

**Aus dem Helmholtz Zentrum München
Institut für Entwicklungsgenetik (IDG)**

(Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Wurst)

Untersuchungen zur Rolle der Glutathion- Peroxidase 4 als möglicher Redox-Sensor in Säugetierzellen

Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von

Nadine Grünler

aus

Gera

2015



**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ulrich Hoffmann

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Anton Eberharter

Prof. Dr. Christian P. Sommerhoff

Prof. Dr. Kirsten Lauber

Mitbetreuung durch den

promovierte Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Marcus Conrad

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FCRC

Tag der mündlichen Prüfung : 07.05.2015

Gewidmet

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1. Selenocystein und Selenoproteine	1
1.2 Glutathionperoxidasen- Ein Überblick	2
1.3 Katalyse und strukturelle Eigenschaften der Glutathionperoxidasen	7
1.3.1 Proteinthiolperoxidase-Funktion	11
1.4 Zelluläre Funktionen der GPx4	12
1.4.1 Allgemein	12
1.4.2 Zytosolische Form der GPx4 - cGPx4	12
1.4.3 Mitochondriale Form der GPx4 - mGPx4	13
1.4.4 Nukleäre Form - nGPx4	14
1.5 Physiologische Funktionen der GPx4	14
1.5.1 Allgemein	14
1.5.2 Zytosolische Form – cGPx4	16
1.5.3 Mitochondriale Form - mGPx4	16
1.5.4 Nukleäre Form - nGPx4	18
1.6 Transgene Mausmodelle	19
1.6.1 <i>Thioredoxin-Reduktase</i> Knockout-Modelle	19
1.6.2 <i>GPx4</i> -Knockout- Modelle	20
1.7 Signalwege	21
1.7.1 GPx4 kontrolliert einen Lipoxygenase-abhängigen Zelltod-Signalweg	22
1.7.2 Lipidperoxide kontrollieren die Signaltransduktion von Rezeptortyrosinkinasen	24
1.7.3 Die Hefe-GPx3 fungiert als Redox-Sensor	26

2. Material und Methoden	27
2.1. Materialien	27
2.1.1 Antikörper	27
2.1.2 Chemikalien	30
2.1.3 Zellkulturreagenzien	33
2.1.4 Verbrauchsmaterialien	33
2.1.5 Geräte	34
2.1.6 Zelllinien	34
2.2. Methoden	36
2.2.1. Zellkultur und verwandte Methoden	36
2.2.2. Proteinaufreinigung	37
2.2.3. Proteinanalyse	39
2.2.4 Aufbereitung der Proben für die Massenspektrometrie	41
2.2.5 Massenspektrometrie	42
3. Ergebnisse	44
3.1 Ein Blick auf die Methoden	44
3.1.1 Prinzip der Proteinaufreinigung von Flag-Strep-getaggten Proteinen	44
3.1.2 Aufreinigung von GPx4 Interaktionspartnern unter physiologischen Bedingungen und unter oxidativem Stress	49
3.1.3 Aufreinigung von GPx4 Interaktionspartnern unter Aufhebung von Disulfid- und Selenylsulfidbindungen	53
3.2 Analyse von GPx4 Interaktionspartner durch die <i>Liquid chromatography</i>/Massenspektrometrie	55
3.3 Bestätigung der GPx4 Interaktionspartner mittels co-Immunpräzipitation	58
3.3.1 Peroxiredoxine	59
3.3.2 Regulatoren apoptotischer und nicht-apoptotischer Zelltodsignalwege	63

4. Diskussion	66
4.1 GPx4 als Redoxsensor mit Thiolperoxidasefunktion	66
4.2. Das TAP Verfahren als geeignete Methode an GPx4 assoziierte Proteine zu identifizieren	68
4.3. GPx4 und mögliche Interaktionspartner bei Glutathiondepletion	70
4.3.1 An GPx4 assoziierte Proteine werden unter oxidativem Stress stärker exprimiert	70
4.3.2. An GPx4 assoziierte Proteine von thiolabhängigen antioxidativen Systemen	72
4.3.3 Peroxiredoxine als mögliche Targets für die Thiolperoxidaseaktivität der GPx4	74
4.3.4 Interaktion der GPx4 mit Zelltod-regulierenden Proteinen	74
5 Literaturverzeichnis	79
6 Anhang	95
6.1 Abkürzungsverzeichnis	95
6.2 Tabelle A	98
6.3 Abbildungsverzeichnis	101
7 Zusammenfassung	102
8 Danksagung	104
9 Eidesstattliche Versicherung	105

1 Einleitung

1.1 Selenocystein und Selenoproteine

Selenocystein (Sec) ist die 21. proteinogene Aminosäure, die in der Regel ein essenzieller Bestandteil von Selenoproteinen darstellt. Selenoproteine sind fast ausschließlich Oxidoreduktasen, die ubiquitär in vielen Organismen wie Bakterien, Fischen und Säugern vorzufinden sind. Allerdings ist Sec in der Evolution in den meisten Fällen in homologen Enzymen derselben oder auch anderer Spezies durch Cystein (Cys) ersetzt worden, das anstatt des Selens Schwefel enthält (Fomenko et al., 2008).

Die Sec-Synthese und der ko-translationale Einbau in Proteine ist komplexer, damit energetisch ungünstiger und unterscheidet sich prinzipiell im Vergleich zur Synthese und dem Einbau von Cys und anderer Aminosäuren (Allmang et al., 2009; Suppmann et al., 1999). Sec-tRibonukleinsäure (Sec-tRNS) entsteht aus Serin (Ser)-tRNS mithilfe der Selenocysteyl-tRNS-Synthetase, indem Selenophosphat eingefügt wird. In der 3'-untranslatierten Region der mRNA des Selenoproteins befindet sich eine Sekundärstruktur der mRNA, das SECIS-Element („*Sec insertion sequence element*“). Mithilfe dieses Elements sowie des SECIS bindenden Proteins 2 (SBP2), dem ribosomalen Protein L20 (rpL20) und dem Elongationsfaktor eEFSec wird das UGA Kodon nicht als Stopp Kodon sondern als Sec Kodon erkannt, wodurch Sec in das Protein eingebaut wird (Caban and Copeland, 2006; Hatfield et al., 2014). Dass Selenoproteine eine wichtige Rolle im Organismus von Säugern spielen, zeigten bereits Bosl und Kollegen, da der ubiquitäre Knockout des Sec-tRNS Gens *Trsp* in Mäusen zu früher embryonaler Letalität noch vor der Gastrulation führt (Bosl et al., 1997).

Durch Selenmarkierungsexperimente in Säugern wurde geschlussfolgert, dass in Säugern mindestens 30 bis 50 verschiedene Selenoproteine vorkommen (Behne et al., 1996). Im menschlichen Genom konnten allerdings nur 25 Gene, in der Maus 24 Gene identifiziert werden, worauf man auf alternatives Splicing als Grund für die Vielfalt an Selenoproteinen schließt (Kryukov et al., 2003). Von dieser Vielzahl an Proteinen werden aktuell nur drei als essentiell für die embryonale Entwicklung angesehen: die zytosolische Form der Glutathion-Peroxidase 4 (GPx4) (Imai et al., 2003; Liang et al., 2009; Yant et al., 2003), die zytosolische Thioredoxin-Reduktase (Txnrd1) und die mitochondriale Thioredoxin-

Reduktase (Txnrd2) (Conrad et al., 2004; Imai et al., 2003; Jakupoglu et al., 2005; Yant et al., 2003).

1.2 Glutathionperoxidasen- Ein Überblick

Glutathionperoxidasen (GPxs) waren die ersten Selenoproteine, die entdeckt wurden. Dabei ist die GPx1 als der „klassische“ Vertreter aller GPxs das erste identifizierte Selenoprotein, welches in Erythrozyten H_2O_2 mithilfe von Glutathion (GSH) reduziert (Flohe et al., 1973; Rotruck et al., 1973; Ursini et al., 1985). Bis heute sind 8 GPxs in Säugern gefunden worden, von denen GPx1 bis GPx4 und GPx6 Selenoproteine beim Menschen sind (Kryukov et al., 2003). Die murine GPx6 enthält ein Cys statt eines Secs im aktiven Zentrum. GPx5, GPx7 und GPx8 sind sowohl bei der Maus als auch beim Menschen Cys-haltige Enzyme. Gpxs gehören zu einer Familie phylogenetisch verwandter Proteine und lassen sich evolutionär in drei Gruppen einteilen: GPx1/GPx2, GPx3/GPx5/GPx6 und GPx4/GPx7/GPx8 (Herbette et al., 2007; Margis et al., 2008; Mariotti et al., 2012; Toppo et al., 2008). GPx1 und 2 sind eine Untergruppe der tetrameren GPxs, zu denen außerdem GPx3, GPx5 und GPx6 gehören. Die GPx4 und die Cys-haltigen GPx7 und GPx8 haben einen gemeinsamen Vorläufer und sind monomere Enzyme.

GPx1, 2, 3, 5, und 6 reagieren vor allem mit löslichen Hydroperoxiden wie H_2O_2 und Peroxide in freien Fettsäuren und nutzen vorwiegend GSH als Reduktans. Neben den löslichen Hydroperoxiden reduziert die GPx4 aber auch Peroxide in Membranen (sogenannte Phospholipidhydroperoxide) und komplexe Peroxide wie Cholesterolhydroperoxide in LDLs (*Low density lipoproteins*). Die GPx4 ist bezüglich ihres Reduktans wenig wählerisch und nutzt neben GSH auch Proteinthiole und Cys als Elektronendonoren (Brigelius-Flohe and Maiorino, 2013). Die im ER (endoplasmatisches Retikulum) lokalisierten GPx7 und 8 zeigen ähnliche Reaktionsmuster wie die GPx4, allerdings ist über beide Isoenzyme nur sehr wenig bekannt, da sie erst kürzlich identifiziert wurden (Bosello-Travain et al., 2013; Nguyen et al., 2011).

Die katalytische Aktivität der GPx kann in einen peroxidativen und einen reduktiven Abschnitt eingeteilt werden. Im ersten Schritt wird das Hydroperoxid vom Sec bzw. Cys im aktiven Zentrum reduziert, wobei das aktive Zentrum selber oxidiert wird. Im zweiten Teil der Reaktion wird die katalytisch aktive Form des Enzyms wiederhergestellt, indem das oxidierte, aktive Zentrum in zwei reduzierenden Schritten regeneriert wird. Da bei den Cys-haltigen

GPxs noch ein zweites Cys („*resolving cysteine*“, C_R) am katalytischen Zyklus beteiligt ist, werden sie auch 2Cys-GPxs bezeichnet (Maiorino et al., 2007). Dies trifft allerdings nicht auf die GPx7 und 8 zu, bei denen an korrespondierender Stelle im Molekül kein entsprechendes Cys vorhanden ist (Nguyen et al., 2011).

GPx1 galt nach seiner Entdeckung (Flohe et al., 1973; Rotruck et al., 1973) klassischerweise als das Enzym, welches oxidativen Stress dank seiner Hydroperoxid-reduzierenden Funktion bekämpft. Trotz allem sind *GPx1* Knockout Mäuse lebensfähig (de Haan et al., 1998; Ho et al., 1997). Darüber hinaus konnte eine pro-inflammatorische Funktion bei LPS (Lipopolysaccharid)-induzierter Entzündungsreaktion nachgewiesen werden, indem sie die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine fördert (Bozinovski et al., 2012). Zudem löste eine Überexprimierung von *GPx1* in Mäusen Hyperglykämie, Hyperinsulinämie, Insulinresistenz und Adipositas aus (McClung et al., 2004), wohingegen Knockout Mäuse eine verstärkte Insulinsensitivität aufwiesen (Loh et al., 2009). In der Kanzerogenese scheint GPx1 eine ambivalente Rolle zu spielen: einerseits wurde beschrieben, dass GPx1 DNS (Desoxyribonukleinsäure)-Schäden verhindert (Baliga et al., 2007), andererseits wurde eine erhöhte Aktivität aber auch mit einer verstärkten vaskulären Invasion und kürzerer Überlebenszeit in hepatozellulären Karzinomzellen korreliert (Huang et al., 2012).

GPx2 wird hauptsächlich im Gastrointestinaltrakt und beim Menschen auch in der Leber exprimiert (Chu et al., 1993). Die höchste Proteinkonzentration wurde an der Basis der Darm-Krypten beschrieben (Florian et al., 2001), wo sich die proliferierenden Stammzellen der Mukosa befinden. Stammzellen werden wiederum durch den Wnt-Signalweg reguliert (Pinto et al., 2003) - wie auch GPx1 selbst (Kipp et al., 2007; Kipp et al., 2012) - was auf eine wichtige Rolle in der mukosalen Homöostase hinweist. Auch die Hochregulierung der *GPx2* in Kolonkarzinomzellen deutet auf eine Verbindung zum Wnt-Signalweg hin, dessen konstitutive Aktivierung bekanntermaßen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des Kolonkarzinoms spielt (Al-Taie et al., 2004; Chiu et al., 2005; Florian et al., 2010; Mork et al., 2000). Bei *GPx2* Knockout Mäusen wurde dementsprechend eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen in den Kolonkrypten detektiert bei gleichzeitiger Hochregulierung der *GPx1*, was als Kompensation bezüglich des *GPx2* Knockouts zu deuten ist (Florian et al., 2010). Desweiteren besitzt GPx2 eine anti-inflammatorische Rolle. Bei Knockout Zellen konnte eine erhöhte Menge an Cyclooxygenase-2 (COX2) und PGE2 (Prostaglandin E2) festgestellt werden (Banning et al., 2008). Der gleichzeitige Knockout von *GPx1* und *GPx2* in Mäusen führt zur chronischen Colitis (Esworthy et al., 2001), die allerdings verhindert werden kann, wenn zumindest ein Allel der *GPx2* vorhanden ist (Esworthy et al., 2005).

