiziert und transient mit Puromycin selektiert. Durch die transiente Puromycin-Selektion lassen sich effizient nicht-transfizierte ES-Zellklone von positiv transfizierten Klonen abtrennen, um so den relativen Anteil positiv rekombinierter ES-Zellklone zu erhöhen. Jeweils 200 Puromycin-resistente Einzelzellklone wurden pro transfiziertem ES-Zellklon mittels Southern-Blot analysiert. Die Flp-vermittelte Rekombinationsfrequenz lag in beiden Fällen bei 6 %.



**Abb. 11: Gene-Targeting der TR3.** Exemplarisch ist hier die Southern-Blot-Analyse von hemizygoten ES-Einzelzellklonen für beide für TR3 verwendeten *Targeting*-Konstrukte gezeigt. (A) Mit pPNT11 transfizierte ES-Zellklone (E14). Die homologe Rekombination (A3) wurde zunächst mit der 3'-externen Probe pMC68 verifiziert. Dasselbe ist in (B) exemplarisch gezeigt (B1/B4), wobei es sich um das lacZ *knock-in*-Konstrukt pPNT8.1 handelt. (C) Mehrere positiv rekombinierte ES-Zellklone aus (A) wurden zusätzlich transient mit Flp-Rekombinase transfiziert und mittels Southern-Blot auf Neo-Deletion getestet (C5/C7). (D) Homologe Rekombination wurde für beide Strategien zusätzlich noch mit einer 5'-externen Probe (pMC67) bestätigt; ist hier aber nur für pPNT11 gezeigt (D1/D2) (Abk.: k.k.o. = konditionales *knock-out*-Allel; wt = Wildtyp-Allel).

Neo-deletierte Klone (Abb. 11 C5/C7) wurden expandiert, das veränderte Allel mit den externen Proben kontrolliert und eine mögliche Integration des Flp-Expressionsplasmids mit einer Probe, bestehend aus dem Puromycin-Acetyltransferase-Gen, ausgeschlossen. Diese wurden sodann in C57BL/6 Blastozysten mikroinjiziert.

Die Blastozysteninjektion wird als Serviceleistung am Institut für Säugetiergenetik in der GSF routinemäßig durchgeführt, da der Erfolg der Injektionen und der damit verbundenen Transfers in pseudoschwangere Empfängermäuse von ständiger Durchführung abhängt. Dabei werden aus mit HCG (*Human Chorion Gonadotropin*) und PMSG (*Pregnant Mare Serum Gonadotropin*) superovulierten C57BL/6 Spendermäusen 2,5 Tage p.c. Blastozysten isoliert und daraufhin jeweils 15 bis 20 manipulierte, hemizygote ES-Zellen in deren Blastocoel mikroinjiziert. Etwa 16 bis 20 mikroinjizierte Blastozysten werden dann jeweils bilateral in die Uteri von pseudoschwangeren Empfängermäusen 2,5 p.c. (CD-1) transferiert. Nach 19 Tagen Trächtigkeit und einer weiteren Woche nach der Geburt kann der Anteil der manipulierten ES-Zelllinie an den Chimären anhand der Fellfarbe abgeschätzt werden (Abb. 8). Die männliche E14 ES-Zelllinie ergibt im Gegensatz zur schwarzen Fellfarbe der C57BL/6 Empfängerembryos eine bräunliche Fellfarbe (Chinchilla). Nach weiteren sechs bis sieben Wochen sind die Mäuse fortpflanzungsfähig und können auf Keimbahntransmissivität getestet werden.

Fünf unabhängige Neo-deletierte ES-Zellklone des konditionalen *knock-out*-Konstrukts pPNT11, die von der E14 ES-Zelllinie abstammten, wurden in Blastozysten mikroinjiziert. Einer der ES-Zellklone (11.9-2) ergab Chimären mit fast vollständiger Chinchilla Fellfarbe. Für das *lacZ knock-in*-Konstrukt (pPNT8.1) ergaben lange Zeit nur zwei von vier injizierten ES-Zellklonen Tiere mit maximal 50% Chimarismus. Mittlerweile ergab aber kürzlich die Injektion des E14 ES-Zellklons 8.1.6 Chimären mit zum Teil annähernd 100% Anteil des ES-Zellklons.

#### 4.1.4. Etablierung von TR3 *knock-out*-Mäusen

Die Chimären werden bei Erreichen der Geschlechtsreife mit C57BL/6 Tieren gepaart und die Nachkommen auf ihre Fellfarbe kontrolliert (siehe auch 2.3.1). Da das Allel (A) für die Fellfarbe der E14 ES-Zelllinie, die ursprünglich aus dem Mausstamm 129/Ola etabliert wurde [Hooper et al., 1987], dominant gegenüber dem Allel der C57BL/6 (a) ist, sind nur die Nachkommen mit der Chinchilla Fellfarbe

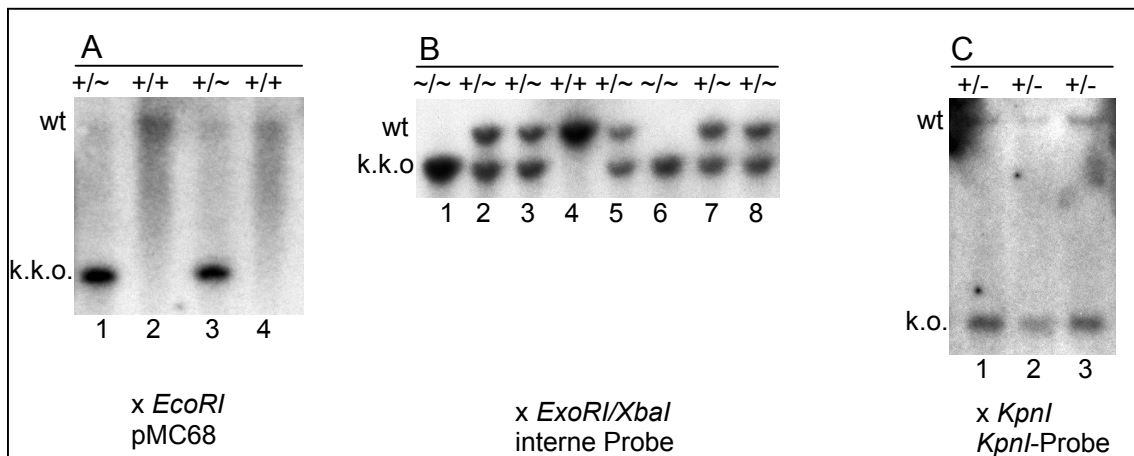
potenzielle heterozygote Mäuse. Die Fellfarbe lässt aber noch keine Aussage darüber zu, ob eine Chimäre während der Rückkreuzung mit C57BL/6 Mäusen das veränderte Allel in der Keimbahn transmittiert bzw. transmittieren kann. Statistisch zu erwarten, tragen 50% der Nachkommen mit Chinchilla Fellfarbe das veränderte und 50% das Wildtyp-Allel aus den ES-Zellen. Es hat sich auch gezeigt, dass weibliche, hochprozentige Chimären zumeist keine Keimbahntransmission erlauben, da die für das *Gene-Targeting* verwendeten ES-Zellen einen männlichen Genotyp besitzen. Damit über weibliche Chimären Keimbahntransmission erreicht wird, muß das Y-Chromosom verloren gegangen und das X-Chromosom verdoppelt worden sein. Eine Keimbahntransmission wird zwar in der Tat manchmal beobachtet, geht aber auf unphysiologische Ereignisse zurück, die meistens zum Verlust der Keimbahn-Fähigkeit führen.

Das Rückkreuzen der pPNT8.1 Chimären ergab bislang nur Nachkommen, die vom C57BL/6 Empfänger-Genotyp abstammen. Erfolgversprechender sind die vom ES-Zellklon 8.1.6 abstammenden, hochprozentigen Chimären, mit deren Rückkreuzung nach Abgabe dieser Arbeit begonnen werden kann.

Hingegen resultierte das Rückkreuzen von drei annähernd hundertprozentigen Chimären des pPNT11 ES-Zellklons 11.9-2 in der Geburt von Nachkommen mit Chinchilla Fellfarbe. Diese wurden mittels PCR und Southern-Blotting genotypisiert. 50% der analysierten Nachkommen waren erwartungsgemäß hemizygot für das konditionale *knock-out*-Allel (Abb. 12). Die Verteilung der Nachkommen aus der Geschwisterverpaarung der hemizygoten, konditionalen Mäuse erfolgte nach Mendelscher-Regel und wurde im Southern-Blot mit einer internen Probe verifiziert.

Um entweder totale oder zeit- und gewebespezifische TR3 *knock-out*-Mäuse generieren zu können, werden homo- oder auch heterozygote konditionale TR3 *knock-out*-Mäuse mit den entsprechenden Cre-exprimierenden Mäusen gekreuzt. Zunächst werden konditionale TR3 *knock-out*-Mäuse mit dem sogenannten Cre-*Deleter* gekreuzt [Schwenk et al., 1995], um das TR3 Gen zunächst in möglichst allen Geweben und in der Keimbahn inaktivieren zu können (Abb. 12 C). Der Cre-*Deleter* exprimiert die Cre-Rekombinase sehr früh und ubiquitär in der Embryonalentwicklung, wodurch sehr effektiv loxP-flankierte Allele in allen Geweben deletiert werden. Da der Cre-*Deleter* ein wt TR3-Allel einführt, müssen aus dieser Verpaarung resultierende, heterozygote TR3 *knock-out*-Tiere in einem zweiten

Schritt untereinander gekreuzt werden, um homozygote TR3 *knock-out*-Mäuse zu erhalten.



**Abb. 12: Genotypisierung von TR3 *knock-out*-Mäusen mittels DNA aus der Schwanzspitze (Southern-Blot).**

(A) Das Rückkreuzen von drei männlichen Chimären, die von dem für TR3 hemizygoten, konditionalen ES-Zellklon 11.9-2 abstammten, resultierte in Keimbahn-Transmission bei 50% der Chinchilla Nachkommen (A1/A3). Exemplarisch ist hier die Genotypisierung von Nachkommen mit Chinchilla Fellfarbe gezeigt. Die etwa 60 kBP große wt-Bande ließ sich aus Schwanz-DNA nicht quantitativ transferieren und erscheint deshalb nur sehr schwach. (B) Die Geschwisterverpaarung von hemizygoten konditionalen Mäusen ergab eine Verteilung gemäß Mendelscher Regel (B1/B6 homozygot; B2/B3/B5/B7/B8 heterozygot; B4 wt). (C) Das Verpaaren von homozygoten, konditionalen TR3 *knock-out*-Mäusen (siehe B) mit heterozygoten *Deleter*-Mäusen führte bei 50% der Nachkommen zu einer Cre-induzierten Deletion der loxP-flankierten Exons. Bei C1-C3 handelt es sich allerdings nur um hemizygoten TR3 *knock-out*-Tiere [+ = wt-Allel; ~ = konditionales *knock-out* Allel; - = *knock-out* Allel].

Aus der Verpaarung mit *Cre-Deleter* Mäusen stammende, heterozygote TR3 *knock-out*-Mäuse (Abb. 12 C) sind lebensfähig und zeigen bislang keinen offensichtlichen Phänotyp. Die ersten Geschwisterverpaarungen von heterozygoten TR3 *knock-out*-Tieren ergaben bisher noch keine lebensfähigen TR3 defiziente Nachkommen, sodass vermutlich von einer embryonalen bzw. perinatalen Letalität ausgegangen werden muss.

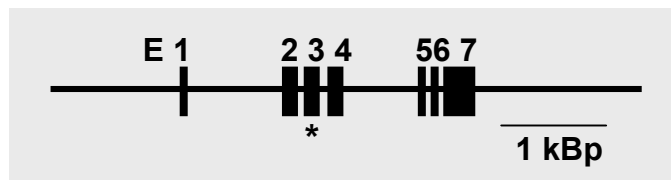
Im Falle einer Letalität des TR3 *knock-out* ist geplant, die konditionalen TR3 *knock-out*-Mäuse mit *Balancer-Cre*-Mäusen zu verpaaren [Betz et al., 1996]. In *Balancer* Mäusen wird Cre nur in einem Teil eines jeden Gewebes exprimiert, was zur Mosaikbildung führt. Aus dem Anteil der Zellen im Gewebeverband mit Deletion kann auf die Rolle des Gens für die Bildung des entsprechenden Organs geschlossen werden. Die Planung von gewebespezifischen TR3 *knock-out*-Tiere ist abhängig von dem bislang unbekanntem Phänotyp der TR3 *knock-out*-Mäuse. Des weiteren ist langfristig geplant, TR3/PHGPx doppel-*knock-out*-Tiere zu etablieren, um so die Rolle von Selenoproteinen bei der Entgiftung von in Mitochondrien gebildeten ROS *in vivo* analysieren zu können.

## 4.2. PHGPx

### 4.2.1. Klonierung des murinen PHGPx-Gens

Ausgangspunkt der Klonierung des murinen PHGPx-Gens waren drei bereits von M. Brielmeier gereinigte 129/SvJ Lambda-Klone, die jeweils den ganzen PHGPx-Lokus und zusätzliche nicht-transkribierte, flankierende Sequenzen enthielten und in pBluescript SK+ umkloniert wurden. Zunächst wurde eine Restriktionskarte für den etwa 18 kBp umfassenden, klonierten Bereich der PHGPx erstellt, und die fehlende Nukleotidsequenz im Exonbereich für das *Gene-Targeting* durch Sequenzieren ermittelt (Daten nicht gezeigt).

Die PHGPx wurde ursprünglich als ein aus sieben Exons bestehendes Gen beschrieben [Borchert et al., 1999]. Auf Exon 1 befinden sich die Start-Kodons sowohl für die cytoplasmatische als auch für die mitochondriale Form der PHGPx. Auf Exon 3 liegt das SeCys-Kodon und auf Exon 7 das für die Inkorporation von SeCys unerlässliche SECIS-Element (Abb. 13).



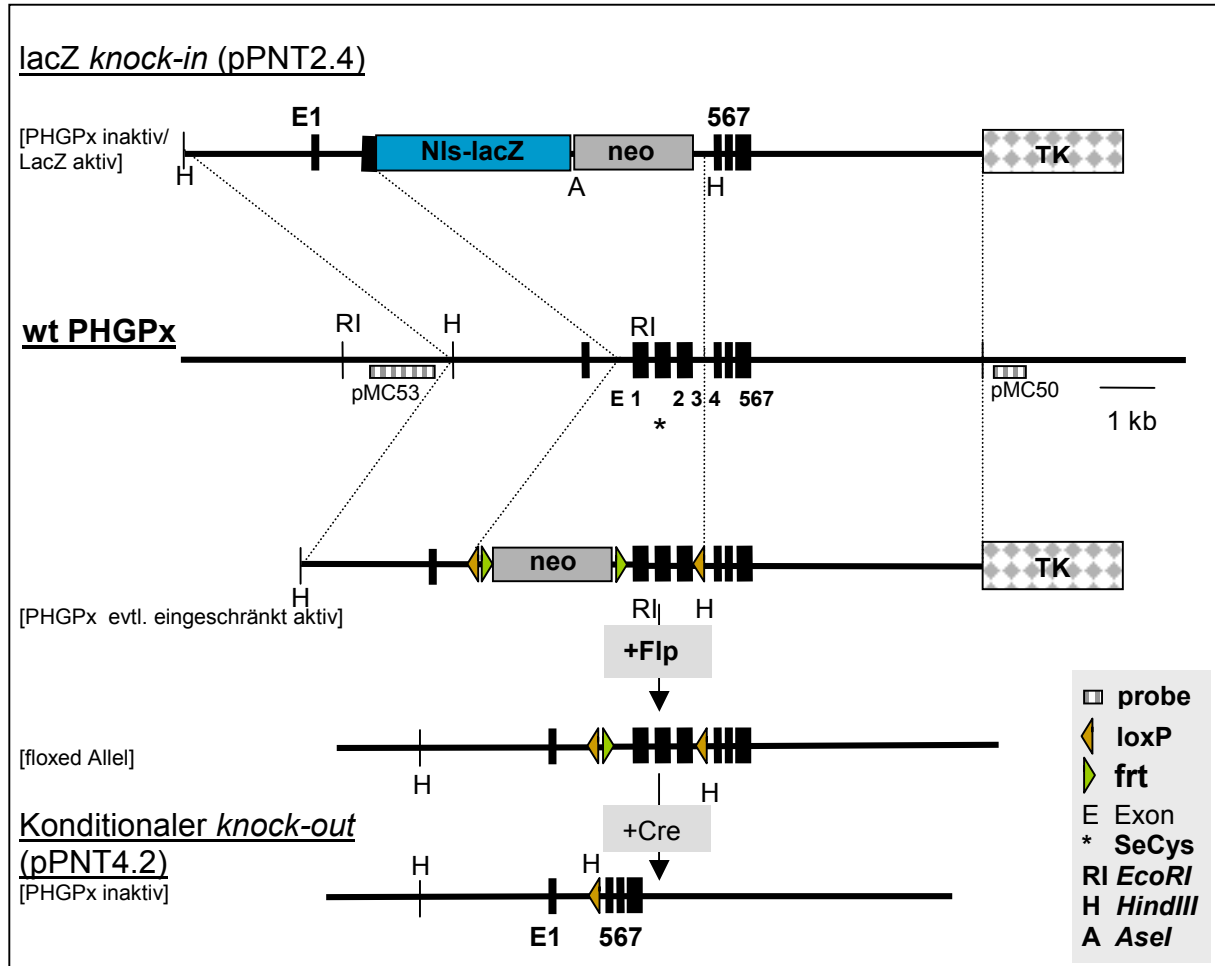
**Abb. 13: Genstruktur der *Mus musculus* PHGPx.** Die PHGPx setzt sich aus 7 Exons zusammen, die auf einen Bereich von etwa 3 kBp verteilt sind. Auf Exon 3 befindet sich das SeCys-Kodon (\*) und auf dem letzten das SECIS-Element.

### 4.2.2. Klonierung der *Gene-Targeting*-Konstrukte (Version 1)

Beim ersten Versuch, die PHGPx gezielt in Mäusen zu inaktivieren, wurden zwei Strategien verfolgt (Abb. 14). Bei der ersten Strategie handelt es sich um einen lacZ *knock-in* (pPNT2.4), bei dem eine Nls-lacZ-Kassette mit dem zweiten Exon im Leseraster fusioniert wurde und dabei der größte Teil des zweiten Exons und die Exons 3 und 4 deletiert wurden. Bei diesem Konstrukt wird die lacZ-Expression vom endogenen Promotor der PHGPx gesteuert. Die N-terminale Fusion soll ermöglichen, die zeitliche und gewebespezifische Expression der PHGPx durch einfache LacZ-



Färbung sichtbar zu machen. Die nukleäre Lokalisation der  $\beta$ -Galactosidase ermöglicht es, die unspezifische, endogene  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität diverser Gewebe von der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität des Konstrukts zu unterscheiden.



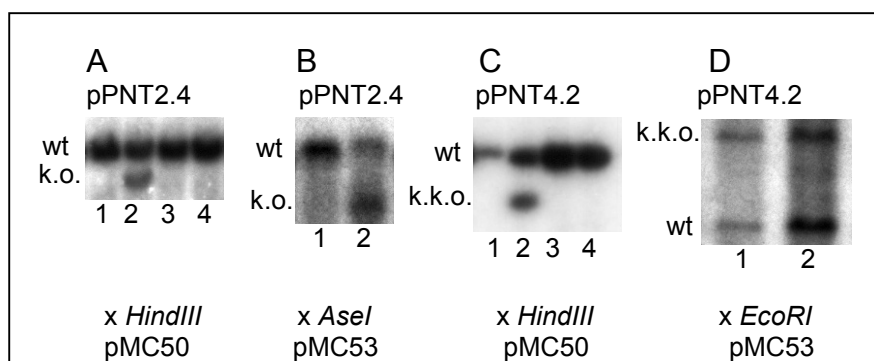
**Abb. 14: PHGPx knock-out-Strategien (Version 1).** Von der Mitte ausgehend (wt PHGPx) ist nach oben die lacZ knock-in-Strategie (pPNT2.4) und nach unten die konditionale knock-out-Strategie (pPNT4.2) dargestellt. Bei der ersten Strategie werden die Exons 2 bis 4 durch eine Nls-lacZ-Kassette ersetzt, die im passenden Leseraster in Exon 2 kloniert wurde. Dadurch besteht die Möglichkeit, die Expression gewebe- und zeitspezifisch verfolgen zu können. Bei dem konditionalen knock-out-Konstrukt sind die Exons 2, 3 und 4 durch loxP-Stellen flankiert, um sie später durch Einkreuzen von Cre-transgenen Tieren deletieren und somit das Gen inaktivieren zu können. Die frt-flankierte Neo-Kassette kann bei Bedarf mittels Flp-Rekombinase *in vitro* oder *in vivo* entfernt werden.

Bei der zweiten *Targeting*-Strategie sollte, wie bereits für die TR3 beschrieben, ein konditionaler knock-out mögliche Komplikationen mit einer potenziellen (embryonalen) Letalität verhindern. Dabei wurde der frt-flankierte Neomycin-Resistenzmarker in das erste Intron kloniert. Unmittelbar 5' vor der Neo-Kassette befinden sich die erste und zwischen Exon 4 und 5 die zweite, für die Cre-Rekombinase-vermittelte Geninaktivierung notwendige loxP-Stellen. Die frt-Stellen erlauben eine durch Flp-

Rekombinase vermittelte spätere Deletion der Neo-Kassette *in vivo* oder *in vitro*. Die hier gewählte Strategie zielte darauf ab, durch Insertion der Neo-Kassette ins erste Intron ein hypomorphes PHGPx-Allel, d. h. ein Allel mit partieller Wildtyp-Funktion, zu generieren. Mit einer gewissen Störung der Funktion der PHGPx durch die Neo-Kassette konnte gerechnet werden, weil die Neo-Kassette eigene Transkriptions- initiations- bzw. Terminationssignale trägt und es auf diese Weise vermutlich zu einer gewissen Interferenz mit der Expression des PHGPx-Gens kommt. Im Falle einer zu starken Interferenz kann die Neo-Kassette mittels *frt*-Stellen durch Flp-Rekombinase *in vivo* oder *in vitro* deletiert werden.

#### 4.2.3. ES-Zellkultur und Blastozysteninjektion

Die *Targeting*-Konstrukte pPNT2.4 und pPNT4.2 wurden durch Elektroporation in die ES-Zelllinie TBV2 eingebracht und Einzelzellklone mit G418 und Gancyclovir selektioniert. Jeweils 600 resistente Einzelzellklone wurden im Southern-Blot mittels der 3'-externen Probe pMC50 auf homologe Rekombination getestet (Abb. 15). Die Frequenz der homologen Rekombination belief sich für beide Konstrukte auf 3% der analysierten Klone. Homologe Rekombination wurde bei expandierten ES-Zellklonen zusätzlich mit einer 5'-externen Probe (pMC53) verifiziert und weitere Integrationsstellen des *Targeting*-Konstrukts in das Genom durch eine Neo-Probe ausgeschlossen. Wie bereits unter 3.1.3 geschildert, wurden die hemizygoten ES-Zellklone in C57BL/6 Blastozysten mikroinjiziert.



**Abb. 15: Gene-Targeting der PHGPx (Version 1).** Exemplarisch sind hier die Southern-Blots von ES-Zellklonen gezeigt, die hemizygot für PHGPx sind. (A) Mit pPNT2.4 transfizierte und homolog rekombinierte TBV2 ES-Zellklone (A2), die zuerst mit der 3'-Probe pMC50 analysiert und zusätzlich (B) mit der 5'-externen Probe pMC53 bestätigt wurden (B2). (C) Dasselbe trifft für Klone mit dem konditionalen *knock-out*-Konstrukt pPNT4.2 zu (C2), bei denen sich allerdings die *knock-out*-Bande aufgrund der Neo-Kassette um 2 kBp vergrößert und hier für 2 Klone zu sehen ist (D) (Abk.: k.k.o. = konditionales *knock-out*-Allel; k.o. = *knock-out*-Allel; wt = Wildtyp-Allel).

#### 4.2.4. Chimärenproduktion und Rückkreuzung

Die aus dem ersten Versuch der Etablierung von PHGPx-defizienten Mäusen hervorgegangenen Chimären sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3: Zusammenfassung der PHGPx-Chimären und Phänotyp der Hoden**

Nr.	Zelllinie	sex	Ch. [%]	fertil-steril	Hodengröße LxB [mm]	reife Sp.	Hodenphänotyp
1	2.4.8	m	10	f			
2	2.4.8	w	10	s			
3	2.4.8	m	20	f			
4	2.4.8	m	20	s	3x2	-	Tumor, „nur SZ“
5	2.4.8	f	15	f			
6	2.4.8	m	20	n.b.			
7	2.4.8	m	20	s			
8	4.2.1	m	30	f			
9	4.2.1	m	90	f			*
10	4.2.1	m	20	f			
11	4.2.1	m	80	f	8x4	+	*
12	4.2.1	m	n.b.	n.b.			*
13	4.2.1	m	70	f	2,5x2	+	massive Atrophie, „nur SZ“, LZH
14	4.2.1	m	80	s	n.b.	-	Ch., wenige normale Ts, ähnl. wie # 12
15	4.2.1	m	90	f			*
16	4.2.1	m	70	f	5x2	-	Mosaik: normale Ts neben „nur SZ“
17	4.2.1	m	80	s	5x4	+	Mosaik: normale neben atrophierten Ts
18	4.2.1	m	80	s			*
19	4.2.1	m	70	f	9x5	+	normal
20	4.2.1	m	80	s	4,5x2,5	-	Atrophie und LZH
21	2.4.1	m	50	f	8x5	-	n.b.
22	2.4.1	w	40	f			
23	2.4.1	m	80	s	n.b. (1 H.)	-	Atrophie ( und „nur SZ“)
24	2.4.1	m	90	f	8x4	+	Mosaik, normale neben gestörter Sp.
25	2.4.1	w	50	f			
26	2.4.1	m	5	s			
27	2.4.1	m	60	f	9x5	+	normal
28	2.4.1	m	10	n.b.			
29	2.4.1	m	5	n.b.			
30	2.4.12	w	30	f			
31	2.4.12	m	40	f			
32	2.4.12	m	15	s			
33	2.4.12	w	60	f			
34	2.4.12	m	70	f			
35	2.4.12	m	10	n.b.			
36	2.4.12	m	60	n.b.			*
37	2.4.12	w	50	f			
38	2.4.12	m	10	n.b.			
39	2.4.12	w	40	s			
40	2.4.12	w	20	f			
41	2.4.12	w	5	f			

Für die Produktion von Chimären wurde die ES-Zelllinie TBV2 benutzt, wobei 2.4 für ES-Zellsubklone des lacZ *knock-in*-Konstrukts und 4.2 für den konditionalen *knock-out* stehen. (Abk.: m = männlich, w = weiblich, f = fertil, s = steril, n.b. = nicht bestimmt, Ch. = Chimärismus; SZ = Sertoli-Zellen, LZH = Leydig-Zell-Hyperplasie; Ts = Tubuli seminiferi; Sp. = Spermatogenese, \* = bereits vor der Chimären-Analyse gestorben).

Von vier injizierten ES-Zellklonen des lacZ *knock-in*-Konstrukts pPNT2.4 ergaben die Subklone 2.4.1 und 2.4.12 Chimären mit einem hohem Anteil der rekombinierten ES-Zellen, gemessen an dem Anteil der Agouti Fellfarbe, die im Gegensatz zur E14 ES-Zelllinie (Chinchilla) charakteristisch für die TBV2 ES-Zelllinie ist. Ebenfalls entstanden aus dem ES-Zellklon 4.2.1. für den konditionalen *knock-out* Chimären, die fast ausschließlich die Fellfarbe Agouti aufwiesen und somit annähernd nur aus den manipulierten ES-Zellen abstammten.

Das Rückkreuzen der daraus erhaltenen Chimären mit C57BL/6 Mäusen resultierte trotz einer Anzahl von 180 Nachkommen über einen Zeitraum von 10 Monaten nicht in Keimbahntransmission der veränderten PHGPx-Allele. Selbst Nachkommen mit einer Agouti Fellfarbe und wt-PHGPx, die man in 50% derjenigen Nachkommen erwarten würde, die sich von den ES-Zellen ableiten, wurden nie geboren (siehe unter 2.3.1).

Um auszuschließen, dass die mikroinjizierten ES-Zellklone aufgrund von chromosomalen Aberrationen nicht zur Keimbahntransmission beitragen können, wurden die ES-Zellen auf Aneuploidien untersucht. Die Anzahl der Metaphase-Chromosomen pro Zellkern ergab keine auffälligen Abweichungen von bereits publizierten Daten [Longo et al., 1997]. Weitere analysierte Parameter (Tabelle 4), wie die Verteilung von männlichen zu weiblichen Chimären, sowie der Anteil von hochprozentigen zu schwachen Chimären, ergaben keinen Aufschluß auf die möglichen Gründe der vergeblichen Versuche, Keimbahntransmission zu erhalten [Fedorov et al., 1997]. Es wurden ebenso keine Chimären mit neonatalen Abnormalitäten geboren, was wiederum ein Indiz für eine schlechte Qualität der verwendeten ES-Zellklone gewesen wäre. Schließlich wurden zur gleichen Zeit und im gleichen Labor mit der gleichen TBV2 ES-Zelllinie mehrere *knock-out*-Mäuse für andere Gene mit Erfolg etabliert (W. Wurst, persönliche Mitteilung), was einen Defekt auf Seiten der ES-Zellen extrem unwahrscheinlich macht.

**Tabelle 4: Zusammenfassung der Chimären mit hohem Grad an Chimärismus.**

ES-Zellklon	N <sub>Chromosomen</sub> <sup>*</sup>	N <sub>Chimären</sub> >50%	männlich/ weiblich	N <sub>Chimären</sub> >50%/<50%	Neonatale Abnormalität
2.4.1	40	5	8/1	5/4	0
2.4.8	40	0	5/2	0/7	0
2.4.12	40	4	5/7	4/8	0
4.2.1	40	10	12/0	10/12	0

(\* bei mehr als 50% der analysierten ES-Zellen)

#### 4.2.5. Chimärenanalyse

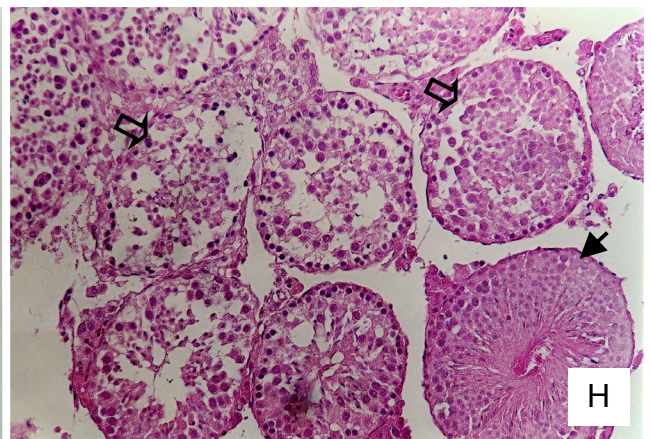
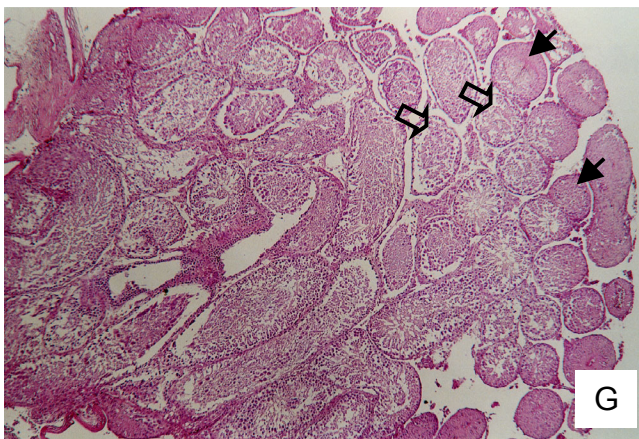
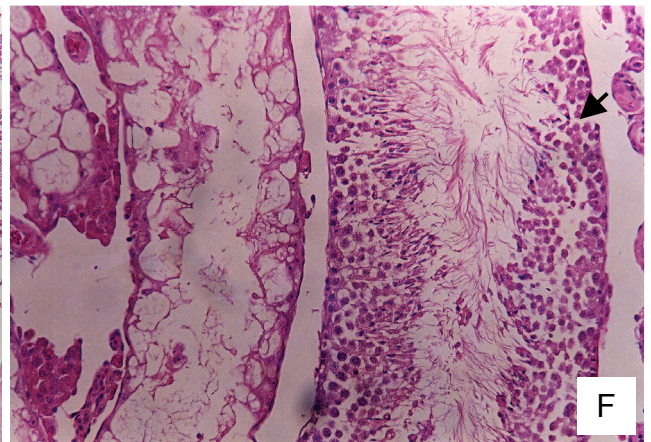
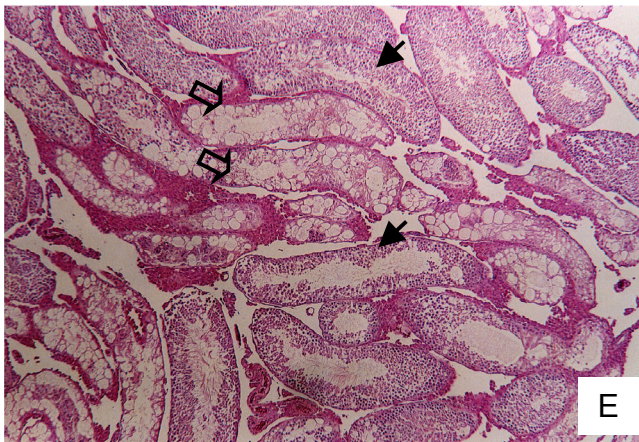
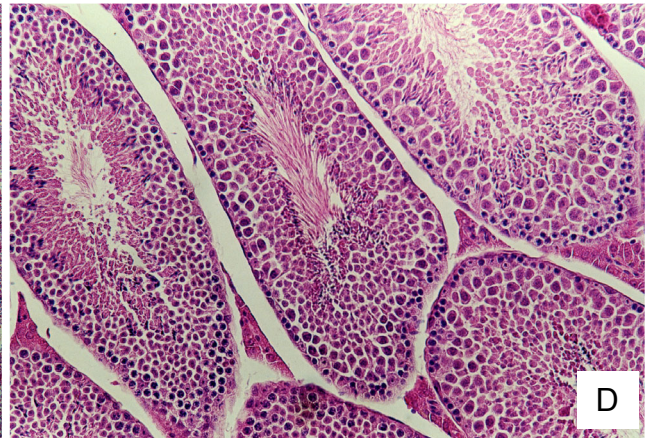
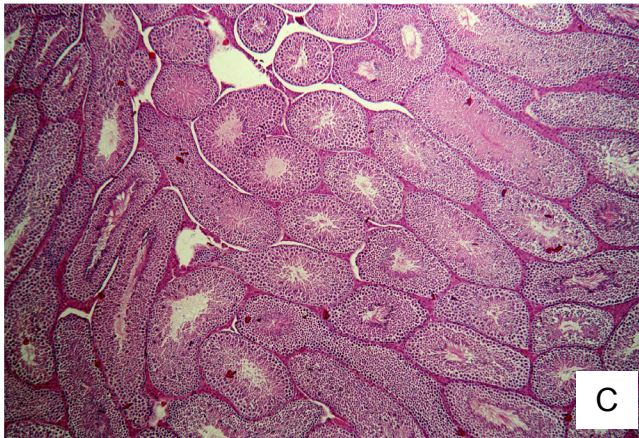
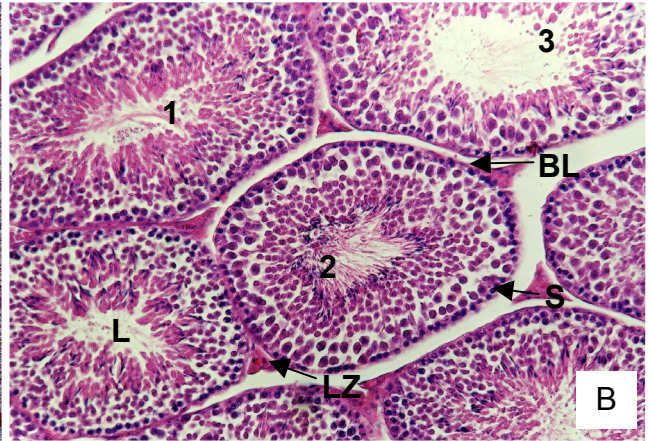
Während die Rückkreuzungen der chimären Tiere mit C57BL/6 Mäusen im Gange waren, wurde von Ursini und Mitarbeitern [1999] eine weitere wichtige Funktion der PHGPx in der Spermienentwicklung beschrieben. Schon vor etwa 20 Jahren konnte bei Selen-depletierten männlichen Nagetieren mit fortschreitender Selen-Defizienz eine Atrophie des Keimepithels im Hoden und Störungen in der Spermatogenese beobachtet werden. Solche Tiere waren ab der dritten Generation infertil und zeigten massive Änderungen in der Spermien-Morphologie [Wallace et al., 1983 a/b]. Die Spermienveränderungen waren vielfältig und reichten von Knicken und Biegungen im Mittelstück, aufgespreizten Mittelstücken, abgebrochenen Schwänzen bis hin zu unvollständig kondensierten Riesenköpfen [Watanabe et al., 1991; siehe auch unter 1.7.]. Ursini und Mitarbeiter identifizierten 1999 das mitochondriale Selenkapsel-Protein als PHGPx, das den Hauptanteil des testikulären Selens enthält [Ursini et al., 1999]. Die PHGPx liegt in der mitochondrialen Kapsel in enzymatisch inaktiver, polymerisierter Form vor und stellt 50% des Gesamtproteins der mitochondrialen Kapsel dar. Die mitochondriale Kapsel der Spermien ist für die Stabilität des Mittelstücks der Spermien mit verantwortlich.

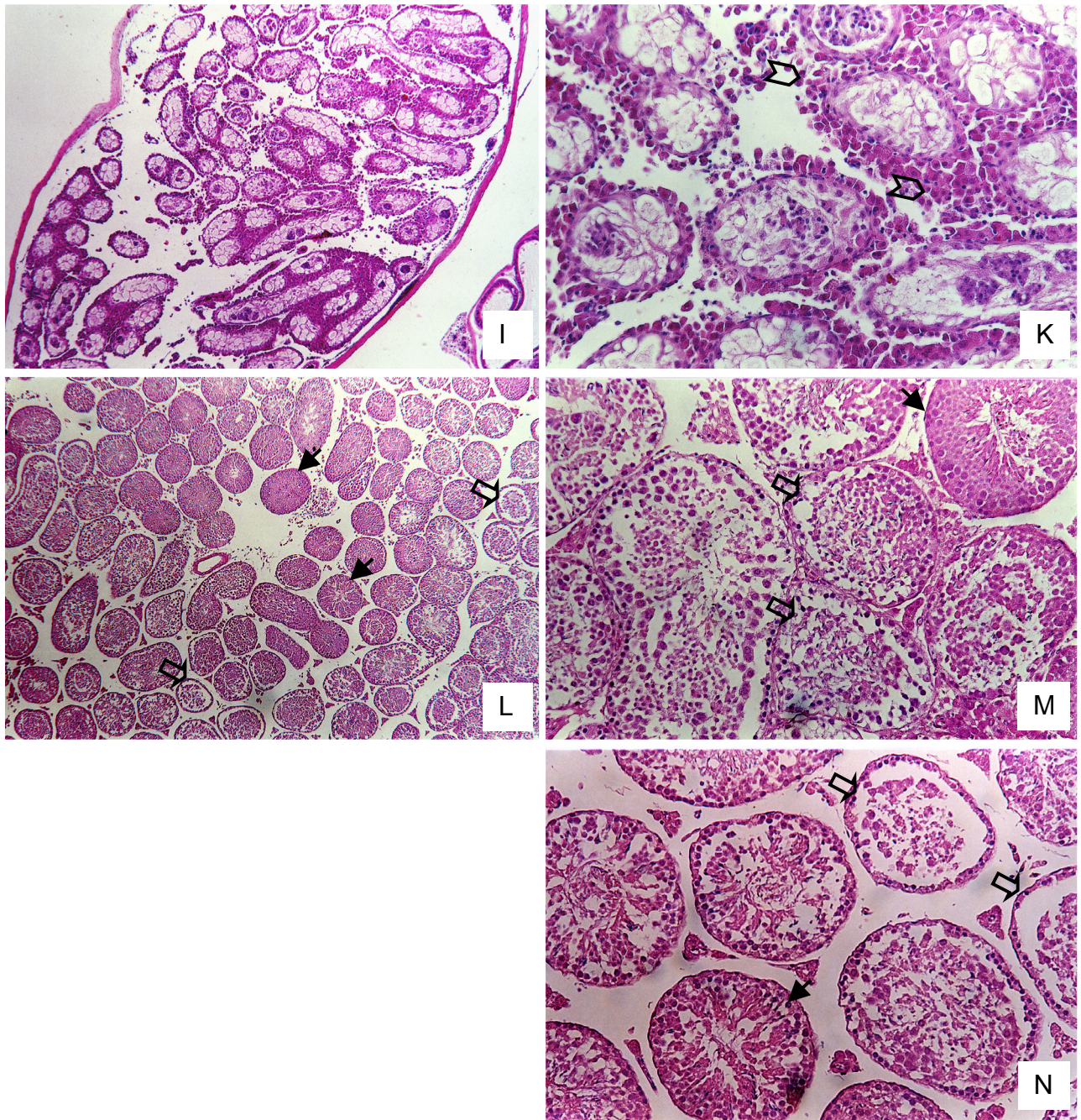
Wenn die bei fortschreitender Selen-Defizienz beobachteten vielfältigen Anomalien bei Spermien auf einem Mangel des im Hoden am stärksten exprimierten Selenoproteins PHGPx beruhen, stellt sich die Frage, ob ein einzelnes PHGPx-Allel ausreicht, um eine voll funktionelle Spermatogenese zu gewährleisten. Ein Funktionsdefekt bei Mutation oder Deletion eines Allels wird Haploinsuffizienz genannt. Damit wird ausgedrückt, dass das zweite wt-Allel den Verlust des ersten funktionellen nicht kompensieren kann. Eine PHGPx-Heterozygotie sollte für den Fall des *lacZ knock-in* (pPNT2.4) gegeben sein. Aber wie sollte in den haploiden Spermien, die entweder nur ein wt-Allel oder ein mutiertes Allel besitzen, eine Hemizygotie zum Tragen kommen? Sollten nicht haploide Spermien mit wt-PHGPx-Allel ausreichend PHGPx exprimieren, um eine normale Spermienmorphologie und –funktion auszubilden? Die Erklärung für diesen scheinbaren Widerspruch ist darin zu sehen, dass Spermien genotypisch haploid, phänotypisch jedoch diploid sind. Da die Spermatogenese ein syncytiales Ereignis ist, profitieren die sich entwickelnden, haploiden Spermien aufgrund einer unvollständigen Cytokinese von einem diploiden Genom [Braun et al., 1989]. Das bedeutet, dass Spermatogonien, die von PHGPx

hemizygoten ES-Zellklonen abstammen, nur die halbe Menge PHGPx exprimieren, verglichen mit wt-Spermatogonien. Sollte diese Haploinsuffizienz ein Nachteil für reifende Spermien sein, so müßte man damit rechnen, dass ein *knock-out* des PHGPx-Gens zur Infertilität führt und nicht in die Keimbahn eingebracht werden kann. Der unter dem Aspekt der möglichen (embryonalen) Letalität geplante und begonnene konditionale *knock-out* (pPNT4.2) bekam durch diese Überlegungen ein neues Gewicht. Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, zeigten die Chimären, die das konditionale Konstrukt tragen, ebenfalls keine Keimbahntransmission. Alle Nachkommen der Chimären-Mäuse aus beiden Versuchen hatten ausnahmslos eine schwarze Fellfarbe und stammten also von Spermien ab, die von C57BL/6-Spermatogonien gebildet wurden.