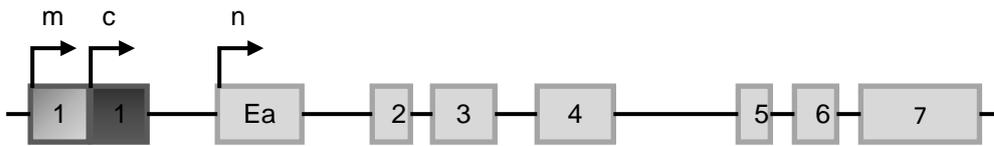
GPx3 zusammen mit Selenoprotein P enthalten 97% des Plasmaselens in Mäusen (Olson et al., 2010). Darüber hinaus kommt die GPx3 in anderen extrazellulären Flüssigkeiten wie in der Augenkammer, im Kolloidlumen der Schilddrüse (Kohrle, 2005; Schomburg and Kohrle, 2008), im Fettgewebe (Maeda et al., 1997) oder in der Amnionflüssigkeit vor (reviewed in (Brigelius-Flohe, 1999)). Gebildet wird sie im proximalen Tubulus der Niere, von wo sie basolateral ins Plasma sezerniert wird (Avisar et al., 1994; Whitin et al., 2002). Eine Ausnahme stellt der Nebenhoden dar, der GPx3 selbst exprimiert und ins Lumen sezerniert. Die Membranlokalisation unterstützt die Annahme, dass die GPx3 ein Regulator des extrazellulären Redoxgleichgewichts ist und somit dazu beiträgt, zwischen physiologisch relevanten und weniger relevanten Entzündungssignalen zu differenzieren (Brigelius-Flohe, 1999; Brigelius-Flohe and Maiorino, 2013). Beim Tumorgeschehen scheint die GPx3 eine kontroverse Rolle zu spielen: in vielen Tumorarten wird die GPx3 durch die epigenetische Hypermethylierung in der Promoterregion herunter reguliert, was mit einer schlechteren Prognose assoziiert wurde (Falck et al., 2010; He et al., 2011; Lee et al., 2005; Peng et al., 2009; Yu et al., 2007). Es wurde berichtet, dass die damit verbundene geringere Expression mit einer erhöhten Resistenz gegenüber einer Cisplatin-basierten Chemotherapie korreliert und mit einer kürzeren Überlebenszeit verbunden ist (Chen et al., 2011). Diese Beobachtung war unerwartet, da Cisplatin zu den Chemotherapeutika gehört, die, nachdem sie einen Redoxzyklus durchlaufen haben, ROS (*reactive oxygen species*) bilden, die zum Tod der Krebszellen führen. Man würde daher erwarten, dass der Mangel eines Enzyms, welches Hydroperoxide abbaut, die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber oxidativem Stress steigert (Chen et al., 2011). Es wird angenommen, dass die verminderte GPx3 Expression bei Adipositas zur allgemeinen Entzündungsreaktion, Oxidation und Adipositas-assoziierten metabolischen Komplikationen beiträgt. Tatsächlich wurden bei adipösen Mäusen geringere Mengen an GPx3 gefunden (Keaney et al., 2003), wie auch im Plasma von Maus und Mensch (Lee et al., 2008).

Die PHGPx (Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase) oder auch GPx4 wurde von Ursini und Kollegen in der Schweineleber als ein Enzym entdeckt, welches Biomembranen effizient vor schädlicher Lipidperoxidation schützt (Ursini et al., 1982). Sie unterscheidet sich von den anderen GPxs durch ihre monomere Struktur und ihr vielfältiges Substratspektrum (Aumann et al., 1997; Thomas et al., 1990). Neben H₂O₂ und kleineren Hydroperoxiden reagiert sie vor allem mit Phospholipidhydroperoxiden, Cholesterol- und Cholesterolesterhydroperoxiden in Biomembranen und Lipoproteinen. Als reduzierende Agentien akzeptiert sie nicht nur GSH, sondern bei niedrigen GSH-Konzentrationen auch Thiolgruppen von Cys und sogar von Proteinen, inklusive auch eigener Thiol-Gruppen (Mauri et al., 2003; Ursini et al., 1999).

Es existieren drei verschiedene Isoformen der GPx4: eine zytosolische (cGPx4), eine mitochondriale (mGPx4) und eine nukleäre (nGPx4). Alle drei werden von einem Gen kodiert, das aus sieben klassischen Exons und einem Spermienkern-spezifischen Exon besteht (Abbildung. 1) (Brigelius-Flohe et al., 1994). Durch alternative Transkriptionsinitiation im ersten Exon wird entweder die mitochondriale (21 kDa) oder die cytosolische Form (19 kDa) exprimiert (Maiorino et al., 2003; Moreno et al., 2003). Ein alternatives Exon stellt den Transkriptionsstart für die nukleäre Form dar (34 kDa). Dieses alternative Exon kodiert für ein nukleäres Importsignal und einen Bereich, der reich an Argininen und Lysin ist und damit den Protaminen ähnelt (Pfeifer et al., 2001). *cGPx4* wird in allen Zellen exprimiert, während die *mGPx4* und *nGPx4* hauptsächlich im Hoden vorkommen (Pfeifer et al., 2001; Schneider et al., 2006).

Der Knockout des gesamten *GPx4* Gens zeigte, dass die GPx4 für die frühe embryonale Entwicklung essenziell ist (Imai et al., 2003; Yant et al., 2003). Daher wird für GPx4 eine entscheidende Funktion in der Regulierung des Zellzyklus und des nicht-apoptotischen Zelltods über verschiedene Signalwege angenommen. Hinzu kommt ihre zentrale und essenzielle Funktion in der Aufrechterhaltung des zellulären Redoxgleichgewichts und in der männlichen Fertilität. Aufgrund ihrer besonderen Bedeutung für diese Arbeit wird auf die Funktionen der GPx4 in den folgenden Kapiteln noch genauer eingegangen.

A



B

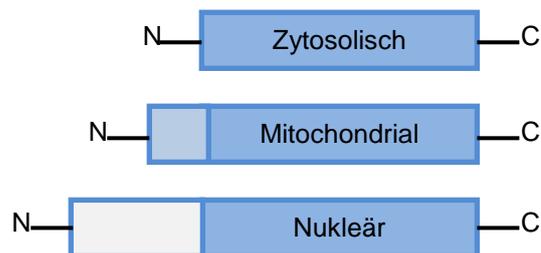


Abb. 1. GPx4 Gen und Protein Das *GPx4* Gen besteht aus insgesamt 8 Exons (A). Alternative Transkriptionsinitiation vor bzw. im ersten Exon führt entweder zur Expression der zytosolischen oder mitochondrialen Isoform. Durch den Transkriptionsstart am alternativen Exon (Ea) wird die nukleäre Form exprimiert. Pfeile markieren den Transkriptionsinitiiierungsbereich. Das Sec-Kodon UGA wird von Exon 3 kodiert und das SECIS-Element befindet sich auf Exon 7. (B) Die zytosolische, mitochondriale und nukleäre Formen unterscheiden sich in ihrer Größe und in ihren N-Termini.

Die GPx5 zusammen mit ihrem Homolog, die GPx3, machen etwa 95% der epididymalen GPx Proteinkonzentration aus (reviewed in (Brigelius-Flohe and Maiorino, 2013)). Die GPx5 ist sowohl im Lumen als auch im Epithel des Nebenhodens lokalisiert. Zudem ist die GPx5 am Spermienkopf während der Passage des Spermiums durch den Nebenhoden bis zum Erreichen des Vas deferens gebunden (Rejraji et al., 2002). Im Nebenhodenkopf reguliert die GPx5 das oxidative Milieu und trägt damit zur Aufrechterhaltung der Spermien DNS-Struktur bei (Chabory et al., 2009). Man nimmt an, dass sie die Peroxid-Konzentrationen reguliert, damit optimale Bedingungen für die Proteinthiolperoxidase-Funktion der nGPx4 vorliegen sowie toxische Mengen von ROS verhindert werden. Bei *GPx5* Knockout Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass die Expression der *GPx1*, *3* und *4* im Schwanz des Nebenhodens hochreguliert war, wohingegen die totale GPx-Aktivität unverändert war (Noblanc et al., 2012). Dies lässt auf eine Kompensation der fehlenden GPx5-Funktion durch die anderen GPxs schließen.

GPx6 ist ein Homolog der GPx3 und ein Selenoprotein beim Menschen (Kryukov et al., 2003). In Nagern und anderen Spezies besitzt sie hingegen ein Cys im aktiven Zentrum. Sie

wurde ursprünglich bei *in silico* Analysen von geruchsstoffbindenden und -metabolisierenden Enzymen gefunden (Dear et al., 1991). Bis auf eine Expression im Mausembryo (Kryukov et al., 2003) und in der Bowman-Drüse des olfaktorischen Systems (Dear et al., 1991) wurden noch keine weiteren Erkenntnisse zur *GPx6* gewonnen.

Die *GPx7* und *GPx8* sind beide Cys-haltige Monomere und wurden im ER nachgewiesen, was durch die Beschreibung eines ER-Retentionssignals unterstützt wird (Nguyen et al., 2011). Dabei wird angenommen, dass beide Enzyme eine wichtige Rolle bei der oxidativen Proteinfaltung durch Disulfidbrückenbildung spielen. Im ER werden die meisten Disulfide von Enzymen der Proteindisulfidisomerase (PDI)-Familie generiert, wofür die PDIs unter anderem die Unterstützung des „Oxidoreductin-1-Systems“ im Endoplasmatischen Retikulum (Ero1) benötigen. Die *GPx7* und *8* werden durch das von Ero1 gebildete H_2O_2 oxidiert, und können so die reduzierte PDI, die im Rahmen der Proteinfaltung im ER entsteht, wieder in ihre oxidierte Form überführen (Bosello-Travain et al., 2013). Die erste Knockout Studie für die *GPx7* konnte zeigen, dass die *GPx7* im ER als Sensor für oxidativen Stress fungiert und für die Chaperon-Aktivität des 78 kDa großen Glucose-regulierten Proteins (GRP78) benötigt wird (Wei et al., 2012). Der genetische Verlust der *GPx7* führte zu einem Phänotyp, der Pathologien wie Splenomegalie, Glomerulonephritis und ein erhöhtes Tumorrisiko zeigte. Da die *GPx8* den Verlust der *GPx7* nicht kompensieren konnte, geht man von einer einzigartigen Funktion beider Enzyme aus.

1.3 Katalyse und strukturelle Eigenschaften der Glutathionperoxidasen

Lange Zeit waren Häm-haltige Proteine die einzig bekannten Peroxidasen, die zur Reaktion mit Peroxiden ein Eisen-Ion nutzen (Flohe and Ursini, 2008). Mit der Entdeckung der *GPx1* im Jahre 1957 wurde eine neue Gruppe von Proteinen beschrieben, die Peroxide mithilfe von Selenol- bzw. Thiolgruppen reduzieren können, was dazu führte, dass neue Wege in der Redox-Forschung beschritten wurden (Mills, 1957).

Seleniumhaltige *GPxs* kommen auch in Nicht-Säugetieren vor, zum Beispiel im Fisch (Bell et al., 1984), in Vögeln (Omaye and Tappel, 1974) oder in parasitären Trematoden (Maiorino et al., 1996) und gelegentlich auch in Protisten und Bakterien (Gladyshev et al., 2006). Allerdings stellen die große Mehrheit der *GPxs* in Nicht-Vertebraten die Cys-

Homologen dar (Tosatto et al., 2008). Daher stellt sich die Frage, warum einige Organismen Sec im katalytischen Zentrum besitzen und andere wiederum Cys. Der Einbau von Sec ist, wie schon eingangs erwähnt, bei Weitem aufwändiger und energetisch ungünstiger als der Einbau von Cys (Allmang et al., 2009; Suppmann et al., 1999).

Anhand des Prototyps aller Gpxs, der GPx1, wurde von Toppo und Kollegen ein möglicher katalytischer Mechanismus vorgeschlagen, der eine Erklärung auf diese Frage liefert (Toppo et al., 2009).

Die durch die GPx katalysierte Reaktion ist folgende:



Dabei wird das Selenolat-Anion der GPx von einem Hydroperoxid oxidiert, um dann im zweiten Schritt unter Ausbildung einer Selenylsulfidbindung von GSH partiell reduziert zu werden. Im dritten Schritt wird das Enzym durch die Reaktion mit einem zweiten GSH Molekül vollständig regeneriert.

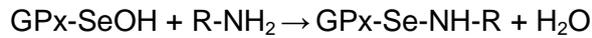
Die Reaktivität von Sec-GPxs ist sehr schnell und findet mit einer der höchsten Geschwindigkeiten statt, die für biochemische Reaktionen je beschrieben wurden. Nach der Michaelis-Menten-Hypothese entsteht ein Enzym-Substrat-Komplex, dessen Dissoziation der geschwindigkeitsbestimmende Schritt einer chemischen, katalysierten Reaktion ist. Dies trifft allerdings nicht auf die von der GPx katalysierte Reaktion zu, die als ein „ping-pong“-Mechanismus beschrieben wird (Flohe et al., 1972; Gunzler et al., 1972). Sollte ein Enzym-Substrat-Komplex gebildet werden, bestimmt dieser nicht die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, weshalb auch die kinetischen Parameter V_{\max} und K_m der von Sec-GPxs katalysierten Reaktion nicht bestimmt werden können und diese theoretisch unendliche Werte erreichen (Toppo et al., 2009).