Gleichzeitig mit der Analyse mit der Fertilität bzw. Infertilität der PHGPx-Chimären entwickelte sich über den DFG-Schwerpunkt „Selenoproteine“ eine Zusammenarbeit mit H. Pfeifer und D. Behne (HMI Berlin), die aus Spermienkernen der Ratte ein neues unbekanntes Selenoprotein mit einem Molekulargewicht von 34 kD gereinigt und den N-Terminus ansequenziert hatten. Wie in 3.2.6 dieser Arbeit beschrieben, konnten wir zeigen, dass es sich dabei um eine neue Form der PHGPx mit einem alternativen ersten Exon handelt. Dieses alternative Exon ist genau an der Stelle im ersten Intron des PHGPx-Gens lokalisiert, an der im konditionalen *knock-out* die Neo-Kassette inseriert worden war. Somit handelt es sich bei dem vermeintlichen konditionalen *knock-out* in Wirklichkeit um einen unfreiwilligen direkten *knock-out* der alternativen, im Kern lokalisierten Form der PHGPx.

Sowohl von diesen Erkenntnissen als auch von der Tatsache geleitet, trotz vielversprechender Chimären keine Keimbahntransmission erhalten zu haben, fiel die Entscheidung, keine weiteren Kreuzungen durchzuführen und die Hoden und Spermien von den Chimären mit hohem Grad an Chimärismus histologisch und die Spermien morphologisch zu analysieren (Tabelle 3). Die Analyse der Chimären erfolgte sowohl anhand HE-gefärbter, histologischer Präparate als auch mit Rasterelektronen-Mikroskopie-Aufnahmen (REM) von Hoden und isolierten Spermien aus dem Nebenhoden. Als Kontrolltiere dienten vier 129/SvP, zwei C57BL/6, sowie 15 weitere Mäuse gleichen Alters, von denen drei TR3-Chimären waren und 12 aus dem *ENU-screen* (*ENU* = *Ethyl-Nitroso-Urea*, M. Hrabé de Angelis) stammten.





**Abb. 16: Hoden-Histologie von PHGPx-Chimären und je eines 129/SvP – bzw. C57BL/6-Kontrolltiers.** In der linken Spalte ist jeweils ein Überblick des Hodenquerschnitts und auf der rechten Seite ein vergrößerter Ausschnitt davon mit wenigen Hodenkanälchen gezeigt. Die Bilder entsprechen folgenden Tieren: (A)/(B)  $\cong$  129/SvP-Kontrolltier; (C)/(D)  $\cong$  C57BL/6-Kontrolltier; (E)/(F)  $\cong$  Chimäre # 16 [4.2.1]; (G)/(H)  $\cong$  Chimäre # 17 [4.2.1]; (I)/(K)  $\cong$  Chimäre # 20 [4.2.1]; (L)/(M)/(N)  $\cong$  Chimäre # 24 [2.4.1] (Abk.: BL = Basallamina; L = Lumen; LZ = Leydig-Zellen; S = Spermatogonium).



Ein stark vereinfachtes Schema der Spermienentwicklung (Abb. 5) und der Morphologie von reifen Spermien ist Abb. 6 zu entnehmen.

Das Ergebnis der Histologie von Hodenquerschnitten ist in Abb.16 exemplarisch dargestellt. Bei (A) und (B) handelt es sich um den Querschnitt durch den Hoden eines 129/SvP- und bei (C) und (D) um den eines C57BL/6-Kontrolltiers. Dargestellt sind die dicht nebeneinander liegenden Tubuli seminiferi. Sichtbar sind verschiedene Stadien der Spermatogenese in den einzelnen Tubuli (B;1, 2, 3). Die Spermatogenese verläuft bei Mäusen entlang der Längsachse von Hodenkanälchen wellenartig koordiniert, in einem Hoden-Querschnitt sind daher immer unterschiedliche Reifungsstadien der einzelnen Kanälchen zu erkennen.

Die gut geordnete Organisation des Keimepithels mit den der Basallamina aufliegenden Spermatogonien und sich zum Lumen hin entwickelnden Spermatozyten sind in den Vergrößerungen gut zu erkennen (B) und (D). Die ins Lumen ragenden Spermischwänze und die stark durch HE-gefärbten Spermienkerne sind ebenfalls deutlich sichtbar.

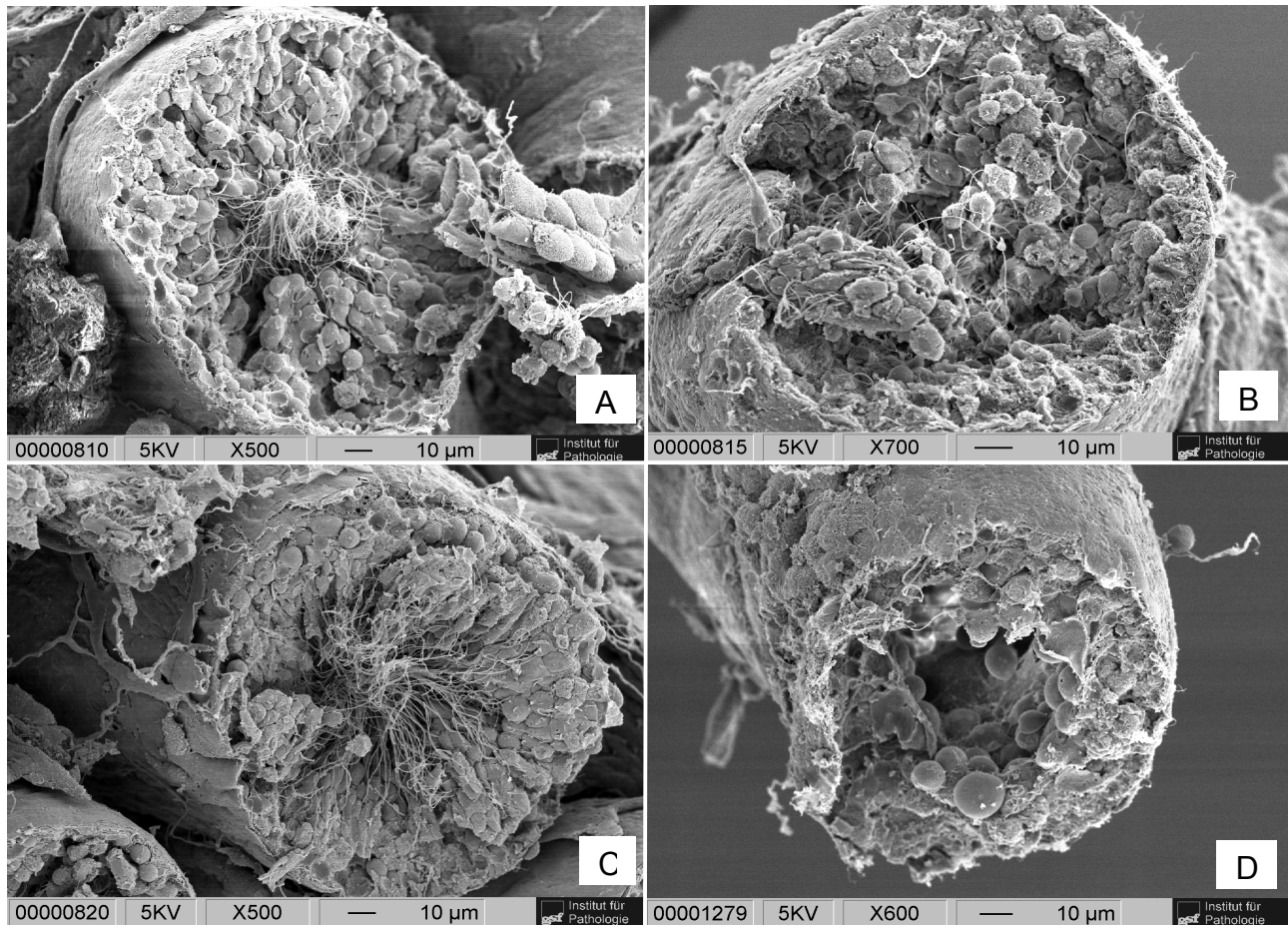
Hingegen zeigen hochprozentige Chimären (E, F, G, H, L, M, N) mit Ausnahme von (I) und (K) ein Mosaik von testikulärer Atrophie. Morphologisch intakte Tubuli (geschlossene Pfeile) sind dabei neben Tubuli zu finden, die in ihrer Organisation massiv gestört sind (offene Pfeile). Die im Vergleich zur Kontrolle großen interstitiellen Räume sind vermutlich Fixaktionsartefakte. Bei stärkerer Vergrößerung (F, H, M, N) wird die Desorganisation des Keimepithels noch deutlicher. Dabei können, wenn überhaupt, nur noch vereinzelt Spermien ausfindig gemacht werden.

Bei Präparaten von sterilen Chimären besteht der Hoden durchgehend aus derartig veränderten Tubuli (I, K), wobei nur noch Sertoli-Zellen und einzelne Spermatogonien die Tubuli seminiferi auskleiden. Die Hyperplasie von Leydig-Zellen ist in (K) mit offenen Pfeilen markiert.

Bis auf eine Ausnahme, wo man zu einem kleinen Anteil neoplastische Veränderungen beobachten konnte, wurden in den restlichen 20 Kontrolltieren, keine morphologischen Abnormalitäten in der Spermatogenese festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Die für 19 Kontrolltiere ermittelten Mittelwerte für Hodenlänge bzw. Hodendurchmesser betragen 8,4 bzw. 5,6 mm. Diese Werte weichen teilweise stark von Chimärentieren ab, bei denen eine Atrophie des Keimepithels offensichtlich ist (siehe Tabelle 3).

Testis und isolierte Spermien wurden zusätzlich noch einer Rasterelektronen-Mikroskopie (REM)-Analyse unterzogen, um detailliertere Informationen über ihre Morphologie zu erhalten (Abb. 17 und 18).

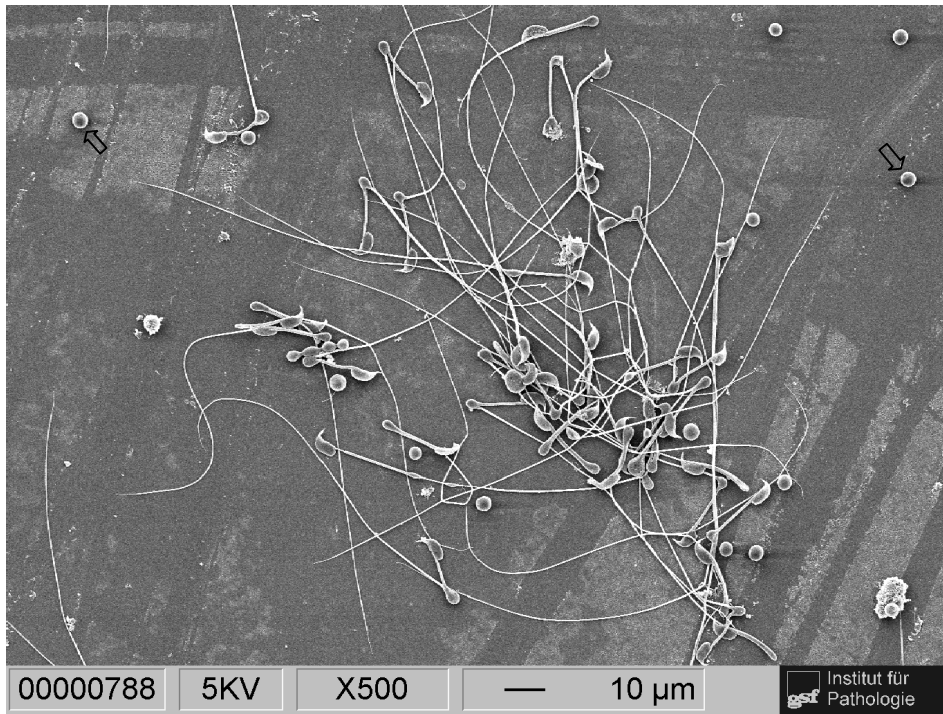


**Abb.17: REM-Bilder von Tubuli seminiferi eines PHGPx-Chimären und eines 129/SvP-Kontrolltiers.** In (A) und (C) ist jeweils ein Hodenkanälchen eines 129/SvP-Kontrolltiers und in (B) und (D) die eines PHGPx-Chimären exemplarisch gezeigt.

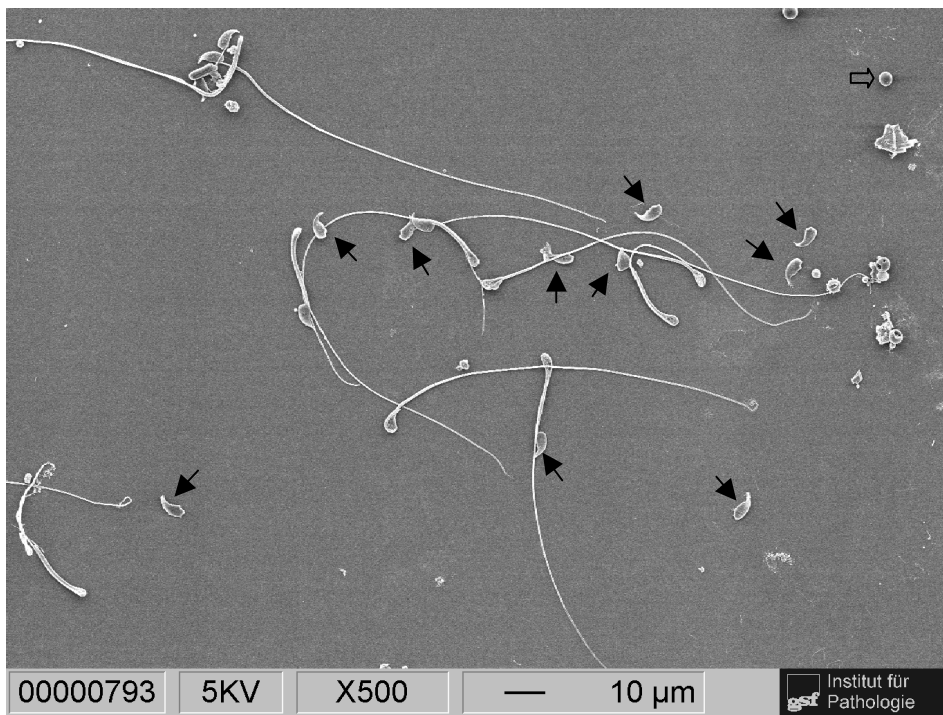
Abbildung 17 (A) und (C) zeigt die geordnete, dreidimensionale Struktur jeweils eines Tubulus seminiferus mit denen in das Lumen ragenden, gut erkennbaren Spermenschwänzen. Vergleichsweise dazu sind in (B) und (D) zwei Hodenkanälchen eines PHGPx-Chimären (siehe Tabelle 3, #24) exemplarisch gezeigt, die den bereits in der Paraffin-Histologie (Abb. 16) demonstrierten Phänotyp der Desorganisation des Keimepithels bestätigen.

Die REM-Analyse von isolierten Spermatozoen ergab ebenfalls ein zunächst überraschendes Bild, das mit dem Wissensstand zu Beginn des Projekts nicht zu erwarten war (Abb. 18 und 19).

## 129/SvP-Kontrolltier



## PHGPx-Chimäre



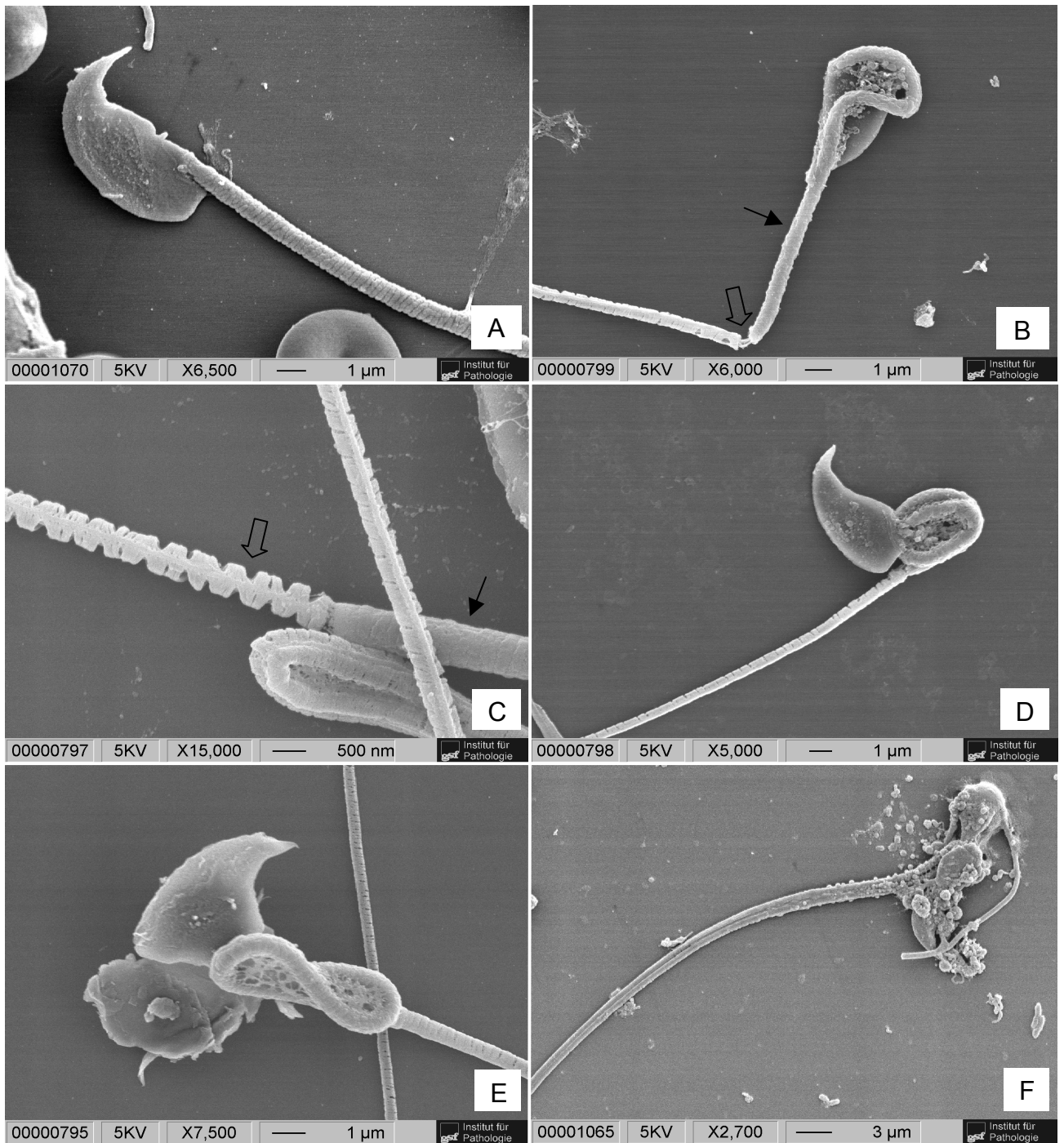
**Abb. 18: REM-Übersicht von isolierten Spermatozoen.** Oben sind normale Spermien eines 129/SvP-Kontrolltiers gezeigt. Im unteren Bild findet man zahlreiche schwanzlose Spermien, die ausschließlich bei PHGPx-Chimären auftreten (geschlossene Pfeile). Bei den kugelförmigen Zellen, die in beiden Präparationen gefunden werden, handelt es sich vermutlich um kontaminierende Leukozyten (offene Pfeile).

Abbildung 18 zeigt eine Übersicht von isolierten Spermien von einer Chimäre und einem 129/SvP-Kontrolltier. Bei den Chimären findet man zahlreiche schwanzlose Spermienköpfe, die bei den Kontrolltieren nie beobachtet werden. Abgebrochene Spermenschwänze werden neben anderen morphologischen Veränderungen häufig bei Selen-depletierten Mäusen beobachtet [Watanabe et al., 1983a/b].

Weitere häufig beobachtete morphologische Abnormalitäten bei Spermien der analysierten PHGPx-Chimären sind in Abb. 19 dargestellt. Hervorzuheben ist das Mittelstück mit seinen um das Axonem gewickelten Mitochondrien. Die für die Stabilität des Mittelstücks verantwortliche mitochondriale Kapsel besteht zu 50% aus enzymatisch inaktiven, über Disulfidbrücken verbundenen PHGPx-Molekülen [Ursini et al., 1999]. Deshalb sind bei einem Verlust oder bei einer Limitierung von PHGPx-Molekülen in diesen Strukturen die größten Effekte zu erwarten. In Abb. 19 A handelt es sich um ein wt-Spermium mit dem für Mäuse charakteristischen hakenförmigen Kopf und einer intakten um das Axonem gewickelten mitochondrialen Spirale. In (B) kann man Läsionen der mitochondrialen Scheide (Pfeil) erkennen, was zu einem Abknicken des Spermenschwanzes führt. In (C) sind die Effekte noch ausgeprägter, hier befinden sich auf dem gleichen Mittelstück unauffällige, intakte Mitochondrien (geschlossener Pfeil) neben einer Art „entwundenen“, mitochondrialen Scheide (offener Pfeil). In (E) und (F) sind Kopfabnormalitäten und Biegungen im Bereich des Mittelstücks gezeigt.

Solche Anomalien werden ebenfalls häufig bei Selen-depletierten Mäusen ab der zweiten Generation vorgefunden. Auch bei Kontrolltieren findet man strukturell anomalen Spermien, jedoch mit einer sehr viel geringeren Frequenz als bei den PHGPx-Chimären.

Aus den REM-Daten lassen sich keine statistisch signifikanten Aussagen machen. Um herauszufinden, inwiefern die mit diesen Chimären ermittelten, phänotypischen Aberrationen bei Hoden und Spermien mit dem Genotyp, also dem Fehlen eines funktionellen Allels der PHGPx, korreliert, wurden folgende Versuche unternommen. Die naheliegendste Strategie, die Korrelation von Phänotyp und dem ihm zugrundeliegenden Genotyp zu bestätigen, war, die Expression des PHGPx- $\beta$ -Galactosidase Fusionsproteins durch X-gal-Färbung zu studieren. Weder in ES-Zellkultur noch in Testis-Gewebe konnte eine LacZ-Färbung nachgewiesen werden.



**Abb. 19: REM-Bilder isolierter Spermatozoen von PHGPx-Chimären.** Zwei Charakteristika von Mäuse-Spermatozoen sind der hakenförmige Kopf und ein sehr langes Mittelstück, um welches die Mitochondrien spiralenförmig gewunden sind (A) (geschlossene Pfeile). Auffällig sind bei diesen Proben vor allem Abnormalitäten im Mittelstück (B-D) (offene Pfeile), in dem die PHGPx einen wichtigen strukturellen Bestandteil der mitochondrialen Kapsel darstellt. Weitere häufig gefundene Kopfabnormalitäten sind in (E) und (F) dargestellt.

Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungs-Experimente (FISH) in Kooperation mit I. Jentsch (AG Speicher, LMU) mit der 5,3 kBp großen lacZ-neo Hybridisierungsprobe beim lacZ *knock-in*-Konstrukt gelangen bisher nur an Metaphase-Chromosomen-Präparaten von ES-Zellen des 2.4.1 Subklons (Daten nicht gezeigt). Bei Paraffin-eingebetteten Hodengewebeschnitten von chimären Tieren des PHGPx lacZ *knock-in*-Konstrukts wurden eventuelle FISH-Signale durch eine zu hohe Autofluoreszenz der fixierten Präparate überdeckt (I. Jentsch, persönliche Mitteilung).

Aufschluß über die Zuordnung des Genotyps zum Phänotyp könnte der genotypische Nachweis von mikrodisssezierten Tubuli seminiferi mittels PCR und neo- bzw. lacZ-spezifischen Primern geben. Die Experimente dazu werden zur Zeit durchgeführt.

#### **4.2.6. Klonierung einer Spermienkern-spezifischen Form der PHGPx**

H. Pfeifer und D. Behne (HMI Berlin) beschäftigen sich seit mehreren Jahren mit einem Spermienkern-spezifischen Selenoprotein der Ratte. Ihre Ergebnisse sind im Folgenden kurz zusammengefaßt. Durch [ $Se^{75}$ ]-Markierungen konnten sie zeigen, dass dieses 34 kD-Selenoprotein nur während der Spermiogenese, also in den letzten Stadien der Spermienreifung, exprimiert und während der Passage der Spermien durch den Nebenhoden zum Teil posttranslational in kürzere Formen prozessiert wird. Aufgrund der Tatsache, dass die DNA in Spermienkernen sehr stark kondensiert ist, sind diese außerordentlich resistent gegenüber mechanischen und chemischen Einflüssen. Aufgrund dieser Eigenschaft können Spermienkerne durch einfache Ultraschall-Behandlung von anderen Zellen, die einer Ultraschall-Behandlung nicht standhalten, separiert werden. In isolierten Kernen war dieses 34 kD-Protein das einzig verbleibende Selenoprotein. Nach tryptischem Verdau dieses Proteins zeigten MALDI-TOF Analysen der Peptidfragmente gewisse Homologien mit der bereits bekannten PHGPx Proteinsequenz. Dies konnte mit PHGPx-Antikörpern, die mit dem 34 kD-Protein kreuzreagierten, bestätigt werden. Das 34 kD-Selenoprotein zeigte außerdem PHGPx-Enzymaktivität gegenüber Phospholipid-Hydroperoxiden. Das Molekulargewicht von 34 kD unterschied sich jedoch von den apparenten Größen für die mitochondriale und cytoplasmatische Form der PHGPx von 23 bzw. 20 kD. N-terminale Mikrosequenzierung ergab für dieses 34 kD-Protein aus Ratte die Aminosäuresequenz SRAAARKRGR??QQ, die keine Homologie zu bekannten Proteinsequenzen in Datenbanken zeigte.

Beim Vergleich des Peptidfragments mit allen bis dato verfügbaren DNA-Sequenzen der Maus, die zuvor in alle 6 theoretisch möglichen Leseraster translatiert wurden, konnte eine für RAAARKRGR kodierende Sequenz im Mausgenom gefunden werden (G. Laux, GSF München). Diese Sequenz befindet sich im Intron 1 des Maus-PHGPx-Gens am Beginn eines möglichen offenen Leserasters. Genomische Sequenzen der Ratte waren in viel geringerer Menge verfügbar und erlaubten keine systematische Suche. Der Vergleich der verfügbaren genomischen Sequenzen zeigte eine Konservierung dieses möglichen offenen Leserasters in Maus, Schwein und Mensch. Durch alternatives Spleißen würde dieses alternative Exon zusammen mit den Exons 2 bis 7 der Maus-PHGPx ein 34 kD-Protein mit PHGPx-Aktivität ergeben.

Um die Existenz dieser möglichen alternativen Form der PHGPx zu bestätigen, wurden in dieser Arbeit RACE-Experimente durchgeführt. Dazu wurde mRNA aus Hoden von C57BL/6 Mäusen isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit Adaptoren versehen, die Primer-Bindestellen für eine spätere Amplifikation besitzen. Durch genspezifische Primer, die im Bereich dieses möglichen offenen Leserasters liegen, konnte ein 3'-RACE Produkt amplifiziert und sequenziert werden, welches neben den Exon-Sequenzen von 2 bis 7 den vollständigen offenen Leseraster dieses alternativen Exons besitzt (Abb. 20).

```

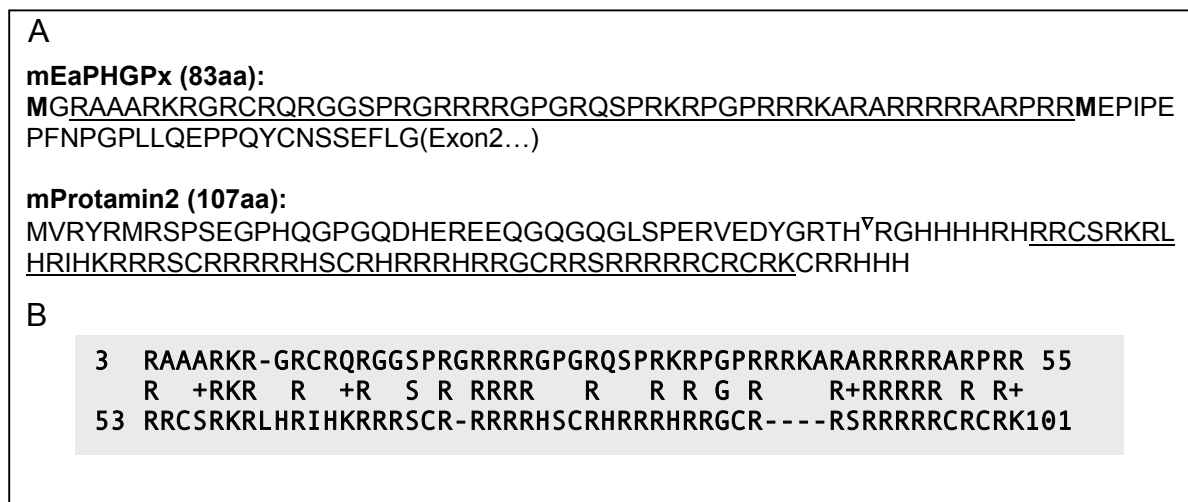
      atgg gccgcgcggc cgcccgcaag cggggacgct gcagacagcg cggcggatcc
ccgagagggc ggcgacgccg tggacctgga cgccaaagtc ctaggaaacg cccggggccct
cgcgcaagga aagcgcgcgc gcgcccggcg aggagggcgc gccctcggcg gatggagccc
atcctgaac ctttcaacc ggggcctctg ctgcaagagc ctccccagta ctgcaacagc
tccgagttcc tgggcttqtg tgcacccgc gatgattggc gctgtgcgcg ctccatgcac
gaattctcag ccaaggacat cgacgggcac atggctctgcc tggataagta caggggtttc
gtgtgcatcg tcaccaacgt ggcctcgcaa tgaggcaaaa ctgacgtaaa ctacactcag
ctagtcgatc tgcatgcccg atatgctgag tgtggtttac gaatcctggc ctccccctgc
aaccagtttg ggaggcagga gccaggaagt aatcaagaaa tcaaggagtt tgcagcggcg
tacaacgtca agtttgacat gtacagcaag atctgtgtaa atggggacga tgcccaccca
ctgtggaaat ggatgaaagt ccagcccaag ggcaggggca tgctgggaaa tgccatcaaa
tggaacttta ccaagtttct cattgataag aacggctgcg aggtgaagcg ctatgggtccc
atggaggagc cccaggtgat agagagggac ctgccgtgct atctctagct agccctacaa
gtgtgtgccc ctacaccgag cccccctgcc ctgtgacccc tggagccttc caccocggca
ctcatgaagg tctgcttgaa aaccagcctg ctggtggggc agtcctgagg acctggcgtg
catccctgcc ggaggaaggt ccagaggcct gtggccctgg gctcgagctt caccctggct
gccttggtgg aataaaatgt agaaatgtga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa

```

**Abb. 20: Nukleotidsequenz der Spermienkern-spezifischen Form der PHGPx.** Die Sequenz des alternativen Exons ist unterstrichen. Daran anschließend folgen die transkribierten Bereiche der Exone 2 bis 7.

Der 5' nicht-translatierte Bereich dieser cDNA konnte bisher mittels 5'-RACE noch nicht eindeutig festgelegt werden. Die N-terminale Peptidsequenz und die ermittelte Nukleotidsequenz beweisen, dass es sich bei diesem offenen Leseraster um ein alternatives Exon handeln muss.

Die translatierte Sequenz des alternativen Exons der Maus ist in Abb. 21 dargestellt. Auffällig sind die Arginin-reichen Cluster, die ebenfalls bei Protamin 2 der Maus gefunden werden und eine gewisse Homologie zeigen.



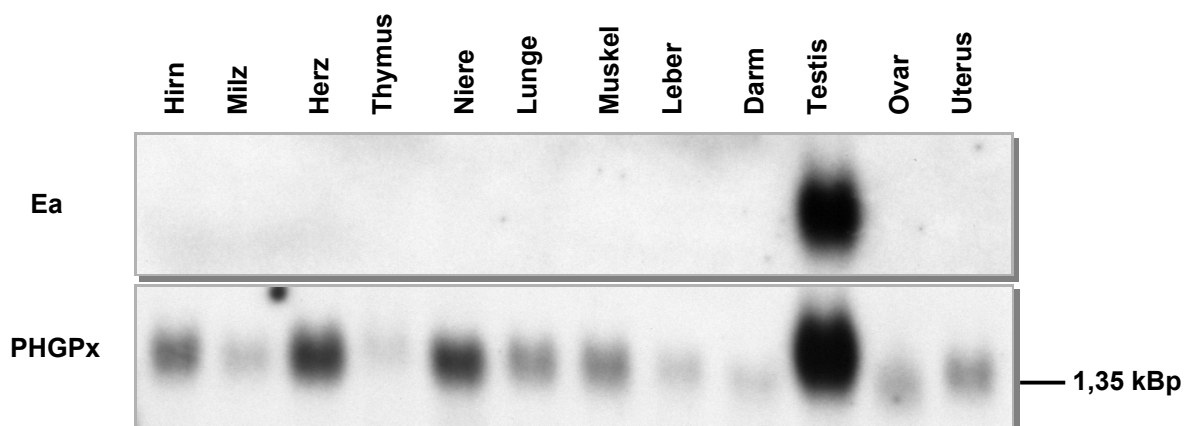
**Abb. 21: Partieller Aminosäuresequenzvergleich des alternativen Exons der Maus-PHGPx mit Maus-Protamin 2 [BLAST2].** In (A) ist oben die Proteinsequenz des alternativen Exons der PHGPx und unten die des Maus-Protamins 2 dargestellt. Protamin 2 wird als Vorläufer-Protein synthetisiert und nach DNA-Assoziation in mehreren Stufen bis Aminosäureposition 43 N-terminal proteolytisch prozessiert (<sup>Y</sup>). Die beiden potenziellen Translationsstarts auf dem Ea der PHGPx sind durch fette Buchstaben markiert. Der N-terminale Teil des alternativen Exons der PHGPx, welcher mit dem C-terminalen Teil von Maus-Protamin verglichen wurde, ist jeweils unterstrichen. Beide Sequenzen sind zu 46% identisch und zu 53% homolog (B). Ein Teil der Sequenz des alternativen Exons der PHGPx ist oben und unten die von Maus-Protamin 2 dargestellt.

Protamine sind kleine, basische, Cystein-reiche Moleküle, die während der Spermio-genese die Histone ersetzen und an der dichten Packung des haploiden, männlichen Genoms beteiligt sind [Balhorn, 1990]. Die Protamine binden mit den vielen basischen Aminosäuren an das negativ geladene Rückgrat der DNA. Zusätzlich werden die Protamine im Laufe der Spermienreifung durch intra- und intermolekulare Disulfidbrücken untereinander verbunden, was zu einer starken Kondensation des Chromatins führt. Es liegt nahe anzunehmen, dass diese neue Variante der PHGPx über den gleichen Mechanismus an DNA bindet. Dort übt die PHGPx die Funktion aus, die man ihr aufgrund von biochemischen Untersuchungen bereits zugesprochen



hatte, nämlich Disulfidbrücken in Protamine einzuführen und diese intra- und intermolekular zu vernetzen [Ursini et al., 1997].

Die Gewebeexpression des alternativen Exons in der Maus ist in Abb. 22 gezeigt. Die bereits durch die [ $^{75}\text{Se}$ ]-Markierung vermutete Gewebe-/Zellspezifität dieses 34 kD-Selenoproteins für Spermatozoen konnte in einem Gewebe-Northern-Blot bestätigt werden [H. Pfeifer et al., 2001], indem Gesamt-RNA mit dem kodierenden Bereich des alternativen Exons hybridisiert wurde (Abb. 22). Wird die „klassische“ Form der PHGPx als Sonde eingesetzt, erhält man eine ubiquitäre Verteilung der PHGPx-Expression mit einer starken Präferenz in Testis-Gewebe.

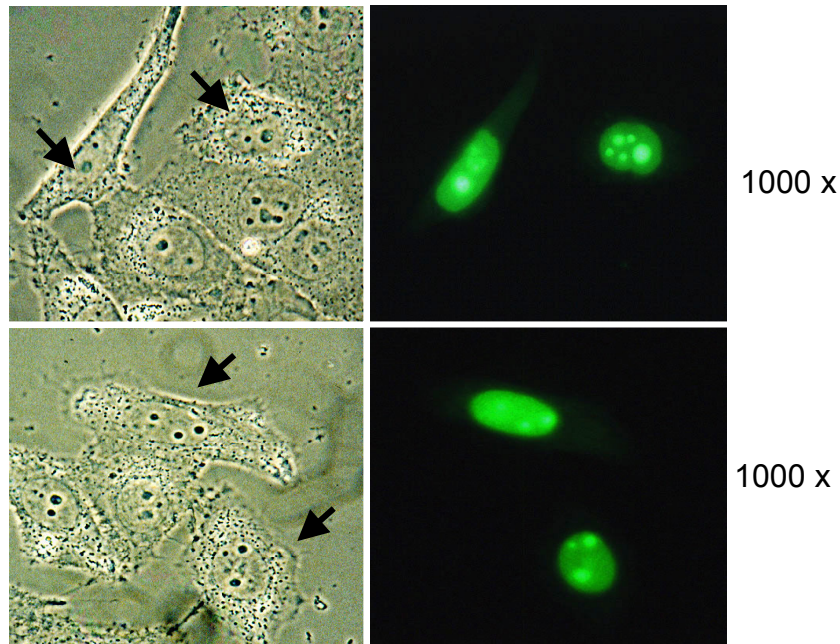


**Abb. 22: Gewebeexpression der alternativen Form der PHGPx.** Jeweils 20  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA pro Maus-Gewebe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit dem kodierenden Bereich des alternativen Exons (Ea) oder der „klassischen“ PHGPx hybridisiert.

Weiterhin stellte sich die Frage, ob das alternative Exon für die Kernlokalisierung dieser neuen Variante der PHGPx verantwortlich ist. Bisher kannte man nur eine cytoplasmatische und eine mitochondriale Form der PHGPx, deren Translation von zwei auf dem ersten Exon befindlichen alternativen Start-Kodons initiiert wird [Arai et al., 1996]. Die mitochondriale Form besitzt zusätzlich eine *Leader*-Sequenz, wodurch sich die unterschiedlichen Größen von 23 bzw. 20 kD der PHGPx erklären.

Um zu prüfen, ob die PHGPx durch ein mögliches, vom alternativen Exon kodiertes, nukleäres Lokalisationssignal in den Kern transloziert werden kann, wurden zwei N-terminale GFP-Fusionsproteine durch überlappende PCR generiert, in pcDNA3.1 unter die Kontrolle des starken CMV-Promotors kloniert und transient in die humane Zelllinie HeLaS3- bzw. in die murine Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3 transfiziert (Abb. 23). Das erste Fusionsprotein besteht aus dem vollständigen kodierenden Bereich des alternativen Exons, wohingegen das trunkeierte GFP-Fusionsprotein mit dem zweiten potenziellen Translationsstart-Kodon des alternativen Exons beginnt (Abb.

21 b). Aufgrund der Struktur ergab sich die Vermutung, dass der N-terminale Teil des alternativen Exons für eine Protamin-ähnliche Domäne und der C-terminale Teil für ein Nls kodieren könnte. Nur die Transfektion des für das komplette alternative Exon Fusionsprotein kodierenden Fusionsgens führte jedoch zu einer nukleären Lokalisation. Die trunkierte Form war dagegen ausschließlich im Cytoplasma zu finden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 23: Nukleäre Lokalisation der alternativen Form der PHGPx.** Der kodierende Bereich des alternativen Exons der mPHGPx wurde N-terminal an eGFP durch überlappende PCR fusioniert und transient in HeLaS3-Zellen transfiziert. Pfeile markieren die transfizierten Zellen im Phasenkontrast (Mikroskop: Zeiss, Axioskop).

Einen weiteren Hinweis auf die Funktion dieser neuen Spermienkern-spezifischen Variante der PHGPx lieferte ein Experiment von H. Pfeifer mit Selen-depletierten Ratten, deren PHGPx-Aktivität im Hoden auf 30% Ausgangsaktivität gesunken war [Pfeifer et al., 2001]. Es sollte dabei der Kondensationsgrad von Nebenhoden-Spermienköpfen mittels der sogenannten Acridin-Orange-Färbung ermittelt werden. Acridine-Orange (AO) unterscheidet zwischen einzelsträngigen und doppelsträngigen Nukleinsäuren [Tejada et al., 1984]. Reife, vollständig kondensierte Spermienkerne sind säure- und hitzeresistent. Werden säure- oder hitzebehandelte Spermien mit AO gefärbt, erhält man, je nachdem ob die Spermien vorher vollständig kondensiert vorlagen, d.h. ob die intra- und intermolekularen Protamin-Disulfidbrücken ausgebildet waren, eine unterschiedliche Fluoreszenz. Nicht-

kondensierte, durch die Behandlung denaturierte, einzelsträngige Spermien-DNA fluoresziert rot, wohingegen sich vollständig kondensierte DNA auf diese Weise nicht denaturieren lässt und grün fluoresziert. Bei Selen-adäquat ernährten Tieren waren die Spermien aus allen Teilen des Nebenhodens vollständig kondensiert. Bei Spermien aus dem Nebenhodenkopf Selen-depletierter Ratten war anhand der Rotfärbung eine gestörte Kondensation erkennbar: Spermien aus dem Nebenhodenschwanz färbten sich gelb, was auf eine unvollständige Kondensation hindeutet. Da die PHGPx das einzige nukleäre Selenoprotein im Spermienkopf ist, kann geschlossen werden, dass die PHGPx für die Chromatin-Kondensation verantwortlich ist.