Betrachtet man den Reaktionsmechanismus genauer, wird angenommen, dass Sec unter physiologischen Bedingungen dissoziiert vorliegt und im ersten Schritt zu Selenolsäure oxidiert wird (Flohe et al., 2011):

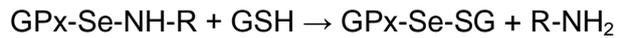


Die Selenolsäure ist sehr instabil und konnte trotz mehrerer Versuche noch nicht nachgewiesen werden. Tatsächlich ist der instabile Zustand anfällig für eine Überoxidation, was letztlich zu $-\text{SeO}_2\text{H}$ führen würde. Daher wird vermutet, dass die Selenolsäure mit einem benachbarten Amid oder Amin im katalytischen Zentrum reagiert. Theoretisch nachgewiesen wurde die Möglichkeit dieser Hypothese mit Ebselen (2-Phenyl-1,2-

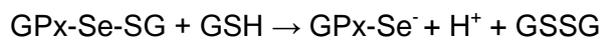
benzisoselenazol-3-(2H)-on), einem GPx-Imitator. In diesem reagiert die Selenolsäure mit einem Carboxamidnitrogen und bildet einen Ring. In diesem Selenazolion bleibt der Oxidationsstatus der Selenolsäure in Form einer Selenylamid-Bindung erhalten, die stabiler als die Säure selbst ist.



Die Se-N Bindung kann wiederum leicht von GSH gespalten werden.



Ein weiteres GSH-Molekül greift dann die Selenylsulfidbindung an, um das Enzym vollständig zu regenerieren.



Die Cys-haltigen GPxs enthalten neben dem peroxidativem Cys im aktiven Zentrum (C_P) noch ein zweites, konserviertes Cys, welches das oxidierte C_P reduziert, indem es eine intramolekulare Disulfidbrücke ausbildet (Maiorino et al., 2007; Toppo et al., 2008; Tosatto et al., 2008). Dieses Cys ist das schon erwähnte „*resolving cysteine*“ oder C_R . Gelöst wird die Disulfidbrücke durch die Reaktion mit einem Redoxin, meistens einem Thioredoxin (Trx). Interessanterweise zeigten Hofmann und Kollegen, dass die CysGPx von *Drosophila melanogaster* eine ähnlich effiziente Reaktion wie die GPx4 katalysiert (Hofmann et al., 2002). Man hatte angenommen, dass die Sec-katalysierte Reaktion viel effektiver ist als eine Cys-katalysierte Reaktion, da Selenolat sowohl nukleophiler als Thiolat ist als auch unter physiologischen pH Werten, dank des niedrigeren pKa-Wertes des Selenols, im Vergleich zu Thiol deprotoniert als Selenolat vorliegt (Arner, 2010; Hondal and Ruggles, 2011; Ursini and Bindoli, 1987). Diese Annahme wurde unterstützt von der Beobachtung, dass rekombinante Mutanten von Sec-GPxs, in denen das Sec zu Cys ersetzt wurde, einen starken Abfall der Reaktivität mit Hydroperoxiden zeigten (Kim et al., 1997; Maiorino et al., 1995; Rocher et al., 1992). Bei der Cys-Mutante der GPx4 handelte es sich beispielsweise um einen Aktivitätsabfall um das Tausendfache (Maiorino et al., 1995; Ursini et al., 1995).

Toppo und Kollegen nahmen also an, dass intramolekulare Wechselwirkungen mit dem katalytischen Zentrum für die hohe Reaktionsgeschwindigkeit verantwortlich sind (Toppo et al., 2009). Alle GPxs in Säugern teilen gemeinsame, konservierte Motive, die mit dem katalytischen Zentrum, das aus Sec, Trp, Gln und Arg besteht, auch katalytische Tetrade genannt, interagieren (Tosatto et al., 2008). Die gleiche Gruppe zeigte anhand eines Cys47-Schweinehomologs der GPx4, dass das Ersetzen des Trp136 und des Gln81 mit dem funktionell ähnlichen His zu einem Abfall der Geschwindigkeitskonstante k_{+1} und damit der Reaktionsgeschwindigkeit führte (Maiorino et al., 1995). Andere Berichte, in denen die

beiden Aminosäuren mutiert wurden, widerlegen hingegen diese Beobachtung und deuten zumindest daraufhin, dass noch andere Faktoren bei der Effizienz der katalytischen Aktivität eine Rolle spielen müssen (Jung et al., 2002; Koh et al., 2007). So fand man, dass das Asn136 ebenfalls zu einer hochkonservierten Peptidkette innerhalb des GPx Moleküls gehört, und deren Ersatz durch His oder Ala ebenfalls die κ_{+1} beeinträchtigt (Tosatto et al., 2008).

GPx1 und die anderen homotetrameren GPxs reduzieren bevorzugt lösliche Hydroperoxide und Lipidhydroperoxide, während GPx4 unter anderem komplexe Lipidhydroperoxide inklusive Phospholipidhydroperoxide zu reduzieren vermag (Ursini et al., 1995; Ursini et al., 1982). Diese Unterschiede in der Spezifität für oxidierte Substrate kann allerdings nicht an einer unterschiedlichen Struktur der Bindungstasche für Substrate und des katalytischen Zentrums liegen, da diese wie oben erwähnt in allen GPxs in Form der katalytischen Tetrade konserviert sind (Tosatto et al., 2008). Allerdings scheint die Molekülstruktur eine Rolle zu spielen (Toppo et al., 2009). In der GPx1 wird das reaktive Sec von vier Argininen und einem Lysin umgeben, die für die Bindung von GSH vermutet werden (Epp et al., 1983). Diese fünf Aminosäurereste gingen nach und nach in den anderen GPx Untergruppen verloren, was mit einer geringeren Spezifität für GSH einhergeht, wohingegen GPx4 keine dieser Aminosäuren an den entsprechenden Stellen besitzt (Flohe et al., 2011). Stattdessen wird vermutet, dass zwei Lysine (Lys48 und Lys125) in der GPx4 diese Aufgabe übernehmen und dafür verantwortlich sind, dass von der GPx4 Proteinthiole als Reduktans akzeptiert werden (Mauri et al., 2003; Roveri et al., 2001; Ursini et al., 1999). Gegenüber den tetrameren GPxs ist die hydrophobe Substratbindungstasche der GPx4 als Monomer besser zugänglich für größere Reaktionspartner, wodurch die breite Substratspezifität auch für das Oxidans erklärt werden könnte (Toppo et al., 2009). In beiden Molekülen gibt es einen positiv geladenen Bereich in der Nähe des katalytischen Secs, der zumindest teilweise an der Reaktivität des Sec und der Substratbindung beteiligt ist. Zusätzlich kommt in GPx4 noch ein weiterer positiv geladener Bereich vor, der bei der Bindung von Phospholipiden beteiligt sein könnte (Toppo et al., 2009).

1.3.1 Proteinthiolperoxidase-Funktion

Die GPx4 besitzt, wie schon erwähnt, im Gegensatz zu anderen bisher bekannten Enzymen der GPx-Familie eine breite Substratspezifität und akzeptiert nicht nur GSH sondern auch Thiole von Proteinen als Reduktans. Dabei konnte eine Proteinthiolperoxidase-Funktion beschrieben werden (Godeas et al., 1996; Maiorino et al., 2005b; Roveri et al., 1994), die zumindest in Spermien nachgewiesen wurde (Schneider et al., 2009). Zum einen oxidiert die nukleäre Form der GPx4 Proteinthiole von Protaminen im Chromatin von Spermien während der Keimzellreifung und trägt damit zur Chromatininstabilität bei reifenden Spermien bei (Conrad et al., 2005). Des Weiteren stellt die mitochondriale Form von GPx4 einen essenziellen Bestandteil der mitochondrialen Kapsel im Spermienmittelstück dar (Ursini et al., 1999), indem sie sich über Selenylsulfidbindungen und Disulfidbindungen mit Thiolgruppen anderer Proteine, wie zum Beispiel dem „*sperm mitochondria-associated Cys-rich protein*“ (Maiorino et al., 2005b) oder sogar mit sich selber quervernetzt und damit enzymatisch inaktiviert wird (Schneider et al., 2009; Ursini et al., 1999).

Abbildung 2 veranschaulicht den katalytischen Zyklus der GPx4.

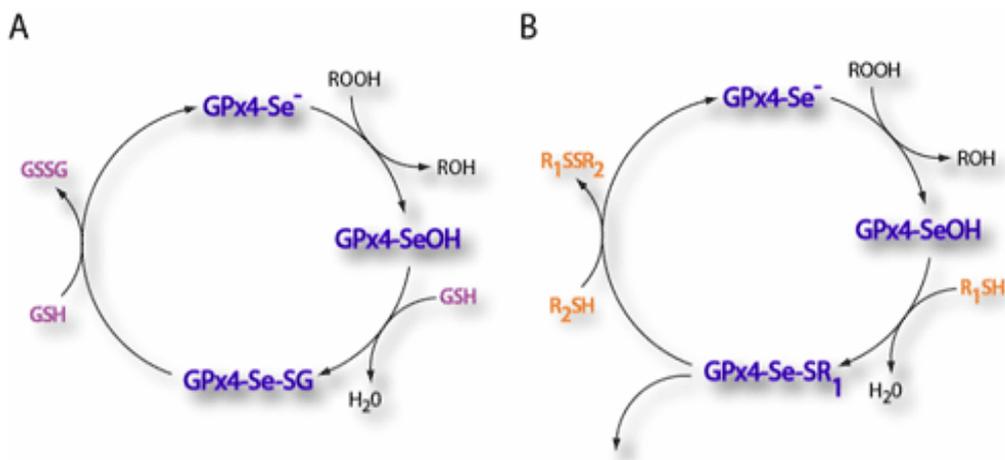


Abb. 2 Katalytischer Zyklus der GPx4. (A) Die GPx4 reduziert Hydroperoxide und wird mithilfe von zwei Molekülen GSH regeneriert. (B) Dank der Proteinthiolperoxidase-Funktion akzeptiert die GPx4 als reduzierendes Substrat Thiolgruppen anderer Proteine und möglicherweise sogar ihre eigenen Thiolgruppen. (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Marcus Conrad, Helmholtz Zentrum, München)

1.4 Zelluläre Funktionen der GPx4

1.4.1 Allgemein

Dank ihrer geringen Substratspezifität ist die GPx4 in der Lage, neben Hydroperoxiden und Lipidhydroperoxiden auch Phospholipidhydroperoxide in biologischen Membranen zu reduzieren (Ursini et al., 1982). Phospholipidhydroperoxide sind u. a. ein Merkmal für viele neurodegenerative Erkrankungen. Interessanterweise konnte eine reduzierte GPx4-Aktivität in Mausmodellen für die Alzheimer-Erkrankung nachgewiesen werden (Yoo et al., 2010). Zudem schützt die GPx4 Zellen vor verschiedenen apoptotischen Signalen. So sind Zellen, die die *GPx4* ektopisch überexprimieren, resistenter gegenüber Hydroperoxid-induzierten Schädigungen und anderen Stress-induzierenden Substanzen (reviewed in (Conrad et al., 2007)).

Eine wichtige Rolle spielt die GPx4 im Arachidonsäuremetabolismus: Banning und Kollegen stellten zum Beispiel fest, dass die GPx4 Hydroperoxid-Ester zu reduzieren vermag, die durch eine 15-Lipoxygenase-Aktivität entstanden waren (Banning et al., 2004). Dementsprechend hatte der Knockdown der *GPx4* einen gesteigerten Arachidonsäure-Metabolismus zur Folge, gemessen an erhöhten Aktivitäten der 12-Lipoxygenase und Cyclooxygenase-1 (Chen et al., 2003; Chen et al., 2000). Unser Labor konnte weiterhin zeigen, dass in *GPx4* Knockout Zellen sowohl die Aktivität der 12/15-Lipoxygenase als auch die Lipidperoxidation stark erhöht war, was letztlich zum verstärkten Zelltod führte (Seiler et al., 2008). Daraus lässt sich schließen, dass GPx4 eine entscheidende regulatorische Rolle im Arachidonsäuremetabolismus zukommt.

1.4.2 Zytoplasmatische Form der GPx4 - cGPx4

Experimente mit *GPx4* überexprimierenden RBL-2H3-Zellen belegten, dass die GPx4 vor oxidativem Stress und dem damit verbundenen Zelltod schützt (Arai et al., 1999; Liang et al., 2009), indem sie die Leukotrien-Bildung (Imai et al., 1998) und Prostaglandin D2 Produktion vermindert (Sakamoto et al., 2000). Zusätzlich verhindert sie die NFκB-Aktivierung, die durch oxidiertes LDL induzierte Proliferation und durch Linolsäure-induzierte Apoptose (Brigelius-

Flohe et al., 2000). Auch in Burkitt-Lymphom Zellen konnte nachgewiesen werden, dass die GPx4 den durch oxidativen Stress ausgelösten Zelltod verhindert (Brielmeier et al., 2001).