Somit erfüllt die PHGPx im Spermium drei Funktionen: Schutzfunktion vor oxidativem Stress und oxidativer Mutagenese, Bestandteil der mitochondrialen Kapsel als enzymatisch inaktives strukturelles Protein und Protamin-Quervernetzung und Kondensation des Chromatins der Spermien.

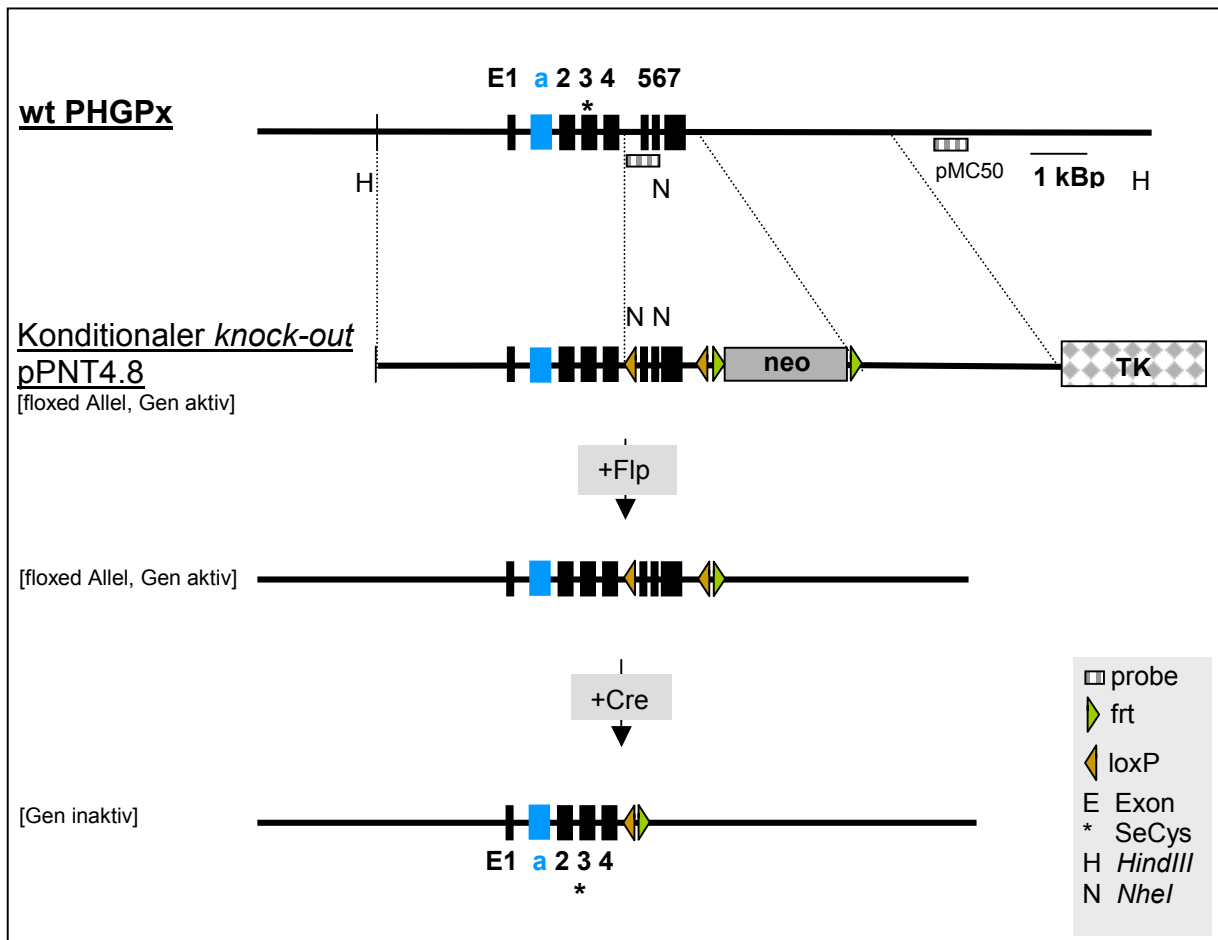
#### 4.2.7. Änderung der *Targeting*-Strategie (Version 2)

Die Erkenntnisse, die aus den PHGPx-Chimären, aus der oben beschriebenen Kooperation und aus der Arbeit von Ursini et al. (1999) gewonnen wurden, hatten Konsequenzen für die Etablierung der PHGPx *knock-out*-Mäuse.

Wie unter 2.3.2 detaillierter beschrieben ist, wurden für die zweite Version des konditionalen PHGPx *knock-outs* (pPNT4.8) bereits bestehende Vektoren zum Teil modifiziert (Abb. 24).

Wie auch bei der *Targeting*-Strategie des konditionalen TR3 *knock-outs* wurde die *frt*-flankierte Neo-Resistenzkassette in den 3' nicht-transkribierten Bereich der PHGPx eingesetzt. Die für die spätere Inaktivierung notwendige zweite *loxP*-Stelle wurde in dem letzten verbleibenden, größeren Intron zwischen Exon 4 und 5 belassen. Dieses Intron wurde auf mögliche weitere alternative Exons anhand eines Gewebe-Northern-Blots getestet. Dabei ergab sich kein Hybridisierungssignal und somit kein Hinweis auf ein weiteres Exon in dem betreffenden Intron (Daten nicht gezeigt). Durch die *frt*-Stellen kann die Neo-Kassette durch Flp-Expression *in vivo* oder *in vitro* deletiert werden. Die letzten drei Exons mit dem SECIS-Element sollten nach Verpaaren von Cre-exprimierenden, transgenen Mäusen deletiert werden,

wodurch die Translation an dem auf Exon 3 befindlichen UGA-Kodon gestoppt und die Synthese eines enzymatisch aktiven Proteins unterbunden werden sollte.



**Abb. 24: PHGPx knock-out-Strategie (Version 2).** Aufgrund der Existenz eines Spermienkern-spezifischen Exons (Ea) in Intron 1 wurde die Strategie dahingehend verändert, dass nunmehr die letzten drei Exons mit dem SECIS-Element von zwei loxP-Stellen flankiert wurden. Um die Veränderungen im PHGPx-Lokus so klein wie möglich zu gestalten, kann der im 3'-untranslatierten Bereich gelegene positive Selektionsmarker bei Bedarf durch Flp-Rekombinase *in vitro* oder *in vivo* deletiert werden. Durch Kreuzen mit Cre-exprimierenden Mäusen wird das für die Inkorporation von SeCys essentielle Element entfernt.

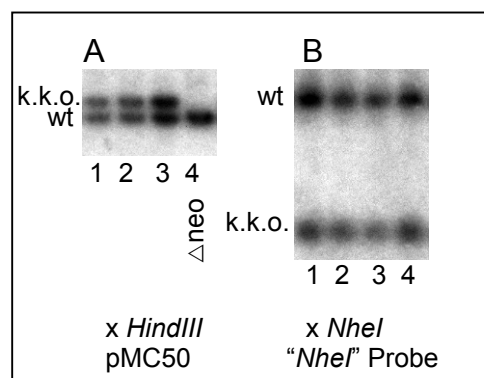
#### 4.2.8. ES-Zellkultur, Blastozysteninjektion und Rückkreuzung

Für das *Gene-Targeting* wurden ebenso wie im Falle der TR3 die beiden ES-Zelllinien TBV2 und E14 herangezogen. Die Frequenz der homologen Rekombination war bei jeweils 500 ES-Einzelzellklonen, die mit der 3'-externen Probe (pMC50) in einem *HindIII*-Restriktionsverdau getestet wurden, identisch und betrug 8%.

ES-Zellklone mit dem pPNT4.8 Konstrukt wurden zusätzlich nach einem *NheI*-Restriktionsverdau mit einer internen *NheI*-Probe getestet (Abb. 24), um zu

verifizieren, dass die 5'-loxP-Stelle während der homologen Rekombination nicht verloren ging. 50% der mit der 3'-Probe (pMC50) positiv getesteten ES-Zellklone hatten die proximale loxP-Stelle verloren, wodurch sich die Frequenz auf 4% verringerte. In Abb. 25 A ist exemplarisch ein Southern-Blot gezeigt, wobei die kleinere 16 kBp Bande die wt-Situation darstellt und die konditionale *knock-out*-Bande aufgrund der Neo-Kassette um 1,8 kBp größer ist. Zwei positiv rekombinierte TBV2 ES-Zellklone und drei E14 ES-Zellklone wurden zusätzlich mit Flp-Rekombinase transient transfiziert und mit Puromycin für 48 h selektiert. Die Flp-vermittelte Exzision der Neo-Resistenzkassette kann nur durch zwei unabhängige Southern-Blot-Analysen jedes ES-Zellklons mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen ermittelt werden, da sich nach Flp-vermittelter Deletion der Neo-Kassette das wt- und das loxP-flankierte PHGPx-Allel aufgrund ihrer Größe nicht mehr unterscheiden (Abb. 25). Die Frequenz der Neo-Deletion war für die parentalen ES-Zellklone unterschiedlich und lag zwischen 2 und 6%.

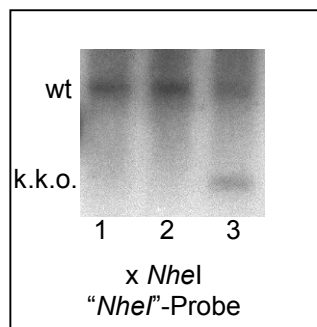
Die C57BL/6 Blastozysteninjektion von ES-Zellklonen erfolgte wiederum am Institut für Säugetiergenetik (GSF). Nur einer aus sechs mikroinjizierten TBV2 ES-Zellklonen (4.8.1-1) mit dem konditionalen PHGPx *knock-out*-Allel ergab vier männliche Chimären mit 70-90% Chimärismus gemessen anhand der Fellfarbe. Das Rückkreuzen solcher Chimären ergab bisher nur in einem Fall einen Nachkommen mit einer Agouti Fellfarbe und einem wt-Genotyp.



**Abb. 25: Gene-Targeting der PHGPx (Version 2).** (A) Mit pPNT4.8 transfizierter ES-Zellklon (E14), dessen homologe Rekombination bereits mit der 3'-externen Probe (pMC50) verifiziert wurde (Daten nicht gezeigt, entspricht aber A1-3). Dieser wurde daraufhin transient mit einem Flp-Rekombinase exprimierenden Plasmid selektiert und auf Neo-Deletion mit der 3'-externen Probe getestet. Nach erfolgter Flp-vermittelter Neo-Deletion (A4) gibt es keinen Größenunterschied mehr zwischen wt- und konditionalem *knock-out*-Allel. Deshalb müssen diese zusätzlich in einem weiteren Southern-Blot mit einer internen *NheI*-Probe getestet werden (B1-4), welche spezifisch das konditionale PHGPx *knock-out*-Allel erkennt (B).

Zehn nach Deletion der Neo-Kassette getestete E14 ES-Zellklone führten nicht zu einem befriedigendem Chimärismus, der eine Keimbahntransmission erwarten ließ. Nur ein parental ES-Zellklon (4.8.16), bei welchem die Neo-Kassette noch im 3' untranskribierten Bereich belassen wurde, erzeugte zwei männliche und eine weibliche hochprozentige Chimäre. Das Rückkreuzen eines der Männchen ergab bisher 7 Agouti Nachkommen (Abb. 26), von denen fünf das konditionale *knock-out*-Allel besitzen.

Dieser ES-Zellklon (4.8.16) wurde sodann nochmals mit Flp-Rekombinase transfiziert, um die Neomycin-Resistenzkassette *in vitro* zu deletieren. Die Chimären-Produktion von solchen positiv rekombinierten ES-Zellsubklonen ist noch nicht abgeschlossen.



**Abb. 26: Genotypisierung von Agouti Nachkommen eines PHGPx-Chimären.** Die Agouti Nachkommen eines chimären Tieres, welches aus der Injektion des E14 ES-Zellklons 4.8.16 entstand, wurden mittels Southern-Blot und einer charakteristischen, internen *NheI*-Probe getestet. Das dritte Tier (3) ist heterozygot für das neue konditionale PHGPx *knock-out*-Allel.

Als nächster Schritt werden zum einen die heterozygoten konditionalen PHGPx *knock-out*-Mäuse mit Cre-exprimierenden Mäusen gekreuzt, um das Gen spezifisch inaktivieren zu können. Zum anderen sollen durch Geschwisterpaarung homozygote Mäuse mit konditionalem *knock-out*-Allel generiert werden.

## 5. Diskussion

Ziel der Arbeit war die Etablierung von Mausmodellen für die Analyse zweier ausgewählter Selenoproteine. Die Gene für TR3 und PHGPx sollten durch gezielte Mutagenese *in vivo* inaktiviert werden (*knock-out*).

Dass Selenoproteine in Säugetieren unentbehrlich sind, wurde bereits durch die gezielte Zerstörung des Gens für die SeCys-tRNA gezeigt. Homozygote *knock-out*-Embryos für dieses Gen werden kurz nach der Implantation an Tag 6.5 p.c. im Uterus resorbiert [Bösl et al., 1997].

Über die Bedeutung und Notwendigkeit einzelner Selenoproteine *in vivo* war zu Beginn dieser Arbeit, mit Ausnahme des *knock-outs* für die cytosolische Glutathion-Peroxidase, nichts bekannt.

### 5.1. Etablierung von Thioredoxin-Reduktase 3-defizienten Mäusen

Eine mögliche Redundanz des mitochondrialen Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase/Peroxiredoxin-Systems zur PHGPx, die Detoxifikation von in der Atmungskette generierten ROS betreffend, kristallisierte sich erst im Laufe der vorliegenden Arbeit heraus. Deshalb sollte zusätzlich zur PHGPx auch die zum damaligen Zeitpunkt neu klonierte, mitochondriale TR in Mäusen inaktiviert werden. Im Falle einer funktionellen Redundanz von PHGPx und TR3 sollten somit doppel-*knock-out*-Mäuse für beide Enzyme etabliert werden.

Cytosolisches Trx ist für die embryonale Entwicklung von Mäusen essentiell, wie im *knock-out*-Mausmodell gezeigt werden konnte [Matsui et al., 1996]. Ob dieser Befund auch auf das mitochondriale Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase-System übertragen werden kann, ist noch offen, wird aber mit den in dieser Arbeit beschriebenen Mausstämmen in Kürze zu prüfen sein.

Um bei einer potenziellen embryonalen oder frühen postnatalen Letalität von TR3-defizienten Mäusen dennoch die physiologische Funktion des Enzyms in den unterschiedlichen Geweben studieren zu können, wurde die Strategie des konditionalen *knock-outs* gewählt. Dazu wurden die letzten vier Exons des TR3-Gens mit loxP-Stellen flankiert, um die Expression der TR3 zunächst so wenig wie möglich zu beeinflussen. Das an der Katalyse mitwirkende SeCys liegt in dem durch loxP-

Stellen flankierten Bereich. Werden Mäuse mit einem solchen konditionalen Genkonstrukt mit Cre-transgenen Tieren gekreuzt, kann das Gen je nach verwendeter Cre-transgener Maus in einer gewebe- und zeitspezifischen Weise inaktiviert werden. Für die Generierung von konditionalen *knock-out*-Mäusen müssen allerdings komplexere Vektorkonstrukte als für eine direkte *knock-out*-Strategie kloniert werden. Durch das Einkreuzen von Cre-transgenen Tieren kann der Phänotyp eines *knock-outs* erst eine Generation später analysiert werden.

Um mögliche Wechselwirkungen zwischen dem Selektionsmarker und der endogenen Expression der TR3 ausschließen zu können, wurde die Neomycin-Kassette bereits *in vitro* in den ES-Zellen durch transiente Expression von Flp-Rekombinase deletiert [Stark et al., 1992]. Der große Nachteil bei dieser Vorgehensweise ist, dass sich die Passagenzahl der manipulierten ES-Zellen durch die zweite Selektionsrunde erhöht und dadurch der Anteil der ES-Zellklone, die gute Chimären bilden und Keimbahnpotential haben, stark abnimmt [Fedorov et al. 1997, Longo et al., 1997]. Inwiefern die inserierten loxP- und frt-Stellen die endogene Expression der TR3 beeinflussen, kann nur durch den Vergleich der TR3-Expression von homozygoten, konditionalen TR3 *knock-out*-Mäusen mit wt-Kontrolltieren geklärt werden.

Über den Phänotyp von TR3-defizienten Mäusen kann man im Moment noch keine definitive Aussage machen, da das Verpaaren mit Cre-transgenen Mäusen und die anschließende Geschwisterverpaarung hemizygoter Mäuse zur Zeit durchgeführt wird. Die Strategie dabei ist, zunächst konditionale *knock-out*-Mäuse mit sogenannten *Deleter*-Mäusen, die die Cre-Rekombinase sehr früh in der Embryonalentwicklung exprimieren, zu verpaaren um einen *knock-out* in allen Geweben zu erzeugen [Schwenk et al., 1995]. Die ersten Experimente dazu zeigen, dass die beiden etwa 6 kBp entfernten loxP-Stellen *in vivo* von Cre-Rekombinase erkannt werden. Dadurch konnten mittlerweile hemizygote TR3 Mäuse etabliert werden, die keinen offensichtlichen Phänotyp zeigen.

Sollte sich der homozygote TR3 *knock-out* als letal erweisen, worauf die ersten Verpaarungen hindeuten, werden Mäuse mit konditionalem TR3-Allel mit sogenannten *Balancer*-Cre Mäusen verpaart, die eine Mosaikexpression von Cre-Rekombinase zeigen [Betz et al., 1996]. *Balancer*-Cre Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase nicht in jeder Zelle eines Gewebes. Dadurch wird in einem Gewebeverband auf Zellen selektioniert, deren Überleben von der Existenz einer aktiven TR3 abhängt.



Das Expressionsmuster der TR3 in Mäusen ähnelt sehr stark dem beim Menschen. Das Enzym wird stark in Leber, Niere und Herz und etwas schwächer in Hoden exprimiert [Miranda-Vizuet et al., 1999]. Die Komplexität der Expression der TR3 wird dadurch noch vergrößert, dass drei N-terminale Spleißvarianten kloniert wurden. Es wird daher vermutet, daß das Enzym nicht nur in den Mitochondrien sondern auch in anderen Kompartimenten der Zelle vorliegt. Interessanterweise überlappt das erste Exon der TR3 sowohl bei Ratte als auch bei Maus und Mensch mit dem Gen für die Catechol-o-Methyltransferase (COMT) [Sun et al., 2001]. Es wurde deshalb diskutiert, dass bei den bereits etablierten COMT *knock-out*-Mäusen eventuell gleichzeitig die Expression der TR3 beeinträchtigt wurde. Dagegen spricht aber, dass bei dem COMT *knock-out* die Exons 2 bis 5 deletiert wurden, die ca. 30 kBp 5´ vor dem ersten Exon der TR3 liegen [Gogos et al., 1998].

Die Etablierung von genetisch gezielt veränderten Mäusen ist ein sehr zeitintensiver Prozess mit vielen nicht immer kontrollierbaren Einzelschritten. Besonders schlecht zu kontrollieren sind die genetische Stabilität und der Erhalt der Totipotenz von ES-Zellen *in vitro*, die Produktion von hochprozentigen Chimären und die Keimbahntransmissivität des veränderten Allels.

Mit der Etablierung von konditionalen TR3 *knock-out*-Mäusen ist das mit dieser Arbeit gesteckte Ziel erreicht worden. Mit der Phänotypisierung der homozygoten *knock-out*- Mäuse kann in Kürze begonnen werden.

Um die physiologische Bedeutung der einzelnen Thioredoxin-Reduktasen *in vivo* studieren zu können, wird in unserem Labor zusätzlich zur TR3 auch die ubiquitär exprimierte, cytosolische TR1 gezielt in Mäusen inaktiviert.

## 5.2. Erster Versuch der Etablierung von PHGPx-defizienten Mäusen

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte das bei einer Expressionsklonierung in Burkitt Lymphom-Zellen isolierte antiapoptotisch wirkende PHGPx-Gen in Mäusen inaktiviert werden.

Für die Etablierung solcher Mäuse wurden zwei Strategien verfolgt. Um die Gewebe-Expression der PHGPx durch einfache Färbung verfolgen zu können, wurde ein Fusionsgen konstruiert, das für ein N-terminales Fusionsprotein der PHGPx mit Nls- $\beta$ -Galactosidase kodiert, wobei die Exons 2 bis 4 des PHGPx-Gens durch diese Nls-

lacZ-Kassette ersetzt wurden. Es stellte sich im Folgenden bei der Analyse hochprozentiger Chimären heraus, dass dieses Fusionskonstrukt aus noch unbekanntem Gründen nicht exprimiert wird oder inaktiv ist, was die Interpretation der an chimären Tieren erhobenen Befunde erschwerte. Fehlende Aktivität eines inserierten lacZ-Gens ist nach Aussage von M. Hrabé de Angelis und W. Wurst in solchen *knock-in*-Experimenten durchaus keine Seltenheit.

Zu Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, dass die PHGPx im Hoden hoch exprimiert ist und eine hohe Enzymaktivität besitzt. Da deshalb bei einem direkten *knock-out* Interferenzen mit der männlichen Fertilität zu befürchten waren und außerdem die Möglichkeit bestand, dass homozygote PHGPx *knock-out*-Mäuse letal sein könnten [Roveri et al., 1992, Godeas et al., 1996, Godeas et al., 1997, Maiorino et al., 1998, Nam et al., 1998], sollte parallel zum lacZ *knock-in* ein konditionaler PHGPx *knock-out* generiert werden. Bei der konditionalen *knock-out*-Strategie wurde die Neo-Kassette zunächst im ersten Intron belassen, in der Vorstellung, dass diese Kassette mit ihrem eigenen Terminationssignal die Expression der PHGPx stören und dadurch einen hypomorphen Phänotyp induzieren könnte.

Jeweils ein ES-Zellklon der beiden unterschiedlichen PHGPx *knock-out*-Konstrukte (2.4.1 und 4.2.1) ergab Chimären mit fast 100% Chimärismus, gemessen an der Fellfarbe. Zu Beginn des Rückkreuzens solcher Chimären mit C57BL/6 Mäusen zwecks Keimbahntransmission bestand aufgrund der doch großen Population von hochprozentigen Chimären ein großer Optimismus, die in ES-Zellkultur gezielt veränderten Allele in die Keimbahn zu bekommen. Trotz einer Anzahl von 180 Nachkommen von 10 männlichen, fertilen Chimären mit mehr als 50% Chimärismus wurden keine Agouti Nachkommen geboren.

Geleitet einerseits von den von Ursini et al. (1999) publizierten neuen Erkenntnisse der PHGPx in der Spermienreifung und andererseits von den in der Kooperation mit H. Pfeifer gewonnenen Daten über die Existenz eines Spermienkern-spezifischen alternativen Exons in Intron 1 der PHGPx entstand die Hypothese, dass ein intaktes Allel nicht ausreicht für eine voll funktionelle Spermatogenese.

### 5.2.1. Neue Funktionen der PHGPx in der Spermatogenese

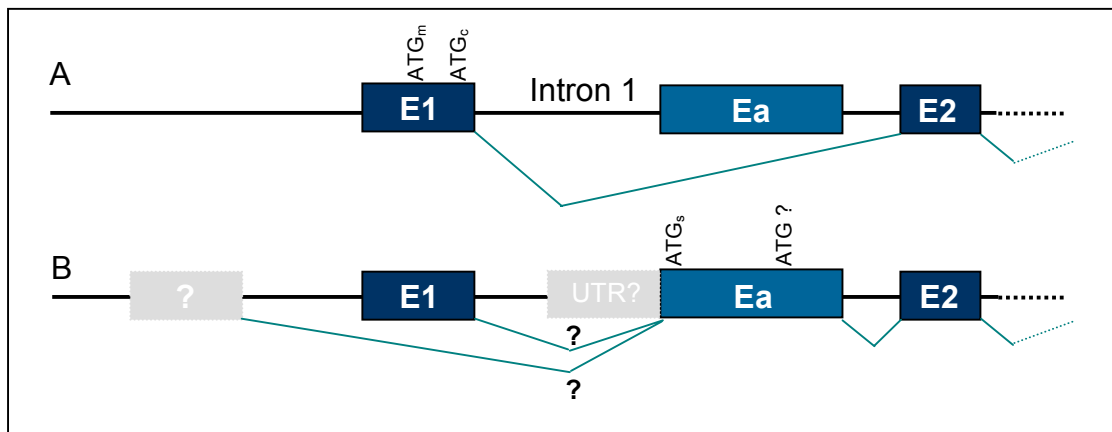
Die von Ursini et al. (1999) ermittelte Funktion der PHGPx als mitochondriales Strukturprotein von Spermienmittelstücken erklärt die mit akutem Selenmangel assoziierten morphologischen Abnormalitäten vor allem der Mittelstücke von Spermatozoen [Wallace et al., 1983, Watanabe und Endo, 1991]. Durch diese neuen Erkenntnisse geleitet, stellte sich die Frage, ob ein funktionelles PHGPx-Allel ausreicht, um eine voll funktionelle Spermatogenese zu gewährleisten. Die vergeblichen Versuche, Keimbahntransmission zu erreichen, standen mit dem Konzept einer Haploinsuffizienz in Einklang. Dies erklärt jedoch nicht, weshalb auch im Falle des konditionalen *knock-out* weder Nachkommen mit Agouti Fellfarbe noch Keimbahntransmission des veränderten Allels zu beobachten war.

Zur gleichen Zeit entwickelte sich über das DFG-Schwerpunktprogramm „Selenoproteine“ ein Kontakt mit der Gruppe von Prof. Behne aus Berlin, die aus Ratten-Spermienkernen ein 34 kD-Selenoprotein gereinigt hatten [Behne et al., 1988]. Es gelang ihnen, die N-terminale Sequenz dieses neuen Selenoproteins zu ermitteln, jedoch zeigte sie keine Homologie zu in den Datenbanken vorhandenen Proteinsequenzen. Die Zuordnung der Proteinsequenz zum Gen gelang G. Laux, indem er alle verfügbaren, genomischen Mausequenzen in die sechs möglichen Leseraster übersetzte und die sich daraus ergebenden, virtuellen Proteinsequenzen mit der bekannten von Ratte stammenden Peptidsequenz verglich. Teile der Ratten-Sequenz des N-terminalen Oligopeptids sind identisch mit einem möglichen offenen Leseraster in Intron 1 des Mausgens der PHGPx. Daraus entstand die Hypothese, dass es sich bei diesem 34 kD-Selenoprotein um eine N-terminale Spleißvariante der PHGPx handelt.

Wie sich später herausstellte, hatte H. Pfeifer aus der Gruppe von Prof. Behne für das neue Selenoprotein bereits eine enzymatische Reaktivität gegenüber Phospholipid-Hydroperoxiden und eine Kreuzreaktivität des 34 kD-Selenoproteins mit einem PHGPx-Antikörper im Western-Blot nachweisen können.

In 3'-RACE Experimenten konnte in dieser Arbeit die neue Variante der PHGPx aus Testis-cDNA kloniert werden [Pfeifer et al., 2001]. Zahlreiche Experimente, den 5'-untranslatierten Bereich dieser neuen Variante zu ermitteln, blieben erfolglos. Aus diesem Grunde ist noch unbekannt, ob das 5' davon gelegene Exon 1 Teil dieser

neuen cDNA ist, ob ein noch weiter entferntes 5' gelegenes, bislang unbekanntes Exon benutzt wird oder ob vor dem alternativen Exon ein zusätzlicher Transkriptionsstart liegt (Abb. 27 B). Ein zusätzlicher Transkriptionsstart könnte wie erwähnt weiter 5' vor dem ersten Exon oder zwischen dem Ende des ersten Exons und dem Beginn des alternativen Exons liegen. Im ersteren Falle müsste man einen zusätzlichen Spleiß von einem zusätzlichen hypothetischen 5' Exon zum alternativen Exon postulieren.



**Abb.27: Hypothetische Spleißvarianten des 5'-UTR der Spermienkern-spezifischen, alternativen Form der PHGPx.** In (A) ist das klassische Spleißen des N-Terminus der PHGPx dargestellt und in (B) die hypothetischen Spleißvarianten der Spermienkern-spezifischen, alternativen Form der PHGPx (Abk.: m = mitochondrial, c = cytosolisch, s = Spermienkern-spezifisch).

Die Daten sind jedoch auch mit einem alternativen Spleißmodell ohne zusätzlichen Transkriptionsstart kompatibel. Durch alternatives Spleißen könnten zwei unterschiedliche Transkripte entstehen, eins das für die klassische Form der PHGPx kodiert (Abb. 27 A), sowie ein längeres Transkript bestehend aus E1, Ea, E2 etc. (Abb. 27 B), das für die nukleäre Form der PHGPx kodiert. Für die Spermienkern-spezifische Form der PHGPx würde das dritte ATG-Start-Kodon benutzt. Ob im Intron Elemente für eine Testosteron-abhängige Genregulation gefunden werden können, bleibt abzuwarten.

In Northern-Blot-Analysen von unterschiedlichen Mausegeweben konnte die Testis-spezifische Expression dieser alternativen Form der PHGPx bestätigt werden.

Durch Fusion mit eGFP wurde gezeigt, dass das alternative Exon eGFP sowohl in HeLa- als auch in den murinen NIH3T3-Zellen in den Kern dirigiert.

Wird die abgeleitete Peptidsequenz des Ea der PHGPx mit der von Protamin 2 verglichen [Balhorn, 1990], erhält man eine annähernd 50-prozentige Homologie über einen Bereich von 52 Aminosäuren, die hauptsächlich durch die Cluster von

basischen Aminosäuren zustande kommt. Deshalb lässt sich vermuten, dass die Spermienkern-spezifische Form der PHGPx über einen ähnlichen Mechanismus wie Protamin 2 an DNA bindet. Jeweils ein Protamin 2 Molekül interagiert durch ionische Wechselwirkungen mit dem Zuckerphosphatgerüst von 11 Basenpaaren [Bench et al., 1996]. Die Protamine, die in den letzten Stadien der Spermio-genese die Übergangproteine und Histone ersetzen, werden durch ihre zahlreichen Cystein-Reste zusätzlich zunächst intra- dann intermolekular verknüpft, wodurch das Chromatin kondensiert und stabilisiert wird [Balhorn et al., 1992]. Auch wenn der formale Beweis noch aussteht, besteht kein Zweifel daran, dass die neue Variante der PHGPx für die Funktion der Protamin-Quervernetzung und Chromatin-Kondensation verantwortlich ist. Die PHGPx kann aufgrund ihrer häufig diskutierten, breiten Substratspezifität neben GSH auch Proteinthiole als Elektronendonoren akzeptieren und somit Disulfidbrücken in Proteine einführen [Ursini et al., 1997]. Durch den N-terminalen „Anker“ mit hoher Affinität zu DNA, der von dem Ea der PHGPx kodiert wird, kommt die PHGPx in die räumliche Nähe der Protamine und kann so ihre zusätzliche Funktion der Protamin-Quervernetzung ausüben. Allerdings ist noch unklar, welcher physiologische Elektronenakzeptor bei diesem Prozess reduziert wird.

Einen funktionellen Beweis dafür, dass eine Selenverbindung (d.h. vermutlich ein Selenoprotein) an der Chromatin-Kondensation beteiligt ist, erbrachten die AO-Färbeexperimente von H. Pfeifer et al. (2001) an Spermien von Selen-adäquat und Selen-depletiert ernährten Ratten. Die AO-Färbung ist ein Gradmesser für die Kondensation von Spermien-Chromatin und daraus abgeleitet für den Gehalt an reduzierten Thiolgruppen in Protaminen des Spermienkerns [Tejada et al., 1984, Kosower et al., 1992]. Da die neue Variante der PHGPx das einzige Selenoprotein in den Spermienkernen der Ratte ist, schrieben Pfeifer et al. die Funktion der Protamin-Quervernetzung und Chromatin-Kondensation dieser Form der PHGPx zu.

Um auch den formellen Beweis zu liefern, müsste die Quervernetzung *in vitro* durch die Interaktion der drei Komponenten DNA, Protamin und gereinigter Spermienkern-spezifischer PHGPx gezeigt werden. Genetisch könnte der Beweis dadurch geführt werden, das alternative Exon *in vivo* gezielt zu mutieren und den daraus resultierenden Verlust der Kondensation von Spermien-Chromatin durch die gleichzeitige transgene Überexpression der alternativen Form der PHGPx *in vivo* zu revertieren (*Rescue*).

Es ist eine interessante Frage, ob Mutationen im PHGPx-Gen beim Menschen zu männlicher Infertilität führen. Dabei könnten Mutationen in dem alternativen Exon zu einem isolierten Defekt in der Chromatin-Kondensation der Spermienkerne führen. Bei infertilen Männern wird es sinnvoll sein einen Defekt in der Chromatin-Kondensation der Spermienkerne mit Änderungen in der Sequenz des alternativen Exons zu vergleichen.

Die aus der Kooperation mit H. Pfeifer erhaltenen Ergebnisse, unterstreichen ebenso wie die von Ursini und Mitarbeitern (1999) publizierten Daten die vielfältigen Funktionen der PHGPx während der Spermienreifung. Eine Schlußfolgerung aus den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen ist, dass es sich bei unserem geplanten konditionalen *knock-out* in Wirklichkeit um einen direkten *knock-out* handelte.

### **5.2.2. Mosaik von testikulärer Atrophie bei PHGPx-Chimären**

Die Entdeckung der alternativen Form und der zusätzlichen Funktion als mitochondriales Strukturprotein der Spermien unterstreichen die zentrale Rolle der PHGPx bei der Spermienreifung und legen die Interpretation nahe, dass die fehlende Keimbahntransmission auf eine Haploinsuffizienz zurückgehen könnte. Diese Überlegungen gaben Anlass zur Entscheidung, PHGPx-Chimären mit mehr als 70% Chimärismus zu töten und die Hoden und Spermien morphologisch zu analysieren. Überraschenderweise zeigte sich neben zahlreichen Abnormalitäten in den Mittelstücken und Köpfen von isolierten Spermatozoen, die nach der Arbeit von Ursini zu erwarten waren, auch ein Mosaik von Desorganisation und Atrophie des Keimepithels unterschiedlichen Ausmaßes. Solche Abnormalitäten werden auch bei fortschreitender Selendefizienz in Ratten und Mäusen ab der zweiten oder dritten Generation beobachtet [Wallace et al., 1983 a, Behne et al., 1996 b].

In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass die Spermatogenese ein syncytialer Prozess ist und genetisch haploide Spermatozonen phänotypisch diploid sind [Braun et al., 1989]. Das bedeutet, dass schon bei der ersten mitotischen Teilung die für die Differenzierung determinierten Spermatozonen zwar eine Karyokinese, aber nur eine unvollständige Cytokinese vollziehen. Somit sind die sich entwickelnden Spermatozonen bis zur Freisetzung in das Lumen der Tubuli seminiferi über bis zu 1 µm große Cytoplasmabrücken verbunden, worüber ein Austausch von Zellbestandteilen zwischen den reifenden Spermatozonen erfolgen kann. In den

Chimären haben sämtliche Spermatozoen, die von einem Spermatogonium mit nur einem funktionellen Allel von PHGPx abstammen, somit nur die Hälfte der PHGPx-Proteinmenge, verglichen mit wt-Spermatogonien, die von den C57BL/6 Blastozysten abstammen. Das Nebeneinander von morphologischen Störungen und Atrophien mit offensichtlich intakten und funktionellen Hodenanteilen spiegelt - histologisch sichtbar - den Chimärismus wider, wobei die C57BL/6 Anteile zur normalen Hodenmorphologie und -funktion beitragen.

Im Hoden einer Chimäre reifen also sowohl von C57BL/6 Spermatogonien abstammende Spermien als auch solche, die von der manipulierten ES-Zelllinie stammen, und beide Arten von Spermien konkurrieren um die Oozyte. Ob Spermien, die von hemizygoten Spermatogonien stammen, unfähig zur Befruchtung sind oder ob sie „nur“ das Rennen um die Eizelle gegenüber wt-Spermien verlieren, kann aus den vorliegenden Experimenten noch nicht geschlossen werden. Diese Frage wird sich beantworten lassen, wenn genetisch einheitlich hemizygoten Mäuse zur Verfügung stehen.

Inwiefern der in diesen Tieren aufgetretene Phänotyp der Hodenatrophie mit dem entsprechenden Genotyp der Tubuli seminiferi übereinstimmt, muss noch gezeigt werden. Dazu hätte sich die Expression der  $\beta$ -Galactosidase als Indiz für PHGPx-Inaktivierung geeignet, allerdings konnte in keinem Fall bei PHGPx-Chimären eine Aktivität des Reporterenzym nachgewiesen werden. FISH Experimente, die in Kooperation mit I. Jentsch durchgeführt wurden, ergaben für eine aus der Nls-lacZ-Neo-Kassette bestehende Probe deutliche Signale für Metaphase-Chromosomen, die aus den entsprechenden ES-Zellklonen präpariert wurden. Bei den Formalinfixierten Testis-Paraffindünnschnitten erhielt man hingegen eine so hohe Autofluoreszenz, dass die eigentlichen Signale nicht mehr zu detektieren waren. Eine weitere Möglichkeit, die noch ausstehende Korrelation zwischen beobachtetem Phänotyp und dem zugrunde liegenden Genotyp zu bestätigen, ist mittels PCR die unterschiedlichen Genotypen von intakten und abnormalen Tubuli seminiferi nach Mikrodissektion zu analysieren. Die Schwierigkeiten dabei werden die sehr limitierten DNA-Mengen sein, die man aus einem Tubulus erhält. Darüber hinaus ist die Sequenz im Bereich des alternativen Exons der PHGPx *per se* nur sehr schwer zu amplifizieren.

Erst kürzlich konnten Cho und Mitarbeiter zeigen, dass chimäre Tiere mit jeweils nur noch einem funktionellen Allel von Protamin 1 oder 2 ebenfalls nicht in der Lage sind,

Nachkommen mit Agouti Fellfarbe zu erzeugen [Cho et al., 2001]. Dabei werden Spermien, die von dem ES-Zellanteil abstammen, zwar gebildet, zeigen aber morphologische Abnormalitäten des Spermienkopfes und sind außerdem nicht vollständig kondensiert. Diese Daten bestätigen und unterstreichen unsere Schlussfolgerung, dass die Spermienreifung aufgrund einer Haploinsuffizienz defekt sein kann. Bei einer Vielzahl anderer Gene führt erst ein homozygoter *knock-out* zu männlicher Sterilität. [Blendy et al., 1996, Eddy et al., 1996, Wu et al., 2000, Honarpour et al., 2000].

Unklar bleibt weiterhin, wie die Atrophie des Keimepithels bei PHGPx-Hemizygotie zustande kommt. Ein Einfluss von Selen auf die Hormonproduktion wurde von Behne et al. (1996) postuliert. In Frage kommt auch eine durch oxidativen Stress hervorgerufene Fas-Fas-Ligand induzierte Apoptose des Keimepithels (Koji et al., 2001). Im letzten Fall könnte es sich um eine Haploinsuffizienz der enzymatischen antioxidativen Schutzfunktion von PHGPx handeln.

Da der erste Versuch, PHGPx *knock-out*-Mäuse zu etablieren, aus den oben geschilderten Gründen scheiterte, wurde eine neue Klonierungsstrategie eingeschlagen.

### 5.3. Zweiter Versuch der Etablierung von PHGPx-defizienten Mäusen

Bei der zweiten konditionalen Strategie, die PHGPx in Mäusen gezielt zu inaktivieren, sollte ähnlich wie bei der TR3 *knock-out*-Strategie verfahren werden.

Der positive *frt*-flankierte Selektionsmarker Neomycin-Phosphotransferase wurde 3' vom transkribierten Bereich der PHGPx in einem Abstand von etwa 1,5 kbp von Exon 7 kloniert. Dadurch sollten mögliche Interferenzen mit der endogenen Expression der PHGPx minimiert werden. Weiterhin mußte für die spätere Cre-induzierte Inaktivierung eine zweite *loxP*-Stelle in das Gen eingebracht werden, was wiederum die Gefahr einer Interferenz mit der endogenen Expression der PHGPx impliziert. Die zweite *loxP*-Stelle wurde in das große Intron zwischen Exon 4 und 5 kloniert. Sie befindet sich 15 Bp 5' vor der für das Spleißen notwendigen Verzweigungsstelle und sollte damit das korrekte Spleißen nicht behindern [S. Stamm, persönliche Mitteilung]. In einer Northern-Blot-Analyse mit einer Intronprobe wurden weitere mögliche alternative Exons in diesem großen Intron ausgeschlossen. Die hier gewählte Strategie erlaubt somit, die letzten 3 Exons der PHGPx



einschließlich des SECIS-Elements gezielt zu deletieren, wodurch eine SeCys-Inkorporation an dem von Exon 3 kodierten UGA nicht mehr erfolgen kann.

Erst nachdem eine Vielzahl von TBV2 bzw. E14 ES-Zellklonen mikroinjiziert und die wenigen daraus resultierenden Chimären auf Keimbahntransmissivität getestet worden waren, gelang es, fünf heterozygote, für PHGPx konditionale Nachkommen zu bekommen. Heterozygote PHGPx *knock-out*-Mäuse, die durch Kreuzen mit Cre-*Deleter* Mäusen generiert werden, sind in Kürze zu erwarten.

## 5.4. Ausblick

### 5.4.1. TR3 *knock-out*

Wie die ersten Geschwisterverpaarungen von heterozygoten TR3 *knock-out*-Mäusen zeigen, muss mit einer perinatalen Letalität der homozygoten Mäuse gerechnet werden. Die Genotypisierung aus dieser Verpaarung stammenden Mäusen ergab bisher nur wt- bzw. für TR3 hemizygoten Nachkommen. Zwei tote Neugeborene hatten einen homozygoten TR3 *knock-out*-Genotyp. Die Verpaarungen für die Analyse solcher Embryos sind angesetzt und in wenigen Wochen kann damit begonnen werden, die Ursachen des perinatalen Phänotyps zu untersuchen. Dazu wird sich auch die konditionale lacZ *knock-in*-Strategie für TR3 als sehr nützlich erweisen (pPNT8.1), mit der durch einfache LacZ-Färbung die embryonale Expression der TR3 verfolgt werden kann. Diese Mäuse sollten ebenfalls in Kürze zur Verfügung stehen. Es wäre denkbar, dass der Phänotyp der TR3 *knock-out*-Mäuse ähnlich dem der mitochondrialen Superoxid-Dismutase (SOD-2) *knock-out*-Mäuse ist. Homozygote SOD-2 *knock-out*-Mäuse zeigen eine dilatative Cardiomyopathy, eine massive Reduktion der Succinat-Dehydrogenase und retardiertes Wachstum. Diese Mäuse sterben innerhalb der ersten 10 Tage nach Geburt [Li et al., 1995]. Aufgrund der perinatalen Letalität von homozygoten TR3 *knock-out*-Mäusen wird die *Balancer*-Cre-Maus erheblich an Bedeutung gewinnen, denn mit solchen Experimenten lässt sich die Bedeutung der TR3 in adulten Geweben studieren. Weitere Verpaarungen mit gewebespezifischen Cre-transgenen Mäusen werden sich dann nach den Ergebnissen aus diesen Experimenten richten.