1.4.3 Mitochondriale Form der GPx4 - mGPx4

Durch Experimente mit einer verstärkten ektopischen Expression der *mGPx4* wurde angenommen, dass die mGPx4 eine wichtige antiapoptotische Funktion besitzt. So sind beispielsweise *mGPx4* überexprimierende RBL2H3-Zellen resistenter gegenüber Apoptose, die durch 2-Deoxyglucose, Etoposide, Staurosporine, UV-Strahlung, Cyclohexamide und Actinomycin D ausgelöst wird (Nomura et al., 1999). Besonders konnte dies auch gegenüber Inhibitoren der Atmungskette, wie Rotenon und KCN, gezeigt werden (Arai et al., 1999). Zusätzlich schützt die mGPx4 vor Apoptose, die durch Hyperglykämie (Imai et al., 2003) und Geranylgeraniksäure hervorgerufen wird (Shidoji et al., 2006). Experimente mit Brustkrebszelllinien konnten weiterhin zeigen, dass die mGPx4 das Ausmaß der durch Photosensitizer und Cholesterolhydroperoxiden induzierten Apoptose reduziert (Hurst et al., 2001; Wang et al., 2001).

Anhand von *mGPx4* spezifischen Knockout Mäusen konnte unser Labor jedoch beweisen, dass die mGPx4 vermutlich keine regulierende Funktion im Hinblick auf die Apoptose oder Proliferation in somatischen Zellen erfüllt (Schneider et al., 2009). In den Geweben von Testis, Gehirn, Herz, Niere, Leber, Milz und Nebenhoden wurden keine Unterschiede hinsichtlich mitotischer oder apoptotischer Raten zwischen den Wildtyp und Knockout Mäusen festgestellt. Auch die Sensitivität von *mGPx4* Knockout MEFs (murine embryonale Fibroblasten) gegenüber Oxidantien oder genotoxischen Stoffen war identisch mit Wildtyp Zellen. So scheint sich die Funktion von mGPx4 auf die Stabilisation der mitochondrialen Kapsel in den Spermienmittelstücken durch Proteinthioloxidation zu beschränken (Maiorino et al., 2005b; Schneider et al., 2009; Ursini et al., 1999). Dort ist sie katalytisch inaktiv und liegt über Selenylsulfid- oder Disulfidbrücken quervernetzt mit anderen Kapselproteinen vor. Es wird angenommen, dass diese Inaktivierung und letztlich Strukturfunktion durch die physiologisch induzierte GSH-Depletion während der Keimzellreifung zustande kommt (Shalgi et al., 1989), was wiederum die Proteinthiolperoxidase-Funktion der GPx4 begünstigt (Liang et al., 2009).

1.4.4 Nukleäre Form- nGPx4

Die nukleäre Form wird ausschließlich in Spermienköpfen von Spermatisden und in geringen Mengen in der Schwanzregion exprimiert (Conrad et al., 2005). In Spermienkernen trägt sie zur Chromatinstabilität bei, indem sie durch ihre Thiolperoxidase-Funktion intra- und intermolekulare Disulfidbindungen in Protamine einführt. Durch diese Disulfidbrücken werden die Protamine stark vernetzt, was das Chromatin widerstandsfähiger gegen mechanischen und chemischen Stress macht (Shalgi et al., 1989). Die Ausbildung von Disulfidbrücken im Spermienkern geschieht hauptsächlich zwischen Corpus und Cauda im Nebenhoden.

1.5 Physiologische Funktionen der GPx4

1.5.1 Allgemein

Mehrere Studien mit transgenen Mäusen zeigten unter anderem, dass Mäuse durch die Überexpression der *GPx4* besser vor oxidativem Stress geschützt sind (Ran et al., 2004), was mit der Funktion der GPx4 als einen wichtigen Regulator des Redoxgleichgewichts übereinstimmt (Conrad, 2009; Conrad et al., 2007).

Oxidativer Stress und Lipidperoxide werden unter anderem für endotheliale Dysfunktionen verantwortlich gemacht, die wiederum eine entscheidende Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen spielen. Die verstärkte GPx4 Expression in glatten Muskelzellen vermindert beispielsweise deren Proliferation, die durch oxidierte LDLs induziert wird (Brigelius-Flohe et al., 2000). Übereinstimmend damit verhindert die Überexpression der *GPx4* in *Apolipoprotein-E* Knockout Mäusen die Bildung von Arteriosklerose durch eine verringerte Lipidperoxidation (Guo et al., 2008). Endothel-spezifische konditionale Knockout Mäuse entwickelten überraschenderweise zunächst keinen Phänotyp (Wortmann et al., 2013). Kultivierte Aortenisolat aus diesen Mäusen zeigten allerdings eine verminderte Anzahl an Gefäßverzweigungen sowie eine reduzierte Länge der Gefäße, was allerdings durch Trolox-Zugabe - einem wasserlöslichen Vitamin-E Derivat- in das Zellkultur-Medium verhindert werden konnte. Als die Knockout Mäuse jedoch auf eine Vitamin-E Mangeldiät gesetzt wurden, starben sie innerhalb von drei Wochen und

entwickelten Paralysen durch Thrombenbildung und Einblutungen in verschiedenen Organen, wie dem Rückenmark, Myokard oder der Niere. Bei diesen Mäusen konnte auch eine Erhöhung der Lipidperoxidation in Form von erhöhten Plasma-Malondialdehydkonzentrationen festgestellt werden sowie ein Ablösen und Absterben der Endothelzellen von der Basalmembran der Gefäße. Diese Beobachtung spricht für eine entscheidende Rolle von GPx4 und Vitamin E in der Aufrechterhaltung der endothelialen Funktion.

Auch die Haut wird durch oxidativen Stress beeinflusst. Eine wichtige Rolle spielen daher antioxidative Enzyme und besonders Selenoproteine, wie der gezielte Knockout aller Selenoproteine in der Haut gezeigt hat: die Mäuse waren unterentwickelt in Bezug auf ihre Größe, zeigten Anomalitäten der Haut, Haarverlust und vorzeitigen Tod (Sengupta et al., 2010). Zusätzlich akkumulierten reaktive Sauerstoffspezies und Lipidperoxide. Die GPx4 und die Txnrd1 sind die am stärksten exprimierten Selenoproteine in der Haut. Allerdings zeigte sich bei dem Knockout des *Txnrd1*-Gens in der Haut kein Phänotyp, wohingegen der *GPx4* Knockout bei Mäusen zwei Wochen nach der Geburt Anomalitäten in der Haut ergab (Sengupta et al., 2013). Die Haut war zwar zum Zeitpunkt der Geburt noch normal, doch schon nach einer Woche zeigten die Knockout Mäuse im Gegensatz zur Kontrollgruppe noch keinen Haarwuchs. Auch in den folgenden Wochen war das Haarwachstum stark eingeschränkt, wobei sich Bereiche von Alopezie zeigten. Histologische Analysen ergaben falsch orientierte Haarfollikel mit einer Hyperplasie der äußeren Wurzelhülle und einem anormal geformten Haarbulbus. Darüber hinaus war die Epidermis hyperplastisch. Vier Wochen nach Geburt waren die histologischen Veränderungen jedoch nicht mehr feststellbar, nur das Fell war noch nicht vollständig entwickelt. Immunhistochemische Analysen ergaben, dass der Verlust von GPx4 mit veränderter Keratinozyten-Proliferation, -Differenzierung und Infiltration von Entzündungszellen einherging, die ebenfalls mit steigendem Alter reversibel waren. Als mögliche Kompensation des *GPx4*-Verlusts fand man die Expression von *TR1* und *GPx1* in Keratinozyten-Kulturen hochreguliert. Zudem konnten erhöhte Level an COX-2, Prostaglandin E2 und Lipidperoxiden festgestellt werden. COX-2, welches eine wichtige Funktion bei Entzündungsgeschehen innehat, wird negativ von GPx4 reguliert (Huang et al., 1999; Imai and Nakagawa, 2003). Durch die Gabe des COX-Inhibitors Celecoxib an schwangere Mäuse konnte deshalb der Phänotyp innerhalb von 17 Tagen deutlich verbessert werden (Sengupta et al., 2013).

Der neuronenspezifische, induzierbare Knockout von *GPx4*-transgenen Mäusen führte zur Ataxie, Hyperexzitabilität und epileptischen Anfällen (Seiler et al., 2008; Wirth et al., 2010). Histologisch fand man vermehrt pyknotische Zellen und eine erhöhte Anzahl an

apoptotischen Zellen in der CA3 Region des Hippocampus, sowie wie einen Verlust von NeuN positiven Zellen sowie Parvalbumin-positiven Interneuronen.

1.5.2 Zytosolische Form - cGPx4

Die zytosolische Form der GPx4 ist von allen drei Formen der GPx4 diejenige, die für die embryonale Entwicklung essenziell ist und deren Verlust somit verantwortlich für die embryonale Letalität der GPx4 Knockout Mäuse ist (Conrad et al., 2005; Liang et al., 2009; Schneider et al., 2009). Trotz der irreführenden Bezeichnung und der Abwesenheit eines mitochondrialen Zielsignalpeptids konnten Liang und Kollegen zeigen, dass die cGPx4 in Mitochondrien vorkommt und damit für die mitochondriale Funktion von GPx4 in somatischen Geweben verantwortlich ist (Liang et al., 2009). Schon vorherige Studien hatten angedeutet, dass die GPx4 eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der mitochondrialen Apoptose und dem Schutz vor oxidativem Schaden spielt (Ran et al., 2004). Sie wird ubiquitär in allen Zellen und Geweben exprimiert –inklusive embryonalem Gewebe (Schneider et al., 2006) - mit einer stärkeren Expression in Hirn Niere, Herz und Leber (Pushpa-Rekha et al., 1995). Liu und Kollegen zeigten in Tumortransplantationsexperimenten, dass eine Überexpression der cGPx4 in Pankreastumorzelllinien zu einer Wachstumshemmung der Zellen führt (Liu et al., 2006). Aufgrund des frühen embryonalen Todes, den ein gezielter Knockout der zytosolischen Form zur Folge hat, konnten die Funktionen der cGPx4 *in vivo* noch nicht genauer analysiert werden. Da die mitochondriale und die nukleäre Form hauptsächlich im Hoden vorkommen, kann aber daraus geschlossen werden, dass es sich bei den oben erwähnten Phänotypen nach GPx4 Knockout um den Funktionsverlust der cGPx4 handelt.

1.5.3 Mitochondriale Form - mGPx4

Frühere Daten aus unserem Labor zeigten, dass die mGPx4 die vorherrschende Form der GPx4 im Hoden ist und ihr dort eine entscheidende Funktion für die Fertilität zukommt. (Schneider et al., 2009). Durch Knockout-Studien stellte sich heraus, dass die gezielte Deletion der mGPx4 keinen Einfluss auf die Embryonalentwicklung hat, da die Knockout

Mäuse voll lebensfähig waren und keine offensichtlichen Unterschiede zu den Wildtypwurfgeschwistern aufwiesen. Jedoch waren die männlichen *mGPx4* Knockout Mäuse infertil, während die weiblichen Knockout Mäuse normale Würfe gebaren. Bei histologischen Untersuchungen konnten bis auf das testikuläre Gewebe keine Unterschiede in der GPx4 Protein-Menge zwischen Wildtyp und Knockout Mäusen festgestellt werden. Allerdings wurde im Hoden eine verminderte Menge an GPx4-Protein nachgewiesen, das hauptsächlich auf das Mittelstück der Spermatozoen beschränkt war. Zwar waren keine signifikanten Unterschiede in der Spermienkonzentration feststellbar, allerdings waren die Spermien der *mGPx4*^{-/-} Mäuse sowohl in der Motilität als auch Progression stark eingeschränkt. Ultrastrukturelle Analysen der Spermien von Knockout Mäusen zeigten diverse Anomalitäten, wie abgeknickte Spermien mit Köpfen, die vom Mittelstück abgelöst waren. Die Mitochondrien im Mittelstück waren losgelöst, geschwollen und anormal angeordnet. Darüber hinaus konnte ein erhöhter Anteil an freien Proteinthiolen detektiert werden, was die Annahme unterstützt, dass die GPx4 die mitochondriale Kapsel durch Proteinthioloxidation stabilisiert (Maiorino et al., 2005b; Ursini et al., 1999). Die Beobachtungen stimmen überein mit dem Phänotyp der Spermien von Tieren unter Selenmangel, was darauf hindeutet, dass die mGPx4 das entscheidende Selenoprotein für die Fruchtbarkeit von männlichen Säugern darstellt (Wallace E., 1983; Wu et al., 1973). Interessanterweise konnte mithilfe von intrazytoplasmatischer Spermienkerninjektion mit *mGPx4* Knockout Spermien voll lebensfähige Mäuse generiert werden, wodurch die Unfruchtbarkeit umgangen werden konnte (Schneider et al., 2009).

Ueta und Kollegen fanden anhand von Photorezeptorzell-spezifischen, induzierbaren Knockout Mäusen heraus, dass die mitochondrial lokalisierte Form der GPx4 die vorherrschende Form der GPx4 in der Retina und essenziell für die Netzhaut ist (Ueta et al., 2012). Schon vorher war bekannt, dass die GPx4 die Retina vor oxidativen Schädigungen schützt, die für die Retinadegeneration mitverantwortlich sind (Lu et al., 2009). Zwar ist die GPx4 nicht entscheidend für die Entwicklung und Differenzierung von Photorezeptorzellen, doch konnte bei den Knockout-Mäusen 12 Tage nach Geburt eine Retinadegeneration festgestellt werden (Ueta et al., 2012). Diese Degeneration ging mit einer deutlichen Erhöhung von Lipidperoxiden in den inneren Segmenten der Photorezeptorzellen einher. Dort sind die Mitochondrien lokalisiert und es wurde die Expression der *GPx4* nachgewiesen. Tatsächlich zeigte sich bei den Knockout Mäusen ein verkleinerter Bereich an Mitochondrien sowie eine verminderte Funktion und Struktur von Zilien der Photorezeptorzellen. Interessanterweise konnte die Degeneration der Photorezeptorzellen mit einem durch AIF (Apoptose-induzierender Faktor)-induzierten Zelltod in Verbindung gebracht werden (Ueta et

al., 2012), was früher schon von unserem Labor anhand der induzierbaren *GPx4* Knockout Fibroblasten festgestellt werden konnte (Seiler et al., 2008).

1.5.4 Nukleäre Form - nGPx4

Die nukleäre Form der *GPx4* wird ausschließlich im Hoden exprimiert (Pfeifer et al., 2001). Sie unterscheidet sich von der mitochondrialen und cytosolischen Form durch einen verlängerten N-Terminus, der durch ein alternatives Exon (Ea) kodiert wird (Maiorino et al., 2003; Moreno et al., 2003), und welches sich durch ein nukleäres Importsignal sowie Clustern, die reich an Lysin- und Arginin-Resten sind, auszeichnet (Pfeifer et al., 2001). Diese Cluster werden auch bei Protaminen vorgefunden, die während der Spermatogenese die Mehrzahl an Histonen in den späten Spermienreifungsstadien ersetzen. Dadurch, dass die Protamine sehr basisch sind, wird die DNS reorganisiert und zu dichtem Chromatin kondensiert. Ein vollständiges Verpacken der DNS wird über die Ausbildung von Proteindisulfiden gewährleistet, was zu einer erhöhten Stabilität des Genoms gegenüber mechanischen und chemischen Reizen führt (Barone et al., 1994). Die strukturelle Ähnlichkeit des N-Terminus der nGPx4 zu Protaminen lässt auch auf die Funktion der nGPx4 schließen. Allerdings konnte unser Labor zeigen, dass die nGPx4 nicht notwendig für die Fertilität ist (Conrad et al., 2005). Auch für die histologische und strukturelle Integrität der Spermien spielt die nGPx4 keine Rolle. Jedoch trägt sie zur Stabilität und Resistenz von reifenden Zellen der Spermatogenese bei der Passage durch den Nebenhodenkopf gegenüber chemischen und physikalischen Belastungen bei. Eine strukturelle Instabilität bei Knockout Mäusen war allerdings nur im Caput offensichtlich. Daraus kann man schließen, dass der Verlust der nGPx4-Funktion zumindest bis zum Nebenhodenschwanz von anderen Enzymen kompensiert wird.

Da auch die *GPx5* hauptsächlich im Nebenhoden lokalisiert ist, wurde das eventuelle Zusammenspiel der beiden Enzyme bei einem Doppelknockout beider Gene untersucht (Noblanc et al., 2012). Überraschenderweise waren die Mäuse fruchtbar und zeigten keine Unterschiede in der Histologie oder Zytologie von testikulärem und epididymalem Gewebe. Einzig ein Defekt in der Chromatinentpackung konnte festgestellt werden. Somit erfuhren die Spermienkerne der Doppelknockout Mäuse keine optimale Chromatinkondensation, was allerdings keine Auswirkung auf die Fruchtbarkeit hatte.

1.6 Transgene Mausmodelle

Transgene Mausmodelle stellen eine wichtige Methode dar, mit deren Hilfe einzelne Proteine inaktiviert werden und deren Funktion somit *in vivo* analysiert werden kann. Zusätzlich geben Untersuchungen von transgenen Mäusen gewonnenen Zellkulturen weitere Aufschlüsse über die spezifischen Funktionen der Proteine.

1.6.1 Thioredoxin-Reduktase Knockout-Modelle

Txnrd1 Knockout Embryonen sterben zwischen E8,5 und E10,5 aufgrund einer Wachstums- und Entwicklungsretardierung (mit Ausnahme des Herzens), die auf eine allgemeine Reduktion der Zellproliferation zurückzuführen ist (Conrad et al., 2004; Jakupoglu et al., 2005). Daher konnten auch keine Fibroblastenkulturen aus diesen Embryonen direkt gewonnen werden.

Txnrd2 Knockout Embryonen sterben etwas später zwischen E13,5 und E15,5 (Conrad et al., 2004). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind eine verminderte Proliferation von kardialen Zellen und eine erhöhte Apoptoserate der fötalen Blutzellen in der Leber, die eine schwere Anämie und partielle Wachstumsretardierung auslösen. Im Gegensatz zu *Txnrd1* Knockout Embryonen konnten zwar MEFs kultiviert werden, allerdings war deren Proliferation und Überleben eingeschränkt. Die spezifische Deletion des *Txnrd2* Gens in kardialem Gewebe führte zu dilatativer Kardiomyopathie und zum Tod der Knockout Mäuse wenige Stunden nach der Geburt. Im Gegensatz dazu hatte die Ausschaltung des *Txnrd1*-Gens in kardialen Zellen keine offensichtliche Auswirkung auf das Überleben der Knockout Mäuse.

Untersuchungen von Knockouts im Nervensystem von Mäusen deuten auf eine wichtige Rolle der *Txnrd1* in der Entwicklung des Kleinhirns hin (Soerensen et al., 2008). Mäuse mit einer Hirn-spezifischen Deletion der *Txnrd1* zeigten eine starke Ataxie und Tremor. Histopathologisch konnte eine progressive, zerebelläre Hypoplasie mit ektopischen Purkinje-Zellen festgestellt werden, was auf eine wichtige Funktion der *Txnrd1* in der Entwicklung der Bergmann Glia hindeutet.

1.6.2 GPx4 Knockout-Modelle

Die vollständige Deletion des *GPx4* Gens führt zu einem frühen embryonalen Tod am Tag E7,5 (Imai and Nakagawa, 2003; Yant et al., 2003), dessen Phänotyp dem von Mäusen ähnelt, bei denen das γ -GCS (γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase) Gen inaktiviert wurde (Shi et al., 2000). Aufgrund der frühembryonalen Letalität wurden frühere Untersuchungen an hemizygoten *GPx4* Knockout Mäusen durchgeführt. Diese zeigen beispielsweise eine verminderte GPx4 Aktivität in verschiedenen Geweben (Garry et al., 2008; Yant et al., 2003). So wurde festgestellt, dass Lungenfibroblasten mit nur einem *GPx4* Allel empfindlicher gegenüber Wasserstoffperoxid, Cadmiumchlorid und Kumenhydroperoxid reagieren. Allerdings waren sie auch resistenter gegenüber Phosphatidylcholinhydroperoxid im Vergleich zu Wildtypzellen. Hemizygoten Mäuse waren empfindlicher gegenüber γ -Strahlung, lebten trotz allem im Vergleich zu homozygoten Mäusen länger, da tödliche Lymphome später auftraten und der Schweregrad von Glomerulonephritiden reduziert war (Ran et al., 2007). Zellkulturen, die aus hemizygoten Mäusen etabliert wurden, zeigten sich sensitiver gegenüber tBOOH (tert-Butylhydroperoxid) und der Kultivierung unter 20% Sauerstoff.

Im Gegensatz dazu wurden auch Mausmodelle etabliert, bei denen die *GPx4* entweder gewebsspezifisch oder systemisch verstärkt exprimiert wurde. Dabei zeigte sich, dass eine transgene Expression der zytosolischen Form der *GPx4* ausreicht, um das Überleben von *GPx4*^{-/-} Mäusen zu gewährleisten (Liang et al., 2009). Ran und Kollegen konnten weiterhin zeigen, dass Mäuse, die humane *GPx4* transgen exprimierten, resistenter gegenüber Diquat-induziertem Leberschaden sind (Ran et al., 2004). Neuronen dieser Mäuse zeigten ebenso eine erhöhte Stressresistenz gegenüber Wasserstoffperoxid, tBOOH und β -Amyloid.

Unser Labor etablierte das erste konditionale Knockout Modell für die *GPx4*, damit die Funktion der GPx4 in adulten Geweben sowie in induzierbaren Knockout Kulturen strukturiert studiert werden kann (Seiler et al., 2008). Dazu wurden die letzten 3 Exons des *GPx4* Gens von flox-P Stellen flankiert, welche als Erkennungsstelle für die Cre-Rekombinase dienen. Da das letzte Exon das SECIS-Element kodiert und dies essenziell für die ko-translationale Inkorporation von Sec in die Polypeptidkette ist, kann durch die Deletion der letzten drei Exons kein funktionelles Protein mehr gebildet werden. Die ubiquitäre, Cre-vermittelte Deletion der *GPx4* sowie die Verpaarung der daraus resultierenden *GPx4*^{+/-} Mäusen ergab den gleichen embryonal letalen Phänotyp, wie er bei konstitutiven *GPx4* Knockout Mäusen beobachtet wurde (Yant et al. 2003, Imai et al 2003).

Darüber hinaus spielt die GPx4 eine wichtige Rolle im Gehirn, was schon daraus abgeleitet werden kann, dass sie relativ stark im Hirngewebe exprimiert ist, und die Expression selbst unter Selen-Mangel aufrechterhalten wird (Schomburg and Schweizer, 2009). Dementsprechend sind kortikale Neuronen, die die *GPx4* überexprimieren, resistenter gegenüber oxidativem Stress, der beispielsweise durch Wasserstoffperoxid oder tBOOH ausgelöst wird, oder auch durch β -Amyloid. In Analogie dazu zeigen neuronenspezifische *GPx4*^{-/-} Mäuse nach der Geburt neurologische Defizite wie zum Beispiel eine Ataxie, Hyperexzitabilität und epileptische Anfälle (Conrad, 2009; Seiler et al., 2008; Wirth et al., 2010). Kortikale Neuronen dieser Mäuse konnten ausschließlich unter Zugabe von Vitamin E kultiviert werden (Seiler et al., 2008).

Die nukleäre Form von GPx4 wird, wie schon zuvor erwähnt, hauptsächlich im Hoden exprimiert. *nGPx4*^{-/-} Mäuse wurden nach der Mendel'schen Regel in normalem Verhältnis geboren, woraus zu schließen ist, dass nGPx4 keine essentielle Rolle bei der pränatalen Entwicklung spielt (Conrad et al., 2005). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei *mGPx4*^{-/-} Mäusen, obwohl sie voll lebensfähig sind, dass die männlichen Knockout Mäuse unfruchtbar sind (Schneider et al., 2009).

Yoo et al zeigten in einem weiteren Tamoxifen-induzierbaren Knockout System, dass die GPx4 Level nach Tamoxifen Gaben stark reduziert war, vor allem in Leber, Lunge, Niere, zerebralem Cortex und Hippocampus (Yoo et al., 2012),. Die Mäuse starben innerhalb von 2 Wochen nach der Tamoxifeninjektion. In der Leber war die Zahl der apoptotischen Zellen erhöht und ubiquitär war die Funktion der Mitochondrien eingeschränkt.

1.7 Signalwege

Der durch ROS ausgelöste oxidative Stress zählt zu den kausalen Faktoren für maligne Tumorerkrankungen und viele altersbedingte, degenerative Erkrankungen, wie zum Beispiel kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes, Alzheimer und Parkinson. Ein zentrales System, das das intrazelluläre Redox-Gleichgewicht reguliert, ist das GSH-abhängige System, welches entweder durch Disulfidaustauschreaktionen mit oxidierten Proteinen oder als Reduktans für die GPxs und andere GSH-abhängige Enzyme zur Aufrechterhaltung des intrazellulären reduzierenden Milieus beiträgt.

1.7.1 GPx4 kontrolliert einen Lipoxygenase-abhängigen Zelltod-Signalweg

Unser Labor etablierte ein induzierbares *in vitro* Knockout-System für die *GPx4*, das aus Embryonen stammt bei denen das *GPx* Gen von zwei loxP-Stellen flankiert ist (Seiler et al., 2008). Diese Zelllinie wurde mit MERCreMER (Cre-Rekombinase mit zwei „mutated-estrogen receptor“ Bindedomänen) stabil transfiziert. MERCreMER befindet sich in Abwesenheit von Tamoxifen im Zytosol in einem Komplex gebunden mit Hsp90 (Hitze-Schock-Protein 90). Durch die anschließende Zugabe von Tamoxifen wird der MERCreMER Komplex aus dem Zytosol freigesetzt. Dadurch transloziert die MERCreMER zum Zellkern, wo sie an den loxP-Stellen bindet und die letzten 3 Exons des *GPx4* Gens ausschneidet, wodurch dieses inaktiviert wird (Abbildung 3).