#### 5.4.2. PHGPx *knock-out*

Nach Kreuzen der konditionalen PHGPx *knock-out*-Mäuse mit der *Cre-Deleter* Maus soll zunächst ein ubiquitärer PHGPx *knock-out* erzeugt werden. Bei heterozygoten *knock-out* Mäusen muss allerdings aufgrund der beschriebenen Ergebnissen mit erheblichen Problemen bei der männlichen Fertilität gerechnet werden. Zu erwarten ist eine Atrophie des Keimepithels und falls Spermien überhaupt gebildet werden können, massive Störungen der Morphologie von Spermien sowohl in den Mittelstücken als auch in den Köpfen. Inwiefern die von Behne et al. (1996 b) postulierte zusätzliche Funktion der PHGPx im Testosteron-Metabolismus zutrifft, lässt sich dann untersuchen. Weiterhin ist geplant, die PHGPx in verschiedenen Stadien der Spermatogenese durch entsprechende *Cre*-transgene Mäuse auszuschalten. Die PGK-2-*Cre*-Maus exprimiert die *Cre*-Rekombinase bereits während der ersten Prophase der meiotischen Teilung und die Protamin 1-*Cre*-Maus zu Beginn der Spermio-genese [Ando et al., 2000, O’Gorman et al., 1997]. Dadurch lassen sich möglicherweise die unterschiedlichen Effekte des Fehlens bereits eines PHGPx-Allels hinsichtlich der Atrophie des Keimepithels und der strukturellen Spermien-Abnormalitäten trennen und möglicherweise den verschiedenen Formen der PHGPx zuordnen.

Entsprechend der TR3 wird parallel dazu mit dem *Balancer-Cre* gekreuzt, wodurch man bei möglicher Letalität von homozygoten PHGPx *knock-out*-Tieren einen Hinweis auf die Bedeutung der PHGPx während der Embryonalentwicklung und in den adulten Geweben bekommen kann. Darüber hinaus soll die PHGPx selektiv im Gehirn durch Kreuzen mit Nestin-*Cre*-transgenen Mäusen inaktiviert werden [Tronche et al., 1999], da die PHGPx in der Gewebehierarchie im Gehirn am höchsten steht und dort möglicherweise eine wesentliche Schutzfunktion vor oxidativem Stress hat [Brigelius-Flohé, 2000].

Die *in vitro*-ermittelten Funktionen der PHGPx, wie die Modulation der Aktivitäten diverser Lipoxygenasen und Cyclooxygenasen implizieren einen Einfluss der PHGPx auf das Entzündungsgeschehen und damit auch bei der Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen. Inwieweit sich dies auf die *in vivo*-Situation übertragen lässt, soll in Zukunft durch gewebespezifischen *knock-out* der PHGPx im Endothel mit Hilfe der Tie2-*Cre*-Maus untersucht werden [Constien et al., 2001].

## 6. Zusammenfassung

Das Gen des Selenoproteins PHGPx war in der Arbeitsgruppe im Verlaufe einer Expressionsklonierung als antiapoptotisches Gen für Burkitt-Lymphom-Zellen kloniert worden. Die Komplexität der kotranslationalen Inkorporation von Selenocystein, welches bei Selenoenzymen Teil des reaktiven Zentrums ist, limitiert die Überexpression und erschwert die funktionelle Analyse der Selenoproteine sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Die PHGPx und das ebenfalls Selenocystein-abhängige mitochondriale Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase-System sind bei der Detoxifikation von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt, die in der mitochondrialen Atmungskette erzeugt werden. Im Gegensatz zur PHGPx vermittelt die Thioredoxin-Reduktase ihre Schutzfunktion vor oxidativem Stress über Thioredoxin-abhängige Peroxidasen, die sogenannten Peroxiredoxine. Aufgrund einer möglichen Redundanz beider Systeme sollten beide Gene in Mäusen gezielt zerstört und bei Bedarf doppel-*knock-out*-Tiere erzeugt werden.

Da das Fehlen der funktionellen, mitochondrialen Thioredoxin-Reduktase möglicherweise nicht mit dem Leben vereinbar ist, wurden Mäuse unter Verwendung des Cre/loxP-Rekombinationssystems etabliert, bei welchen das Gen zunächst aktiv ist. Die Inaktivierung der Thioredoxin-Reduktase 3 erfolgte durch Einkreuzen von transgenen Mäusen, die die Cre-Rekombinase in allen Geweben exprimieren. Die aus dieser Verpaarung abstammenden, heterozygoten *knock-out*-Mäuse zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp. Erste Ergebnisse zeigen, dass homozygote TR3 *knock-out*-Mäuse wahrscheinlich embryonal oder perinatal letal sind.

Bei der Inaktivierung des PHGPx-Gens in Mäusen wurden zwei Strategien verfolgt. Die lacZ *knock-in*-Strategie sollte ermöglichen, die Gewebeexpression der PHGPx zu studieren. Die konditionale *knock-out*-Strategie wurde parallel verfolgt, weil zu Beginn der Arbeit nicht abzusehen war, ob homozygote PHGPx *knock-out*-Mäuse lebensfähig sind oder ob Probleme mit der männlichen Fertilität zu erwarten sind. Schon lange war bekannt, dass die PHGPx im Hoden hoch exprimiert ist. Wie sich dann im Laufe dieser Arbeit herausstellte, handelte es sich bei dem konditionalen PHGPx *knock-out* ebenfalls um einen direkten *knock-out*. Durch die beabsichtigte konditionale *knock-out*-Strategie wurde ein Spermienkern-spezifisches, alternatives Exon des PHGPx-Gens zerstört. Diese neue Form der PHGPx wurde kloniert, das Hoden-spezifische Expressionsmuster und die Kernlokalisation des alternativen

Exons durch GFP-Fusionsproteine gezeigt. Geleitet von den in dieser Arbeit und von Ursini et al. (1999) beschriebenen neuen Funktionen der PHGPx in der Spermatogenese und den vergeblichen Versuchen, das veränderte PHGPx-Allel in Mäusen in die Keimbahn zu bekommen, wurden die Hoden und Spermien von den PHGPx-Chimären analysiert. Die Analyse der Chimären zeigte einen Phänotyp der partiellen Hodenatrophie und schweren Missbildungen der Spermien, der dem von Selen-defizienten Nagetieren sehr ähnlich ist. Die bei diesen Chimären beobachtete Haploinsuffizienz führte zu der Entscheidung, die konditionale *knock-out*-Strategie für PHGPx zu ändern. Letztendlich gelang es, mit der neuen konditionalen *knock-out*-Strategie Keimbahntransmission zu erhalten. Dadurch wurde nicht nur das gesteckte Ziel, ein Maus *knock-out*-Modell für die PHGPx zu etablieren, erreicht, sondern es wurden viele zusätzlich wichtige neue Erkenntnisse über die Struktur und Funktion der PHGPx in der Spermienreifung gewonnen. Die Cre-vermittelte Inaktivierung des konditionalen PHGPx-Allels wird in Kürze erwartet.

## 7. Literatur

### A

**Abate, C., Patel, L., Rauscher, F. J., and Curran, T.** (1990). Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity *in vitro*. *Science* 249, 1157-1161.

**Abremski, K., Hoess, R., and Sternberg N.** (1983). Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell*. 32, 1301-1311.

**Adham, I. M., Tessmann, D., Soliman, K. A., Murphy, D., Kremling, H., Szpirer, C., and Engel, W.** (1996). Cloning, expression and chromosomal localisation of the rat mitochondrial selenoprotein gene (MCS): the reading frame does not contain potential UGA selenocysteine codons. *DNA Cell. Biol.* 15, 159-166.

**Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D.** (1990). *Molekularbiologie der Zelle*, 2. Auflage. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

**Allen, R. G., and Tresini, M.** (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Rad. Biol. Med.* 28, 463-499.

**Andersson, M., Holmgren, A., and Spyrou, G.** (1996). NK-lysin, a disulfide-containing effector peptide of T-lymphocytes, is reduced and inactivated by human thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* 271, 10116-10120.

**Ando H., Haruna, Y., Miyazaki, J., Okabe, M., and Nakanishi, Y.** (2001). Spermatocyte-specific gene excision by targeted expression of Cre recombinase. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 272, 125-128.

**Andrae, U., Shingh, J., and Ziegler-Skylakakis, K.** (1985). Pyruvate and related alpha-ketoacids protect mammalian cells in culture against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *Toxicol. Lett.* 28, 93-98.

**Andreesen, J. R., and Ljungdahl, L.** (1973). Formate dehydrogenase of *Clostridium thermoaceticum*: incorporation of selenium-75, and the effect of selenite, molybdate, and tungstate on the enzyme. *J. Bacteriol.* 116, 867-873.

**Andrews, B. J., Proteau, G. A., Beatty, L. G., and Sadowski, P. D.** (1985). The FLP recombinase of the 2 $\mu$  circle DNA of yeast: interaction with its target sequences. *Cell* 40, 795-803.

**Arai, M., Imai, H., Sumi, D., Imanaka, T., Takano, T., Chiba, N., and Nakagawa, Y.** (1996). Import into mitochondria of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase requires a leader sequence. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 227, 433-439.

**Arnér, E. S. J., Nordberg, J., and Holmgren, A.** (1996). Efficient reduction of lipoamide and lipoic acid by mammalian thioredoxin reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225, 268-271.

**Arthur, J. R., Nicol, F., and Beckett, G. J.** (1990). Hepatic iodothyronine deiodinase: the role of selenium. *Biochem J.* 272, 537-540.

### B

**Baker, A., Payne, C., Briehl, M. M., and Powis, G.** (1997). Thioredoxin, a gene found overexpressed in human cancer, inhibits apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* 57, 5162-5167.

**Bäuerle, P. A., and Henkel, T.** (1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 141-147.

**Balhorn, R.** (1990). Mammalian protamines: structure and molecular interactions. In: *molecular biology of chromosome function*. Adolf, K. W. (ed.). Springer Verlag, New York, 366-395.

- Balhorn R., Corzett, M., and Mazrimas, J. A.** (1992). Formation of intraprotamine disulfides *in vitro*. Arch. Biochem. Biophys. 296, 384-393.
- Behne, D., Hilmert, H., Scheid, S., Gessner, H., and Elger, W.** (1988). Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins. Biochim. Biophys. Acta 966, 12-21.
- Behne, D., Kyriakopoulos, A., Weiss-Nowak, C., Kalckloesch, W. C., and Gessner, H.** (1996 a). Newly found selenium-containing proteins in the tissues of the rat. Biol. Trace Elem. Res. 55, 99-110.
- Behne, D., Weiler, H., and Kyriakopoulos, A.** (1996 b). Effects of Selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. J. Reprod. Fert. 106, 291-297.
- Bench, G. S., Friz A. M., Corzett, M. H., Morse, D. H., and Balhorn, R.** (1996). DNA and total protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects. Cytometry 23, 263-271.
- Berggren, M. M., Mangin, J. F., Gasdaska, J. R., and Powis, G.** (1999). Effect of selenium on rat thioredoxin reductase activity. Biochem. Pharmacol. 57, 187-193.
- Berlett, B. S., and Stadtman, E. R.** (1997). Protein Oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J. Biol. Chem. 272, 20313-20316.
- Berry, M., Banu, L., Harney, J. W., and Larsen, P. R.** (1993). Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine at UGA codons. EMBO J., 3315-3322.
- Betz, U. A., Vosshenrich, C. A., Rajewsky, K., and Muller, W.** (1996). Bypass of lethality with mosaic mice generated by Cre-loxP-mediated recombination. Curr. Biol. 6, 1307-1316.
- Björnstedt, M., Hamberg, M., Kumar, S., Xue, J., and Holmgren, A.** (1995). Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocysteine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols. J. Biol.Chem. 270, 11761-11764.
- Blendy, J. A., Kaestner, K. H., Weinbauer, G. F., Nieschlag, E., and Schütz, G.** (1996). Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene. Nature 380, 162-165.
- Böck, A., Forchhammer, K., Heider, J., and Baron, C.** (1991a). Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. Trends Biochemical Sci. 16, 463-467.
- Böck, A., Forchhammer, K., Heider, J., Leinfelder, W., Sawers, G., Veprek, P., and Zinoni F.** (1991 b). Selenocysteine: The 21st amino acid. Mol. Microbiol. 5, 515-520.
- Bösl, M. R., Takaku, K., Oshima, M., Nishimura S., and 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, 5531-5534.
- Borchert, A., Schnurr, K., Thiele, B. J., and Kühn H.** (1999). Cloning of the mouse phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene. FEBS Lett. 446, 223-227.
- Braun, R. E., Berhinger, R. R., Peschon, J. J., Brinster, R. L., and Palmiter, R. D.** (1989). Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid. Nature 337, 373-376.
- Brielmeier, M., Béchet, J.-M., Suppmann, S., Conrad, M., Laux, G., and Bornkamm G. W.** (2001). Cloning of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase as an antiapoptotic and growth promoting gene of Burkitt lymphoma cells. Biofactors 14, 179-190.
- Brigelius-Flohé, R.** (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. Free Rad. Biol. Med. 27, 951-965.
- Brigelius-Flohé, R., Friedrichs B., Maurer, S., Schultz, M., and Streicher, R.** (1997a). Interleukin-1-induced nuclear factor kappaB activation is inhibited by overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in a human endothelial cell line. Biochem. J. 328, 199-203.

**Brigelius-Flohé, R., Friedrichs B., Maurer, S., and Streicher, R.** (1997b). Determinants of PHGPx expression in a cultured endothelial cell line. *Biomed. Env. Sci.* 10, 163-176.

**Burk, R. F., and Hill, K. E.** (1993). Regulation of selenoproteins. *Annu. Rev. Nutr.* 13, 65-81.

## C

**Casso, D., and Beach, D.** (1996). A mutation in a thioredoxin reductase homologue suppresses p53-induced growth inhibition in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.* 252, 518-529.

**Cataldo, L., Baig, K., Oko, R., Mastrangelo, M.-A., and Kleene, K. C.** (1996). Developmental expression, intracellular localization, and selenium content of the cysteine-rich protein associated with the mitochondrial capsules of mouse sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 45, 320-331.

**Chambers, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Affara, N., McBain, W., and Harrison, P.R.** (1986). The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the "termination" codon, TGA. *EMBO J.* 5, 1221-1227.

**Chae, H. Z., Robison, K., Poole, L. B., Church, G., Storz, G., and Rhee, S. G.** (1994). Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 7071-7071.

**Cho, C., Willis, W. D., Goulding, E. H., Jung-Ha, H., Choi, Y.-C., Hecht, N. B., and Eddy, E. M.** (2001). Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat. Genet.* 28, 82-86.

**Chu, F.-F., Doroshov, J. H., and Esworthy, R. S.** (1993). Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 268, 2571-2576.

**Constien R., Forde, A., Liliensiek, B., Gröne, H.-J., Nawroth, P., Hämmerling, G., and Arnold, B.** (2001). Characterization of a novel EGFP reporter mouse to monitor Cre recombination as demonstrated by a Tie2 Cre mouse line. *Genesis* 30, 36-40.

**Copeland, P. R., Fletcher, J. E., Carlson, B. A., Hatfield, D. L., and Driscoll D. M.** (2000). A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. *EMBO J.* 19, 306-314.

**Croteau, W., Whittemore, S. K., Schneider, M. J., and Germain, G. L.** (1995). Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase. *J. Biol. Chem.* 270, 16569-16575.

## D

**Davey, J. C., Becker, K. B., Schneider, M. J., Germain, G. L., and Galton, V. A.** (1995). Cloning of a cDNA for the type II iodothyronine deiodinase. *J. Biol. Chem.* 270, 26786-26789.

**Diplock, A. T.** (1987). Trace elements in human health with special reference to selenium. *Am. J. Clin. Nutr.* 45, 1313-1322.

**Dumont, J. E., Corvilain, B., and Contempre, B.** (1994). The biochemistry of endemic cretenism. Roles of iodine and selenium deficiency and goitrogens. *Mol. Cell. Endocrinol.* 100, 163-166.

## E

**Eddy, E. M., Washburn, T. F., Bunch, D. O., Goulding, E. H., Gladen, B. C., Lubahn, D. B., and Korach, H. S.** (1996). Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology.* 137, 4796-4805.

**Esworthy, R. S., Doan, K., Doroshov, J. H., and Chu, F. F.** (1994). Cloning and sequencing of the cDNA encoding a human testis phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Gene* 144, 317-318.

**Esworthy, R. S., Mann, J. R., Sam, M., and Chu, F. F.** (2000). Low glutathione peroxidase activity in GPx1 knock out mice protects jejunum crypts from  $\gamma$ -irradiation damage. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G426-G436.

## F

**Fagegaltier, D., Hubert, N., Yamada, K., Mizutani, T., Carbon, P., and Krol, A.** (2000). Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation. *EMBO J.* 19, 4796-4805.

**Falconer, D. S., and Avery, P. J.** (1978). Variability of chimera and mosaics. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 43, 195-219.

**Falk, M. H., Hultner, L., Milner, A., Gregory C. D., and Bornkamm G. W.** (1993). Irradiated fibroblasts protect Burkitt lymphoma cells from apoptosis by a mechanism independent of bcl-2. *Int. J. Cancer* 55, 485-491.

**Falk, M. H., Meier, T., Issels, R. D., Brielmeier, M., Scheffer, B., and Bornkamm, G. W.** (1998). Apoptosis in Burkitt Lymphoma cells is prevented by promotion of cysteine uptake. *Int. J. Cancer.* 75, 620-625.

**Fawcett, D. W.** (1993). Male reproductive system, In: A textbook of histology, 12<sup>th</sup> edition. Chapman & Hall, New York.

**Fedorov, I. M., Haegel-Kronenberger, H., and Hirchenhain, J.** (1997). A comparison of the germline potential of differently aged ES cell lines and their transfected descendants. *Transgenic Res.* 6, 223-231.

**Feinberg, A. P., and Vogelstein, B.** (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclear fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13.

**Fisher, A. B., Dodia, C., Manevich, Y., Chen, J.-W., and Feinstein, S., I.** (1999). Phospholipid hydroperoxides are substrates for non-selenium glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 274, 21326-21334.

**Flohé, L., Günzler, E. A., and Schock, H. H.** (1973). Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* 32, 132-134.

**Forchhammer, K., Leinfelder, W., and Böck, A.** (1989). Identification of a novel translation factor necessary for incorporation of selenocysteine into protein. *Nature* 342, 453-456.

**Franke, K. W.** (1934). A new toxicant occurring naturally in certain samples of plant foodstuffs. II. The occurrence of the toxicant in the protein fraction. *J. Nutr.* 8, 597-608.

## G

**Gallegos, A., Berggren, M., Gasdaska, J. R., and Powis G.** (1997). Mechanism of the regulation of thioredoxin reductase activity in cancer cells by the chemopreventive agent selenium. *Cancer Res.* 57, 4965-4970.

**Gasdaska, J. R., Harney, J. W., Gasdaska, P. Y., Powis, G., and Berry, M. J.** (1999). Regulation of human thioredoxin reductase expression and activity by 3'-untranslated region selenocysteine insertion sequence and mRNA instability elements. *J. Biol. Chem.* 274, 25379-25385.

**Gladyshev, V. M., Jeang, K. T., Wootton, J. C., and Hatfield, D. L.** (1998). A new selenium-containing protein. *J. Biol. Chem.* 273, 8910-8915.



**Godeas C., Tramer, F., Micalli F., Roveri, A., Maiorino, M., Nisii, C., Sandri, G., and Panfili, E.** (1996). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) in rat testis nuclei is bound to chromatin. *Biochem. Mol. Med.* 59, 118-124.

**Godeas, C., Tramer, F., Micali, F., Soranzo, M., Sandri, G., and Panfili, E.** (1997). Distribution and possible role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 57, 1502-1508.

**Gogos, J. A., Morgan, M., Luine, V., Santha, M., Ogawa, S., Pfaff, D., and Karayiorgou, M.** (1998). Catechol-o-methyltransferase-deficient mice exhibit sexually dimorphic changes in catecholamine levels and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9991-9996.

**Gromer, S., Wissing, J., Behne, D., Ashman, K., Schirmer, R. H., and Flohé, L., and Becker, K.** (1998). A hypothesis on the catalytic mechanism of the selenoenzyme thioredoxin reductase. *Biochem. J.* 332, 591-592.

**Guimaraes, M. J., Peterson, D., Vicari, A., Cocks, B. G., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Ferrick, D. A., Kastalein, R. A., Bazan, J. F., and Zlotnik, A.** (1996). Identification of a novel selD homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 15086-15091.

## H

**Heider, J., Baron, C., and Böck, A.** (1992). Coding from a distance: dissection of the mRNA determinants required for the incorporation of selenocysteine into protein. *EMBO J.* 11, 3759-3766.

**Holmgren, A.** (1979). Reduction of disulfides by thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 254, 9113-9119.

**Holmgren, A., and Björnstedt, M.** (1995). Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzym.* 252, 199-208.

**Ho, Y. S., Magnenat, J. I., Bronson, R. T., Cao, J., Gargano, M., Sugawara, M., and Funk, C. D.** (1997). Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normal and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J. Biol. Chem.* 272, 16644-16651.