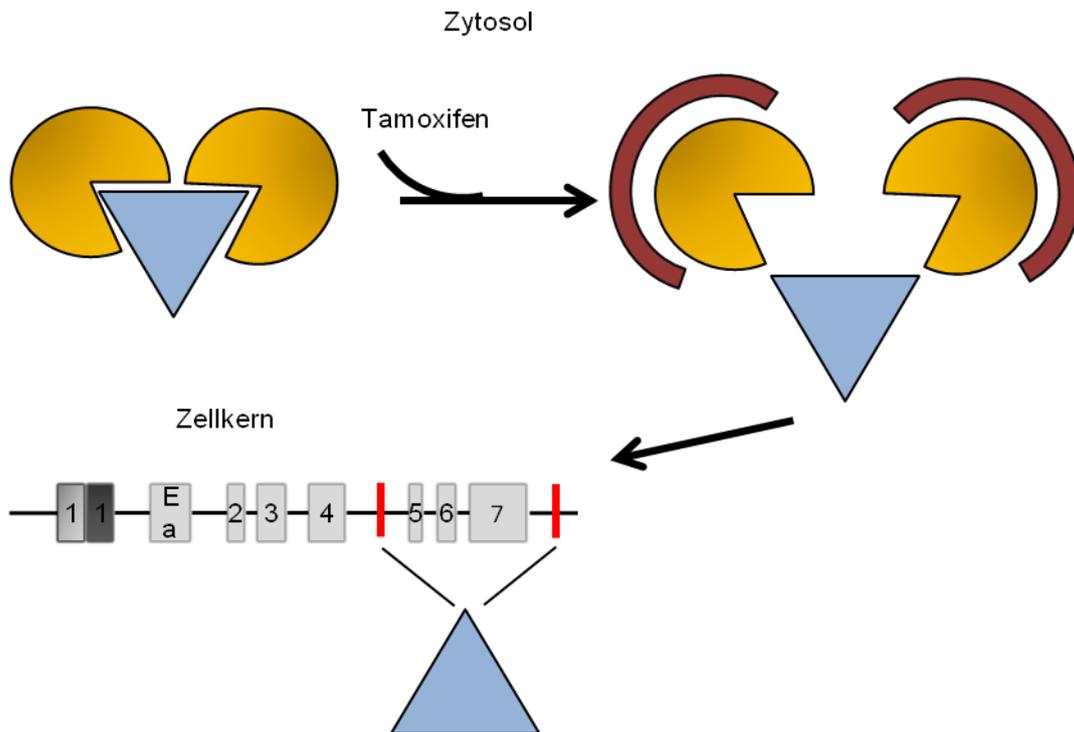


Abb. 3 Tamoxifen-induzierbare *GPx4* Deletion. Im Zytosol befindet sich die MerCreMer-Rekombinase (blau) im Komplex mit Hsp90 (gelb) (MerCreMer). Durch Zugabe von Tamoxifen (bordeaux) dissoziiert Mer von Cre und Cre gelangt in den Zellkern, wo es die letzten 3 Exons des *GPx4* Gens an den Lox-P-Seiten (rot) schneidet und damit das Gen deletiert.

Das Ergebnis ist ein starker Abfall der *GPx4* mRNA bereits 24 Stunden nach Tamoxifenzugabe, gefolgt von einem starken Abfall des zellulären GPx4-Proteins, was letztlich zum massiven Zelltod 48 bis 72 Stunden nach Tamoxifen-Behandlung führt. Nur das lipophile α -Tocopherol (Vitamin-E) konnte als einziges Antioxidans den Zelltod verhindern,

was auf die Lipidperoxidation als wesentlichen Auslöser des Zelltods nach *GPx4* Knockout hindeutet. Tatsächlich konnte auch ein Anstieg der Lipidperoxidation nach Tamoxifengabe festgestellt werden, der vollständig durch Zugabe von Vitamin-E vermieden werden konnte. Die nachgewiesene Lipidperoxidation war ein Ergebnis der spezifischen Aktivierung der Lipoxygenasen (LOX) und nicht der Cyclooxygenasen. Durch die Behandlung der Knockout Zellen mit verschiedenen LOX- und COX-Inhibitoren stellte sich heraus, dass die 12/15-LOX ein entscheidendes Enzym in diesem Zelltod-Signalweg ist, welches der *GPx4* nachgeschaltet die Lipidperoxidation und damit den Zelltod verursacht. Darüber hinaus konnte belegt werden, dass GSH der *GPx4* und 12/15-LOX vorgeschaltet ist. Ein durch BSO (Buthioninsulfoximin) - einem γ -GCS-Inhibitor - ausgelöster Mangel an GSH verursachte einen massiven Zelltod in Wildtyp Zellen, der vollständig durch Vitamin-E und den 12/15-LOX-spezifischen Inhibitor PD146176 verhindert wurde. Zusätzlich waren *12/15-LOX*^{-/-} Zellen resistenter gegenüber einem GSH-Mangel. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der durch *GPx4* Knockout initiierte Zelltod nicht über den klassischen programmierten Zelltod, die Apoptose, verläuft, sondern ein alternativer Signalweg besprochen wird (Seiler et al., 2008). Dieser geht von der Translokation des mitochondrialen Proteins AIF nach dessen proteolytischer Spaltung in den Zellkern aus, wo es DNA-Fragmentierung und Zelltod auslöst (Modjtahedi et al., 2006; Susin et al., 1999). Tatsächlich konnte in *GPx4*^{-/-} Zellen die Translokation von AIF in den Zellkern nachgewiesen werden. Darüber hinaus verhinderte der Knockdown der *AIF* Expression den Tod dieser Zellen (Abbildung 4) (Seiler et al., 2008).

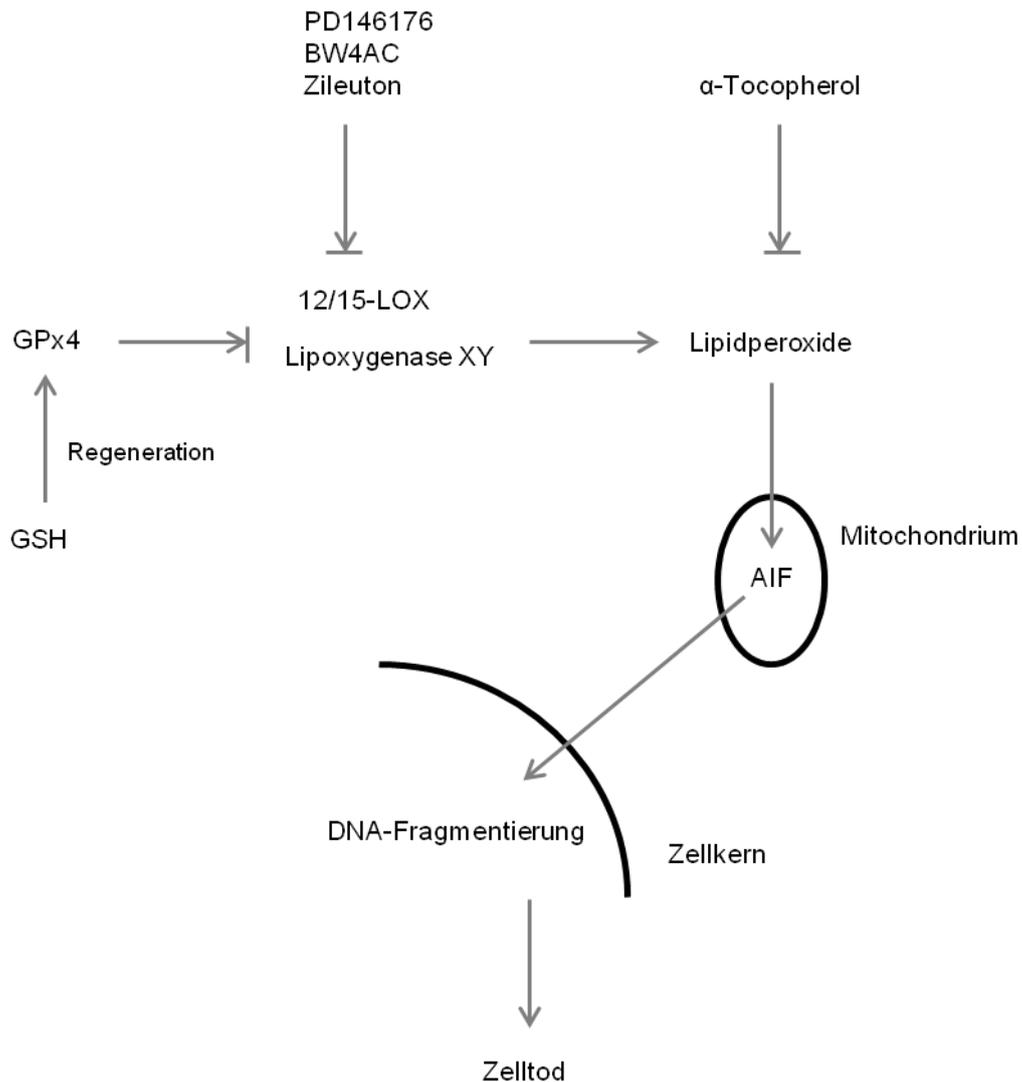


Abb. 4 AIF vermittelter Zelltod durch LOX-Aktivierung. GPx4 hemmt die Aktivität von Lipoxygenasen. Die durch LOX generierten Lipidhydroperoxide führen zur Aktivierung des AIF (Norberg et al., 2010a). Daraufhin transloziert AIF in den Zellkern, wo es möglicherweise über die Aktivierung der Poly (ADP ribose)-Polymerase-1 die DNS-Fragmentierung und damit den Zelltod initiiert (Norberg et al., 2010b).

1.7.2 Lipidperoxide kontrollieren die Signaltransduktion von Rezeptortyrosinkinasen

Unser Labor konnte nachweisen, dass die durch 12/15-Lipoxygenase-Aktivität entstandenen Lipidhydroperoxide mithilfe der Oxidation und transienten Inaktivierung der Proteintyrosin-Phosphatasen (PTPs) die Aktivität der Signalübertragung von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) kontrollieren können (Abbildung 5) (Conrad et al., 2010).

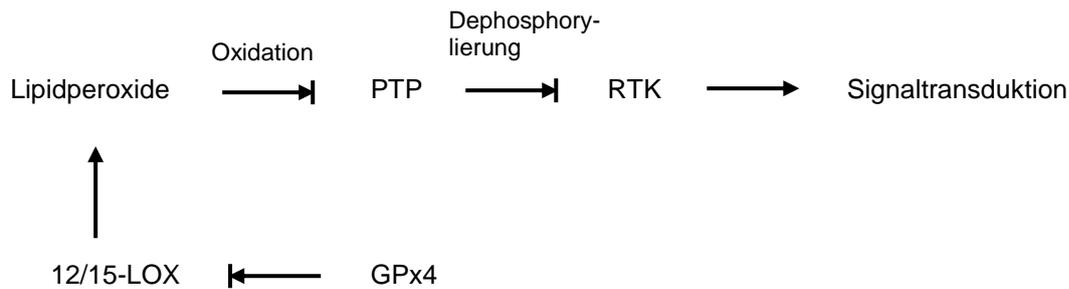


Abb. 5 GPx4 beeinflusst die Signaltransduktion von RTKs. Lipidhydroperoxide werden durch die Lipoxygenasen gebildet, die wiederum durch die GPx4 kontrolliert werden. Lipidhydroperoxide oxidieren und hemmen PTPs und führen somit zu einem verstärkten RTK-Signaling.

Bindet ein Ligand an RTKs, wird die Signaltransduktion unter anderem durch die Kontrolle der PTPs moduliert werden (Alonso et al., 2004; Ostman and Bohmer, 2001; Tonks, 2006). Dabei dephosphorylieren PTPs spezielle Phosphotyrosinreste der aktivierten RTKs und beeinflussen so den weiteren Signalweg in der Zelle (Chiarugi et al., 2002; Klinghoffer and Kazlauskas, 1995; Kovalenko et al., 2000; Persson et al., 2004). PTPs wiederum werden durch eine reversible Oxidation des Cys im aktiven Zentrum durch ROS inaktiviert (Rhee et al., 2005; Salmeen and Barford, 2005). Superoxidanion wird durch die NADPH-Oxidase nach Aktivierung von Zelloberflächenrezeptoren, wie zum Beispiel RTKs, Integrine, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, B-Zell- und T-Zellrezeptoren gebildet (Giannoni et al., 2003; Kwon et al., 2005; Lee et al., 1998; Mahadev et al., 2001; Meng et al., 2002; Singh et al., 2005; Yang et al., 2001). Superoxidanion dismutiert zu H_2O_2 , was wiederum das klassische Oxidans der PTPs im Kontext von RTK Signalwegen darstellt. Conrad und Kollegen hingegen lieferten erste Hinweise, dass die Produkte von 12/15-Lipoxygenase effektivere Inhibitoren der PTPs sind als H_2O_2 (Conrad et al., 2010). Dass GPx4 den Oxidationsstatus der PTPs indirekt reguliert, konnte in den $GPx4^{-/-}$ Zellen nachgewiesen werden, da diese eine erhöhte PTP-Oxidation und eine damit verbundene verminderte PTP-Aktivität aufwiesen (Conrad et al., 2010). Darüber hinaus fand man in $GPx4$ Knockout Zellen eine erhöhte PDGF β -Rezeptorphosphorylierung nach Stimulation mit dem Liganden PDGF-BB. Sowohl Trolox, ein wasserlösliches Vitamin-E-Derivat, als auch der 12/15-Lox-Inhibitor AA861 konnten die Effekte der PDGF-Phosphorylierung vollständig aufheben. Außerdem konnte man eine verstärkte Lamellipodia-Bildung in den $GPx4$ Knockout-Zellen feststellen, was ebenso eine erhöhte Signaltransduktion nach PDGF- β -Rezeptor-Aktivierung impliziert.

1.7.3 Die Hefe-GPx3 fungiert als Redox-Sensor

Da die GPx4 in die Regulation von Zellsignalkaskaden eingebunden ist, wurde eine weitere Funktion der GPx4 als Redoxsensor diskutiert und mit der Funktion der Hefe-GPx3 Orp1 – das Hefe-Homolog zur GPx4 - in Verbindung gebracht. Orp ist eine Cys-haltige Peroxidase und bildet nicht die für Cys-haltige GPxs typische intramolekulare Disulfidbindung, sondern reagiert mit dem Thiolrest des Transkriptionsfaktors Yap (Delaunay et al., 2002; Fourquet et al., 2008) . Dieser initiiert daraufhin die Expression antioxidanter Enzyme (Abbildung 6). Über diesem Weg ist die GPx3 nicht nur an der Beseitigung von ROS beteiligt, sondern registriert diese, um daraufhin ein anderes enzymatisches System zu aktivieren, was gegen zusätzlichen oxidativen Stress vorgehen kann. Die Polymerisation der GPx4 während der Spermatogenese in der mitochondrialen Kapsel sowie die Rolle der GPx4 in der Spermienkernkondensation zeigen, dass die GPx4 ideale Voraussetzungen für eine solche Reaktion und Funktion liefern kann, zumindest wenn die GSH-Konzentrationen niedrig sind (Schneider et al., 2009). Ob die GPx4 eine solche Funktion auch in somatischen Zellen innehat, sollte deshalb im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1 Antikörper

Antikörper (Herkunft)	Firma	Katalog-Nr.
α -Actin (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	sc-58679
α -AIF (Ziege)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	sc-9416
α -Bax (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	sc-493
α -Bcl-x _{S/L} (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	sc-634
α -BID (Kaninchen)	Cell Signaling, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland	#2003
α -Caspase 8 (Kaninchen)	Cell Signaling, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland	#4927
α -FLAG (Maus)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	F1804
α -GPx4- Überstand mGPx4 1B4 (Ratte)	Elisabeth Kremmer, HMGU, München, Deutschland	
α -Nrf2 (Kaninchen)	abcam, Cambridge, UK	ab31163
α -Peroxiredoxin 1 (Kaninchen)	AbFrontier, BioVendor GmbH, Deutschland	LF-PA0095
α -Peroxiredoxin 2 (Kaninchen)	AbFrontier, BioVendor GmbH, Deutschland	LF-PA0095

α -Peroxiredoxin 3 (Kaninchen)	AbFrontier, BioVendor GmbH, Deutschland	LF-PA0007
α -Peroxiredoxin 4 (Kaninchen)	AbFrontier, BioVendor GmbH, Deutschland	LF-PA0009
α -Peroxiredoxin 5 (Kaninchen)	AbFrontier, BioVendor GmbH, Deutschland	LF-PA0210
α -Peroxiredoxin 6 (Maus)	AbFrontier, BioVendor GmbH, Heidelberg, Deutschland	LF-PA0018
α -RIP (Kaninchen)	Cell Signaling, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany	#3493
α -RIP3 (Kaninchen)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	R4277
α -TRAF3 (Maus)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	sc-6933
α -Maus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	sc-2031
α -Ratte	Dianova, Hamburg, Deutschland	112-035-062
α -Ziege	Calbiochem, San Diego, Kalifornien, USA	401515
α -Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	sc-2030

Antikörper	Anwendung	Verdünnung
α-Actin (Kaninchen)	Immunoblot	1:5000
α-AIF (Ziege)	Immunoblot	1:500
α-Bax (Kaninchen)	Immunoblot	1:200
α-Bcl-x _{S/L} (Kaninchen)	Immunoblot	1:500
α-BID (Kaninchen)	Immunoblot	1:1000
α-Caspase 8 (Kaninchen)	Immunoblot	1:1000
α-FLAG (Maus)	Immunoblot	1:1000
α-GPx4 mGPx4 1B4 Überstand (Ratte)	Immunoblot	1:5000
α-Nrf2 (Kaninchen)	Immunoblot	1:1000
α-Peroxiredoxin 1 (Kaninchen)	Immunoblot	1:1000
α-Peroxiredoxin 2 (Kaninchen)	Immunoblot	1:1000
α-Peroxiredoxin 3 (Kaninchen)	Immunoblot	1:2000
α-Peroxiredoxin 4 (Kaninchen)	Immunoblot	1:2000
α-Peroxiredoxin 5 (Kaninchen)	Immunoblot	1:1000
α-Peroxiredoxin 6 (Kaninchen)	Immunoblot	1:2000
α-RIP (Kaninchen)	Immunoblot	1:1000
α-RIP3 (Kaninchen)	Immunoblot	1:1000
α-TRAF3 (Maus)	Immunoblot	1:500
α-Maus	Immunoblot	1:5000
α-Ratte	Immunoblot	1:5000
α-Kaninchen	Immunoblot	1: 5000
α-Ziege	Immunoblot	1:5000

Alle Antikörper wurden in 5% BSA (*Bovine serum albumin*) in TBS-T (*Tris-Buffered Saline and Tween 20*) gelöst.

2.1.2 Chemkalien

Chemikalien	Firma	Katalog-Nr.
Acrylamid	Roth Carl GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland	3029.1
Albumin Fraktion V	Roth Carl GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland	0163.2
Ammoniak 32%	Merck, Darmstadt, Deutschland	5426 210
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	AG141-25G
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	A3678
Ampuwa	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland	7151-5
Anti-M2-FLAG-Agarose Affinity Gel	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	A2220-1ML
β -Mercaptoethanol (2-ME)	Roth Carl GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland	4227.1
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	#B6131-5G
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.02445.2500
Desthiobiotin Strep-tag elution buffer	IBA, Göttingen, Deutschland	2-1000-025
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	D2650
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	D8161
EDTA (Ehylendiamin- tetraessigsäure)	ICN Biomedicals Inc.	194660

Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland	100063
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.00983.2500
FLAG Peptide	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	F3290-4MG
Formaldehyd 37%	Roth Carl GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland	7398.1
Glutaraldehyd 10%	Roth Carl GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland	3778.1
Glycin	Roth Carl GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland	3908.2
Glycerin	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	G5516
HPLC-LiChrosolv	Merk, Darmstadt, Deutschland	1.151333. 1000
Iodacetamid (IAA)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	I6125
Isopropanol p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.09634.2511
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	25030
Methanol	Lager v. Helmholtz Zentrum München, Deutschland	
Nonidet-P40	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz	74385
Protease Inhibitor Tablets Cocktails	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland	1697498
Natriumchlorid	Roth Carl GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland	3957.1
Sodium Deoxycholat	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen Deutschland	D6750
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz	71729

Natriumhydroxid	Karl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland	UN1823
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen Deutschland	S6422
N-Ethylmaleimid (NEM)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	E1271-5G
RapiGest SF Surfactant	Waters Coporation, Milford, USA	112511
Salzsäure (HCl)	Merk,Darmstadt, Deutschland	1.00319.1000
Silbernitrat	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	S6506-25G
Strep-Tactin Superflow	IBA, Göttingen, Deutschland	2-1206-010
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	T6399
TEMED (Tetramethyl- ethylenediamine)	Roth Carl GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland	2367.3
Tris-Base (Trishydroxy- -methylaminomenthan)	Roth Carl GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland	4885.3
Triton X-100	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	T9284
Trypan Blue (0.4%)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	T8154
Trypsin	Promega Corporation, Madison, USA	V5111
Tween 20	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	P5927
Zitronensäure	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	C4540-100G

2.1.3 Zellkulturreagentien

Zellkulturreagentien	Firma	Katalog-Nr.
L-Buthionin-Sulfoximin (BSO)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	B2640
t-Butylhydroperoxid (tBOOH)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	B2633
DMEM 1x (Dulbecco's Modified Eagle's medium)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	41966
Fetal calf serum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich	A15-043
Glutamin 100x	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	25030
PBS (Phosphat Buffered Salinine-Dulbecco)Lösung ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , 10x-Konzentrat	Biochrom AG, Berlin, Deutschland	L1835
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, Germany	15140-122

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien/Kits	Firma	Katalog-Nr.
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Waltham, USA	23227
Hybond ECL Nitrocellulose Membrane	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland	RPN303D
Illustra Microspin TM Columnx	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland	27-3565-01
Millex GP Filter 0.22µm	Merk, Darmstadt, Deutschland	SLGP033RK

ECL Western Blotting Detection Reagent Amersham™	GE Healthcare, Freiburg Deutschland	RPN-2106
Medical-X-Ray Screen Film RP New	CEA, Hamburg, Deutschland	EC84A

2.1.5 Geräte

<u>Geräte</u>	<u>Firma</u>
Electrophoresis Power Supply EV 202	Consort
Eppendorf Centrifuge 5424 R	Eppendorf
CO2 Inkubator	VWR Katalog
Sicherheitswerkbank Safeflow 1.2	Nunc
TE 22 Mini Tank Transfer Unit	Amersham Biosciences
Thermomixer compact	Eppendorf
Vortex Genie® 1	Carl Roth

2.1.6 Zelllinien

Grundlage dieser Dissertation waren genetisch manipulierte, murine embryonale Fibroblasten (MEF)-Zelllinien, die in unserem Labor als PFa1-Zellen bezeichnet werden. Die ursprünglichen Zelllinien wurden aus Embryonen (Mäusen) isoliert, bei denen die letzten drei Exons des *GPx4*-Gens mit sogenannten loxP-Stellen versehen wurden (*GPx4^{lox/lox}*) (Seiler et al., 2008). Diese Zelllinie wurde dann nachträglich mit Tamoxifen-induzierbarer Cre-Rekombinase stabil transfiziert (MerCreMer). Durch Zugabe von Tamoxifen in das Zellkulturmedium wird der zytosolische Hsp90-MerCreMer gestört, worauf die MerCreMer in den Kern transloziert und dort die letzten drei Exons der *GPx4* deletiert (Seiler et al., 2008). Dies hat zur Folge, dass keine funktionelle *GPx4* mehr exprimiert werden kann, weshalb die *GPx4* Knockout Zellen zwischen 48 und 72 Stunden nach Tamoxifen-Behandlung sterben.

Zur Rekonstitution der *GPx4* Expression wurden Wildtyp *GPx4* (im weiteren Verlauf als WT Mutante bezeichnet) sowie einige Mutanten des katalytischen Zentrums der *GPx4* hergestellt, die durch lentivirale Transduktion in die Pfa1 Zellen eingeschleust wurden (Mannes et al., 2011). Bei den Mutanten handelte es sich im Wesentlichen um die Mutation des katalytisch aktiven Sec (U) an Stelle 46 zu Serin (S) (im weiteren Verlauf als US-Mutante bezeichnet), sowie eine Variante, bei der alle acht nicht-peroxidativen Cysteine zu Serin geändert wurden, sodass Sec im aktiven Zentrum jedoch erhalten blieb (im weiteren Verlauf als all cys/ser WT-Mutante bezeichnet). Als Kontrolle wurden PFa1 Zellen verwendet, in die ein leerer Vektor, das heisst, ein Konstrukt, welches keine exogene *GPx4* enthält, transduziert wurde. Diese werden im weiteren Verlauf als PFa1 mock bezeichnet.

Sämtliche Mutanten inklusive der Wildtyp *GPx4* wurden N-Terminal mit einem FLAG-Strep-Tactin-HA-Tag versehen, der die Proteinaufreinigungen (wie im Folgenden beschrieben) ermöglichte.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur und verwandte Methoden

Kultivierung von murinen embryonalen Fibroblasten

Immortalisierte MEFs wurden bei 20% O₂ und 5% CO₂ in Standard DMEM auf Zellkulturplatten (Durchmesser 10 cm) kultiviert. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie im Verhältnis 1:10 jeden zweiten bis dritten Tag gesplittet. Zum Splitten wurden die Zellen mit PBS gewaschen und danach trypsinisiert.

Standard DMEM: DMEM, 4,5 g/l Glucose, 10% FCS, 1% Glutamin, 50 U/ml Penicillin G, 50 µg/ml Streptomycin

PBS: 8,00 g NaCl, 0,20 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ in 1 l H₂O, pH 7,4

Bestimmung der Zellzahl

Nachdem die Zellen von den Zellkulturplatten mittels Trypsin abgelöst wurden, wurden sie in 5 ml DMEM überführt. 10 µl der Zellsuspension wurden auf eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gegeben und mithilfe dieser die Zellzahl bestimmt.

Standard DMEM: DMEM, 4,5 g/l Glucose, 10% FCS, 1% Glutamin, 50 U/ml Penicillin G, 50 µg/ml Streptomycin

PBS: 8,00 g NaCl, 0,20 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ in 1 l H₂O, pH 7,4

Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden auf den Zellkulturplatten bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurde das Volumen der Zellsuspension mit der gewünschten Zellzahl im Medium abzentrifugiert und das Pellet im Einfriermedium resuspendiert. Pro

Kryovial wurden etwa 1×10^6 Zellen/ml eingefroren. Zunächst wurden die Zellen über Nacht in Propanol-Behältern bei -80°C und danach in flüssigem Stickstoff gelagert.

Bei Bedarf wurden die Kryovials im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und sofort in 4 ml Standard DMEM überführt. Nach Abzentrifugieren des Zellpellets wurde dieses in 10 ml Standard DMEM resuspendiert und auf eine Zellkulturplatte mit 10 cm Durchmesser ausgesät.