**Holmgren, A., and Aslund A.** (1995). Glutaredoxin. *Methods Enzymol.* 252, 283-292.

**Honarpour, N., Du, C., Richardson, J. A., Hammer, R. E., Wang, X., and Herz, J.** (2000). Adult Apaf-1-deficient mice exhibit male infertility. *Dev. Biol.* 218, 248-258.

**Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S., and Monk, M.** (1987). HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* 326, 292-295.

**Hurst, R., Bao, Y., Jemth, P., Mannervik, B., and Williamson, G.** (1998). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferase. *Biochem. J.* 332, 97-100.

## I

**Imai, H., Narashima, K., Arai, M., Sakamoto, H., Chiba, N., and Nakagawa, Y.** (1998). Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 273, 1990-1997.

**Imlay, J. A., and Linn, S.** (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240, 1302-1309.

**Ishii, T., Nakayama, K., Sato, H., Miura, K., Yamada, M., Sugita, Y., and Bannai S.** (1991). Expression of the mouse macrophage cystine transporter in *Xenopus laevis* oocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 289, 71-75.

## K

**Koji, T., Hishikawa, Y., Ando, H., Nakanishi, Y., and Kobayashi, N.** (2001). Expression of Fas and Fas ligand in normal and ischemia-reperfusion testes: involvement of the Fas system in the induction of germ cell apoptosis in the damaged mouse testis. *Biol. Reprod.* 64, 946-954.

**Kosower, N. S., Katayose, H., and Yanagimachi, R.** (1992). Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J. Androl.* 13, 342-348.

**Köhrle, J.** (1999). The trace element selenium and the thyroid gland. *Biochimie* 81, 527-533.

**Köhrle, J.** (2000). The selenoenzyme family of deiodinase isoenzymes controls local thyroid hormone availability. *Rev. Endocrine Metabol. Dis.* 1, 49-58.

**Kryukov, G. V., Kryukov, V. M., and Gladyshev V.** (1999) New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements. *J. Biol. Chem.* 274, 33888-33897.

**Kühn, R., Schwenk, F., Aguet, M., and Rajewsky, K.** (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science* 296, 1427-1429.

## L

**Lander, H. M.** (1997). An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.* 11, 118-124.

**Laurent, T. C., Moore, E. C., and Reichard, P.** (1967). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides VI. Isolation and characterisation of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* 239, 3436-3444.

**Lee, S. R., Kim, J.-R., Kwon, K.-S., Yoon, H. W., Levine, R. L., Ginsburg, A., and Rhee, S. G.** (1999). Molecular cloning and characterization of a mitochondrial selenocysteine-containing thioredoxin reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 274, 4722-4734.

**Leinfelder, W., Zehelein, E., Mandrand-Berthelot, M. A., Böck, A.** (1988). Gene for novel tRNA species that cotranslationally inserts selenocysteine. *Nature* 31, 723-725.

**Lescure, A., Gautheret, D., Carbon, P., and Krol A.** (1999). Novel selenoproteins identified in silico and in vivo by using a conserved RNA structural motif. *J. Biol. Chem.* 274, 38147-38154.

**Li, Y., Huang, T.-T., Carlson, E. J., Melov, S., Ursell, P. C., Olson, J. L., Noble, L. J., Yoshimura, M. P., Berger, C., Chan, P. H., Wallace, D., C., and Epstein, C. J.** (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nature Genet.* 11, 376-381.

**Lindahl, T.** (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709-715.

**Litov, R. E., and Combs, G. F.** (1991). Selenium in pediatric nutrition. *Pediatrics* 87, 339-351.

**Longo, L., Bygrave, A., Grosveld, F. G., and Pandolfi, P. P.** (1997). The chromosome make-up is predictive of somatic and germ cell chimaerism. *Transgenic Res.* 6, 321-318.

## M

**Maiorino, M., Aumann, K. D., Brigelius-Flohé, R., Doria, D., Van Den Heuvel, J., Mc Carth, J., Roveri, A., Ursini, F., and Flohe, L.** (1995). Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biological Chemistry Hoppe Seyler* 376, 651-660.

- Maiorino, M., Coassin, M., Roveri, A., and Ursini, F.** (1989). Microsomal lipid peroxidation: effect of vitamin E and its functional interactions with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Lipids*. 24, 721-726.
- Maiorino, M., Gregolin, C., and Ursini, F.** (1990). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Methods Enzym.* 186, 448-457.
- Maiorino, M., Wissing, J. B., Brigelius-Flohé, R., Calabrese, F., Roveri, A., Steinert, P., Ursini, F., and Flohé L.** (1998). Testosterone mediates expression of the selenoprotein PHGPx by induction of spermatogenesis and not by direct transcriptional gene activation. *FASEB J.* 1359-1370.
- Makropoulos, V., Bruning, T., and Schulze-Osthoff, K.** (1996). Selenium-mediated inhibition of transcription factor NF-kappa B and HIV-1 LTR promoter activity. *Arch. Toxicol.* 70, 277-283.
- Mansour, S. I., Thomas, K. R., and Capecchi, M. R.** (1988). Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336, 348-352.
- Matsui, M., Oshima, M., Oshima, H., Takuku, K., Maryama, T., Yodoi, J., and Taketo, M. M.** (1996). Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev. Biol.* 178, 179-185.
- May, J. M., Mendiratta, S., Hill, K. E., and Burk, R. F.** (1997). Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* 272, 22607-22610.
- Michels, C., Raes, M., Toussant, O., and Remacle, J.** (1994). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* 17, 235-248.
- Mills, G. C.** (1957). Hemoglobin catabolism I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* 229, 189-197.
- Miranda-Vizuete, A., Damdimopoulos, A. E., Pedrajas, J. R., Gustafsson, J.-A., and Spyrou, G.** (1999 a). Human mitochondrial thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* 261, 405-412.
- Miranda-Vizuete, A., Damdimopoulos, A. E., and Spyrou, G.** (1999 b). cDNA cloning, expression and chromosomal localization of the mouse mitochondrial thioredoxin reductase gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1447, 113-118.
- Moore, E. C.** (1967). A thioredoxin-thioredoxin reductase system from rat tumor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29, 264-268.
- Moreau, J.-F., Donaldson, D. D., Bennett, F., Witek-Giannotti, J., Clark, S. C., and Wong, G. G.** (1988). Leukaemia inhibitory factor is identical to the myeloid growth factor human interleukin for DA cells. *Nature* 336, 690-692.
- Mostert, V.** (2000). Selenoprotein P: properties, functions, and regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* 376, 433-438.
- Mostert, V., Dreher, I., Köhrle, J., and Abel, J.** (1999). Transforming growth factor  $\beta$  inhibits expression of selenoprotein P in cultured human liver cells. *FEBS Lett.* 460, 23-26.
- Motsenbocker, M. A., and Tappel, A. L.** (1984). Effect of dietary selenium on plasma selenoprotein P, selenoprotein P1 and glutathione peroxidase in the rat. *J. Nutr.* 114, 279-285.
- Mustacich, D., and Powis, G.** (2000). Thioredoxin reductase. *Biochem. J.* 346, 1-8.

## N

**Nam, S.-Y., Fujisawa, M., Kim, J.-S., Kurohmaru, M., and Hayashi Y.** (1998). Expression pattern of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase messenger ribonucleic acid in mouse testis. *Biol. Reprod.* 58, 1272-1276.

## O

**Oakberg, E. F.** (1956). A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am. J. Anat.* 99, 391-413.

**O'Gorman, S., Dagenais, N.A., Qian, M., and Marchuk, Y.** (1997). Protamine-Cre recombinase transgenes efficiently recombine target sequences in the male germ line of mice, but not in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 14602-14607.

**Ohlenschläger, G.** (1995). *Freie Radikale, Oxidativer Stress und Antioxidantien*. Ralf Reglin Verlag, Köln.

**Orban, P. C., Chui, D., and Marth, J. D.** (1992). Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 6861-6865.

## P

**Pallini, V., and Bacci E.** (1979). Bull sperm selenium is bound to a structural protein of mitochondria. *J. Submicrol. Cytol.* 11, 165-170.

**Park, J. B., and Levine, M.** (1997). The human glutaredoxin gene: determination of its organization, transcription start point, and promoter analysis. *Gene* 197, 189-193.

**Pfeifer, H.** (1998). *Reinigung und Charakterisierung eines spermien-spezifischen Selenoproteins*. Dissertation, Berlin.

**Pfeifer, H., Conrad, M., Röthlein, D., Kyriakopoulos, A., Brielmeier, M., Bornkamm, G. W., and Behne, D.** (2001). Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J.* 15, 1236-1238.

**Pinsent, J.** (1954). The need for selenite and molybdate in the formation of formic dehydrogenase by members of the *Coli-aerogenes* group of bacteria. *Biochem. J.* 57, 10-16.

**Powis, G., Mustacich, D., and Coon, A.** (2000). The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. *Free Rad. Biol. Med.* 29, 312-322.

## Q

**Qin, J., Clore, G. M., Kennedy, W. P., Huth, J. R., and Gronenborn, A. M.** (1994). Solution structure of human thioredoxin in a mixed disulfide intermediate complex with its target peptide from the transcription factor NF $\kappa$ B. *Structure* 3, 289-297.

## R

**Rhee, S. G., Kang, S. W., Netto, L. E., Seo, M. S., and Stadtman, E. R.** (1999). A family of novel peroxidases, peroxiredoxins. *Biofactors* 10, 207-209.

**Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H., Swanson, A., Hafeman, D. G., and Hoekstra, W. G.** (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179, 588-590.

**Roveri, A., Casasco, A., Maiorino, M., Dalan, P., Calligaro, A., and Ursini, F.** (1992). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. *J. Biol. Chem.* 267, 6142-6146.

## S

- Saitoh, M., Nishitoh, H., Fuji, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., and Ichijo, H.** (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulated kinase (ASK) 1. *EMBO J.* 17, 2596-2606.
- Sakamoto H., Imai H., and Nakawaga Y.** (2000). Involvement of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the modulation of prostaglandin D<sub>2</sub> synthesis. *J. Biol. Chem.* 275, 40028-40035.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2. Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sato, H., Tamba, M., Ishii, T., and Bannai, S.** (1999). Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J. Biol. Chem.* 274, 11455-11458.
- Sattler, W., Maiorino, M., Mannervik, B., and Williamson, G.** (1994). Reduction of HDL- and LDL-associated cholesterylester and phospholipid hydroperoxides by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and ebselen (PZ51). *Arch. Biochem. Biophys.* 309, 214-221.
- Sauer B., and Hendersson, N.** (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 5166-5170.
- Schnurr, K., Belkner, J., Ursini, F., Schewe, T., and Kühn, 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, 4653-4658.
- Schwarz, K. and Folz, C. M.** (1957). Selenium as an integral part of factor 3 against necrotic liver degeneration. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3292.
- Schwenk, F., Baron, U., and Rajewsky, K.** (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res.* 25, 5080-5081.
- Smith, G. A., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M., and Rogers, D.** (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336, 688-690.
- Southern, E. M.** (1979). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Spyrou, G., Enmark, E., Miranda-Vizuete, A., and Gustafsson, J.** (1997). Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 272, 2936-2941.
- Stark, W. M., Boocock, M. R., and Sheratt, D. J.** (1992). Catalysis by site-specific recombinases. *Trends Genet.* 8, 432-439.
- Steinberg, D.** (1997). Low density lipoprotein oxidation and its pathological significance. *J. Biol. Chem.* 272, 20963-20966.
- Steiling, H., Munz, B., Werner, S., and Brauchle M.** (1999). Different types of ROS-scavenging enzymes are expressed during cutaneous wound repair. *Exp. Cell Res.* 247, 484-494.
- Sun, Q.-A., Wu, Y., Zappacosta, F., Jeang, K.-T., Lee, B. J., Hatfield, D. L., and Gladyshev V. N.** (1999). Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. *J. Biol. Chem.* 274, 24522-24530.
- Sun, Q. A., Kirnarsky, L., Sherman, S., Gladyshev, V. N.** (2001 a). Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 3673-3678.

**Sun, Q. A., Zappacosta, F., Factor, V., Wirth, P. J., Hatfield, D. L., and Gladyshev, V. N.** (2001 b). Heterogeneity within animal thioredoxin reductases: evidence for alternative first exon splicing. *J. Biol. Chem.* 276, 3106-3114.

**Suppmann, S., Persson, B. C., and Böck A.** (1999). Dynamics and efficiency *in vivo* of UGA-directed selenocysteine insertion at the ribosome. *EMBO J.* 18, 2284-2293.

## T

**Takagi, Y., Mitsui, A., Nishiyama, A., Nozaki, K., Sono, H., Gon, Y., Hashimoto, N., and Yodoi, J.** (1999). Overexpression of thioredoxin in transgenic mice attenuates focal ischemic brain damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 4131-4136.

**Tamura, T., and Stadtman, T. C.** (1996). A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties and thioredoxin reductase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 1006-1011.

**Taniguchi, M., Sanbo, M., Watanabe, S., Naruse, I., Mishina, M., and Yagi, T.** (1998). Efficient production of Cre-mediated site-directed recombinants through the utilization of the puromycin resistance gene, *pac*: a transient gene-integration marker for ES cells. *Nucleic Acids Res.* 26, 679-680.

**Takahashi, K., Avissar, N., Whitin, J., and Cohen, H.** (1987). Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 256, 677-686.

**Tejada, R. I., Mitchel, J. C., Norman A., Marik, J. J., and Friedman, S.** (1984). A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil. Steril.* 42, 87-91.

**Thomas, K. R., and Capecchi, M. R.** (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503-512.

**Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P. C., Bock, R., Klein, R., and Schütz, G.** (1999). Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nature Genet.* 23, 99-103.

**Tujebajeva, P., Copeland, P. R., Xu, X. M., Carlson, B. A., Harney, J. W., Driscoll, D. M., Hatfield, D. L., and Berry, M. J.** (2000). Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion. *EMBO J.* 19, 158-163.

**Turner, D. C., and Stadtman, T. C.** (1973). Purification of protein components of the clostridial glycine reductase system and characterisation of protein A as a selenoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.* 154, 366-381.

## U

**Ursini F., Heim S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., and Flohé, L.** (1999). Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* 285, 1393-1396.

**Ursini, F., Maiorino, M., and Roveri A.** (1997). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx): more than an antioxidant enzyme ? *Biomed. Env. Sci.* 10, 327-332.

**Ursini, F., Maiorino, M., Valente, M., Ferri, L., and Gregolin, C.** (1982). Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim. Biophys. Acta* 710, 197-211.

## V

**Vendeland, S. C., Beilstein, M. A., Yeh, J. Y., Ream, W., and Whanger, P. D.** (1995). Rat skeletal muscle selenoprotein W: cDNA clone and mRNA modulation by dietary selenium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 8749-8753.

**Voet, D., Voet, J. G.** (1992). *Biochemie*. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim.

**Wallace, E., Calvin, H. I., and Cooper, G. W.** (1983 a). Progressive defects observed in mouse sperm during the course of three generations of selenium deficiency. *Gamete Res.* 4, 377-387.

**Wallace E., Cooper, G. W., and Calvin H. L.** (1983 b). Effects of selenium deficiency on the shape and arrangement of rodent sperm mitochondria. *Gamete Res.* 4, 389-399.

**Warner, H. R.** (1994). Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. *Free Rad. Biol. Med.* 17, 249-258.

**Watanabe, T., and Endo, A.** (1991). Effects of selenium deficiency on sperm morphology and spermatocyte chromosomes in mice. *Mut. Res.* 262, 93-99.

**Weitzel, F., Ursini, F., and Wendel, A.** (1990). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in various organs during selenium deficiency and repletion. *Biochim. Biophys. Acta* 1036, 88-94.

**Weitzel, F., and Wendel, A.** (1993). Selenoenzymes regulate the activity of leukocyte 5-lipoxygenase via the peroxide tone. *J. Biol. Chem.* 268, 6288-6292.

**Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D. Nicola, N. A., and Gough, N. M.** (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336, 684-687.

**Wilting, R., Schorling, S., Persson, B. C., and Böck, A.** (1977). Selenoprotein synthesis in archaea: identification of an mRNA element of *Methanococcus jannaschii* probably directing selenocysteine insertion. *J. Mol. Biol.* 266, 637-641.

**Wingler, K., Böcher, M., Flohé, L., Kollmus, H., and Brigelius-Flohé, R.** (2000). mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins. *Eur. J. Biochem.* 259, 149-157.

**Wu, J. Y., Ribar, T. J., Cummings, D. E., Burton, K. A., McKnight, G. S., and Means, A. R.** (2000). Spermiogenesis and exchange of basic nuclear proteins are impaired in male germ cells lacking camk4. *Nat. Genet.* 25, 448-452.

## Y

**Yang, J. G., Morrison Plummer, J., and Burk, R. F.** (1987). Purification and quantitation of a rat plasma selenoprotein distinct from glutathione peroxidase using monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* 262, 13372-13375.

## Z

**Zhong, I., and Holmgren, A.** (2000). Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterisation of recombinant enzymes with selenocysteine mutations. *J. Biol. Chem.* 275, 18121-18128.

**Zhong, L., Arnér, E. S. J., Ljung, J., Aslund, F., and Holmgren A.** (1998). Rat and calf thioredoxin reductase are homologous to glutathione reductase with a carboxy-terminal elongation containing a conserved catalytically active penultimate selenocysteine residue. *J. Biol. Chem.* 273, 8581-8591.

**Zinioni, F., Birkmann, A., Stadtman, T. C., and Böck, A.** (1986). Nucleotide sequence and expression of selenocysteine-containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogenlyase-linked) from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 4650-4654.

## 8. Anhang

### A Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary</i> DNA
Ci	Curie
CTP	Cytidintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure
dNTP	3'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
DPM	Zerfälle pro Minute
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
FAD	Flavinadenindinucleotid
FKS	Fötales Kälberserum
G	Guanosin
GSH	Glutathion
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraensäure
kBp	Kilobasenpaar(e)
kD	Kilodalton
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
PBS	Phosphat-gepuffertes Natriumchlorid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SECIS	<u><i>Selenocysteine Insertion Sequence</i></u>
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer



---

T	Thymidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	$\alpha, \alpha, \alpha$ -Tris-(hydroxymethyl)methylamin
tRNA	Transfer-RNA
UV	ultraviolett
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
wt	Wildtyp

**B Lebenslauf**

Marcus Conrad  
geboren am 13. Juli 1970 in Pfullendorf

Schulbildung

1976-1980            Grundschule Bingen  
1980-1989            Hohenzollern Gymnasium Sigmaringen, Abschluß: Abitur

Zivildienst

1989-1990            DRK Sigmaringen

Hochschulstudium

1991-1992            Studium Gartenbau an der TU München  
1992-1994            Grundstudium Biologie-Diplom an der Universität Konstanz  
1994                    Vordiplom in Biologie  
1994-1997            Hauptstudium Biologie-Diplom an der Universität Konstanz  
1997-1998            Diplomarbeit an der Universität Konstanz, Fakultät für Biologie,  
PD Dr. R. Mutzel:  
„Thymidylat-Synthase als Modellenzym für molekulare  
Adaptation an hochosmolare Umwelt“  
1998                    Diplom in Biologie

Promotion

1998-2001:    GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, München,  
Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik,  
Prof. Dr. G. W. Bornkamm:  
„Etablierung von Mausstämmen defizient für die Selenoproteine  
mitochondriale Thioredoxin-Reduktase und Phospholipid-Hydroperoxid-  
Glutathion-Peroxidase (PHGPx) und Charakterisierung einer  
Spermienkern-spezifischen Form der PHGPx“

## **C Publikationen**

**Brielmeier, M., Béchet, J.-M., Suppmann, S., Conrad, M., Laux, G., and Bornkamm G. W.** (2001). Cloning of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase as an antiapoptotic and growth promoting gene of Burkitt lymphoma cells. *Biofactors* 14, 179-190.

**Pfeifer, H., Conrad, M., Röthlein, D., Kyriakopoulos, A., Brielmeier, M., Bornkamm, G. W., and Behne, D.** (2001). Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J.* 15, 1236-1238.

## **D Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen herzlichst bedanken, die mich während meiner dreijährigen Arbeit unterstützten:

Prof. Dr. G. W. Bornkamm für sein überaus großes Interesse an der Arbeit, seine ständige Diskussionsbereitschaft und für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik.

Prof. Dr. Dirk Eick für die Bereitschaft der Betreuung meiner Arbeit und sein Einsatz für andere Anliegen.

Dr. Markus Brielmeier für seine Betreuung und seine große Hilfe.

Dr. Wolfgang Wurst für die tolle Kooperation, die fruchtbaren Diskussionen und seine motivierenden Worte.

Dr. Dr. Ullrich Heinzmann, Cemile Jakupoglou, Dr. Henning Pfeifer und Isabell Jentsch für die angenehme Zusammenarbeit.

Rob Chapman, Stefan Gramlich, Ute Schultheiß, Dr. Marino Schumacher, Andreas Weiß, Markus Münz und Martina Angele für Alles (inner- und) außerhalb des Instituts....

Dr. Gerhard Laux für seine Hilfsbereitschaft, Dr. Jean-Marie Béchet für seine „französische“ Art und den Leuten von der Kaffeerrunde.

Dr. Sabine Suppmann nicht nur für das kritische Lesen meiner Arbeit, Dr. Marius Ueffing für seine Tips und die angenehme Atmosphäre im Keller.

Den Mitarbeitern von der Spül- und Medienküche, besonders den Mitarbeitern im ES-Zelllabor und von der Blastozysteninjektionseinheit und den Tierpflegern für ihren großen Einsatz.