Einfriermedium: Standard DMEM, 10% DMSO

Standard DMEM: DMEM, 4,5 g/l Glucose, 10% FCS, 1% Glutamin, 50 U/ml Penicillin G, 50 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin

2.2.2. Proteinaufreinigung

Proteinextraktion aus murinen embryonalen Fibroblasten

Proteinextrakte erhielt man durch das Lysieren von Zellen (in der Regel von 10 cm Zellkulturplatten) in LCW-Lysis-Puffer (enthält Protease Inhibitor Cocktail, Roche Diagnostics). Die Zellkulturplatten wurden zweimal mit PBS gewaschen, um Serumreste zu entfernen. Nach Zugabe von 2 ml Lysispuffer auf eine Zellkulturplatte, wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers von der Platte gelöst und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach der Ultraschallbehandlung wurden die Zellen für weitere 30 Minuten auf Eis mit dem Lysispuffer inkubiert. Danach wurde der Zellschrott durch Zentrifugation bei $10.000 \times g$ für 30 Minuten bei 4°C entfernt. Die Proteinlysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

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

Aufreinigung von TAPe (*Tandem-Affinity-Purification-enhanced*) getaggtten Proteinen

Die Zellen wurden von konfluenten Zellkulturplatten (10 cm Zellkulturschalen) hochgesplittet auf Zellkulturplatten mit 15 cm Durchmesser im Verhältnis 1:20. Für eine Reinigung wurden Zellen von fünf 15 cm Zellkulturplatten als Ausgangsmaterial eingesetzt. Nachdem die Zellen

eine Dichte von etwa 80% erreicht hatten (2 bis 3 Tage), wurden die Zellen mit BSO in einer finalen Konzentration von 100 μ M behandelt. 16 Stunden nach Behandlung wurden die Zellen zusätzlich mit tBOOH in einer finalen Konzentration von 100 μ M für 30 Minuten behandelt, um zusätzlichen Stress auf die Zellen auszuüben. Die Kontroll-Zellen blieben unbehandelt.

Die Zellen wurden zweimal in eisgekühltem PBS gewaschen und pro Reinigung (5 Zellkulturplatten) in 2 ml Lysepuffer lysiert (enthält Protease-Inhibitor-Cocktail von Roche Diagnostics). Nachdem die Zelllysate für 20 Minuten auf Eis inkubiert wurden, wurde der Zellschrott durch Zentrifugation bei 10.000 x g für 10 Minuten bei 4°C entfernt. Der Überstand wurde zusätzlich mit einem 22 μ m Sterilfilter von weiterem Zellschrott gereinigt, um zu verhindern, dass Zellpartikel die Säulen verstopfen. Anschließend wurde das Lysat mit 50 μ l Strep-Tactin Superflow bei 4°C in einem Drehrad für 2 Stunden inkubiert. Danach wurden die Proben in Microspin-Säulen (GE-Healthcare) überführt und bei Raumtemperatur für 30 Sekunden und 2.000 x g zentrifugiert, damit sich die *Beads* - bestehend aus an Strep-Tactin gebundenes Protein - auf den Säulen absetzen. Nach drei Waschschritten mit jeweils 500 μ l Waschpuffer und Zentrifugation, wie oben beschrieben, wurden die *Beads* in zwei Schritten mit jeweils 250 μ l Desthiobiotin-Elutionspuffer eluiert. Die Proben wurden dafür jeweils 3 Minuten mit dem Elutionspuffer auf Eis inkubiert und danach, wie oben beschrieben, zentrifugiert (2.000 x g für 30 Sekunden bei Raumtemperatur). Das Eluat wurde in eine neue Microspin-Säule überführt und danach mit 25 μ l Anti-FLAG-M2-Agarose bei 4°C für 2 Stunden im Drehrad inkubiert. Die *Beads* wurden einmal mit 500 μ l Waschpuffer gewaschen und anschließend dreimal mit 500 μ l TBS. Nach jedem Waschschrift wurde, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Die Proteine wurden mit jeweils 200 μ l FLAG-Peptide und zehnminütiger Inkubation auf Eis eluiert. An den Elutionsschritt schloss sich eine Zentrifugation bei 4.500 x g für eine Minute bei 4°C an. Die Proteineluate wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Bei Einfachaufreinigungen wurden die Arbeitsschritte nach der Elution mit Desthiobiotin beendet. Abweichend vom Vorgehen bei einer Doppelaufreinigung wurden nur 200 μ l Elutionspuffer verwendet. Die Proteine wurden in 2 Schritten mit jeweils 100 μ l Elutionspuffer, jeweils zehnminütiger Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation für eine Minute und 4.500 x g bei 4°C eluiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

PBS: 8,00 g NaCl, 0,20 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ in 1 l H₂O, pH 7,4

Lysepuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,5% Nonidet-P40, 10 mM Iodacetamid (direkt vor der Zellyse in Dunkelheit dazugegeben), 2% Protease-Inhibitor Cocktail, Roche Diagnostics

Waschpuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% Nonidet-P40

Strep-Tactin Superflow: 50% Suspension (IBA, Göttingen, Germany)

Desthiobiotin-Elutionspuffer: 10 x Puffer mit D-Desthiobiotin (IBA, Göttingen, Germany) in TBS

Anti-FLAG-M2-Agarose: aus der Maus (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland)

TBS: 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl

FLAG-Peptid-Elutionspuffer: FLAG Peptide (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland)

2.2.3. Proteinanalyse

SDS-PAGE

Die sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) Ist ein Verfahren zur Trennung von Proteinen und stellt eine Variante der Polyacrylamid-Elektrophorese dar. SDS als anionisches Detergenz ist Bestandteil des Polyacrylamid-Gels und überdeckt die positive Eigenladung der Proteine, sodass die Proteine gleichmäßig negativ geladen sind. Bevor die Proteine auf das Gel aufgetragen werden, werden sie bei 95°C denaturiert, sodass die Tertiär- und Sekundärstrukturen aufgelöst werden. Die Denaturierung der Proteine und das SDS führen zur Linearisierung der Proteine, was eine Auftrennung nach Peptidlänge, die sich annähernd proportional zur Molekülmasse verhält, erlaubt. Das Gel wird in eine Elektrophorese-Apparatur eingespannt und in Laufpuffer (TRIS-Glycin-Puffer-System) gelegt. Die Trennung der Proteine erfolgt durch Anlage einer elektrischen Spannung, die die Migration der negativ geladenen Proteine durch das Gel ermöglicht. Benutzt wird eine diskontinuierliche SDS-PAGE: Proteine werden zunächst im Sammelgel konzentriert, um anschließend im Trenngel separiert zu werden. Sammel- und Trenngel unterscheiden sich im pH-Wert und der Porengröße, die durch die Konzentration an Polyacrylamid bestimmt wird. Das Sammelgel besitzt einen neutralen pH-Wert und eine geringere Porengröße als das Trenngel (basischer pH).

Proteinkonzentrationen wurden mithilfe des BCA Protein Assay (Thermo Scientific) laut dem Herstellerprotokoll bestimmt. Proteinkonzentrationen aus den Einfach- und Zweifachaufreinigungen konnten nicht bestimmt werden, da sie aufgrund der sehr niedrigen Konzentrationen nicht messbar waren. Es wurden lediglich die gleichen Mengen an Proteinlysaten mit 6 x Laemmli-Puffer gemischt und für 7 Minuten bei 95 °C inkubiert. Das

Gel lief in Elektrophoresis Power Supply EV 202 (Consort) für 10 Minuten bei 60 Volt, danach bei 80 Volt, um die Proteine im Gel zu sammeln. Die Auftrennung wurde bei 100 V durchgeführt.

12% Trenn-Gel: 3,3 ml H₂O, 4 ml Acrylamid (29:1), 2,5 ml Tris HCl pH 8,8, 10% SDS, 100 µl APS, 4 µl TEMED

5% Sammel-Gel: 4,1 ml H₂O, 1 ml Acrylamid (29:1), 750 µl 1 M Tris HCl pH 6,8, 60 µl 10% SDS, 60 µl APS, 8 µl TEMED

Laemmli-Puffer (6 x): 375 mM Tris HCl pH 6,8, 9% SDS, 50% Glycerol, 0,3% Bromphenolblau, 9% 2-ME

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

Immunoblot/Western Blot

Proteine wurden vom Gel auf eine Hybond-ECL Nitrozellulose Membran (GE Healthcare Europe GmbH) in einer mit Transferpuffer gefüllten Transferkammer (TE 22 Mini Tank Transer Unit, GE Healthcare Europe GmbH) bei 110 V, 450 mA für eine Stunde und 30 Minuten übertragen. Die Membranen wurden zunächst mit 5% BSA in TBS-T für eine Stunde und 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt, bevor sie mit dem Primärantikörper für mindestens 12 Stunden bei 4°C inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurden die Membranen drei Mal mit TBS-T für jeweils 5 Minuten gewaschen und danach für mindestens 90 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Bevor die Protein-Antikörperkomplexe mithilfe einer Detektionslösung (ECL detection system, GE Healthcare Europe GmbH) auf einem Röntgenfilm visualisiert wurden, wurden die Membranen dreimal für 5 Minuten mit TBS-T gewaschen.

Aus Gründen des Proben- und Materialverbrauchs wurden Membranen gegebenenfalls zur Wiederverwendung nach einem Western Blot mit 0,5 M NaOH-Lösung bei zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur gestrippt, um die Antikörperkomplexe zu entfernen. Anschließend wurde zweimal mit TBS-T für 10 Minuten gewaschen und die Membranen mit 5% BSA geblockt. Das weitere Vorgehen war wie oben beschrieben.

Transferpuffer: 100 ml Laufpuffer 10 x (siehe SDS-PAGE), 300 ml Methanol, 700 ml H₂O

TBS-T: 25 mM TRIS, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20

Blocking Puffer: 5% BSA in TBS-T

Silber-Färbung

Nach der SDS-Gelelektrophorese wurde das Gel sofort in 200 ml 20% Trichloressigsäure für mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurde das Gel für zwei Mal 30 Minuten in 200 ml 40% Ethanol-, 10% Essigsäure-Lösung gegeben. Das Gel wurde anschließend zweimal in reichlich Wasser gewaschen und zur weiteren Fixierung für 30 Minuten in 10% Glutaraldehyd-Lösung gegeben. Danach wurde abermals mit Wasser für zwei Mal 30 Minuten gewaschen. Für die Silber-Färbung wurde das Gel in Silber-Diamin-Lösung für 30 Minuten geschwenkt, woraufhin drei fünfminütige Waschschrte mit H_2O_2 folgten. Anschließend wurden mithilfe der Entwicklerlösung die Proteinbanden als dunkle braune Banden sichtbar gemacht. Dann wurde das Gel in Abstopplösung gegeben. Vor dem Aufbewahren oder Trocknen wurde das Gel mit Wasser gewaschen.

Fixierlösung: 20% TCA -Lösung

Sensibilisierungslösung: 10% Glutaraldehyd-Lösung

Silber-Diamin-Lösung: 42 ml 0,36% NaOH, 3,05 ml 32% Ammoniak, 8 ml 20% Silbernitrat-Lösung (1,6 g Silbernitrat in 8 ml H_2O), 147 ml H_2O

Entwickler-Lösung: 1 ml 1% Zitronensäure-Lösung, 101 μl 37% Formaldehyd, 199 ml H_2O

Abstopplösung: 40% Ethanol-, 10% Essigsäure-Lösung

2.2.4 Aufbereitung der Proben für die Massenspektrometrie

Chloroform-Methanol Fällung

Für die Fällung der Proteine wurden 200 μl Proteineluat mit 800 μl (vierfaches Volumen) 100% Methanol und anschließend 200 μl (einfaches Volumen) Chloroform jeweils gemischt und bei 9.000 x g für eine Minute zentrifugiert. Anschließend wurden 600 μl (dreifaches Volumen) destilliertes Wasser (HPLC- H_2O) dazugegeben und kräftig gemischt, bis die Lösung milchig wurde. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 9.000 x g bildeten sich zwei Phasen, wovon die obere klare Phase abgenommen wurde. Die Proteine, welche sich in der Interphase befanden, wurden durch Zugabe von 600 μl (dreifaches Volumen) Methanol, Vortexen und Zentrifugation (15.000 x g, 2 Minuten) als Präzipitat sichtbar. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpräzipitat für die weitere Verarbeitung getrocknet.

Insoluble-RapiGest-Verdau mit Trypsin

Das Präzipitat wurde in 30 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat resuspendiert, anschließend wurden 3 µl RapiGest und 1,5 µl 100 mM DTT dazugegeben und für 30 Minuten bei 60 °C und 600 rpm geschüttelt. Nach dem Abkühlen für 5 Minuten auf Raumtemperatur wurden die Proben mit jeweils 1,5 µl frisch angesetztem 300 mM Iodacetamid für 30 Minuten im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 1,5 µg Trypsin dazugegeben und für mindestens 12 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zum Beenden der Trypsinierung wurden die Proben mit 3 µl 32% HCl angesäuert und anschließend für 30 Minuten bei 4° C im Dunklen inkubiert, um das RapiGest auszufällen. Danach wurden die Proben in Polypropylenröhrchen (PpInserts, Supelco) überführt und bei 4°C und 16.000 x g zentrifugiert. Es entstanden drei Phasen, von denen die mittlere Phase für die Analyse in der Massenspektrometrie (MS) verwendet wurde.

2.2.5 Massenspektrometrie

Die aufgereinigten Proben wurden mithilfe der MS von unserer Kooperationspartnerin Dr. Stefanie Hauck, Helmholtz Zentrum München (Abteilung Proteanalytik) analysiert. Nach dem Verdau der Proteineluate mit Trypsin wurden die Peptide durch die *high-performance liquid chromatographie* (HPLC) getrennt. Anschließend wurden die Peptid-Ionen von dem LTC Orbitrap XL Massenspektrometer (Thermo Fischer Scientific) detektiert und fragmentiert. Die durch die Fragmentierung erzielten Spektren (MSMS Spektren) dienen als Grundlage zur Identifizierung der Peptide durch Abgleich mit *in silico* vorhergesagten Spektren aus Proteindatenbanken. Die Analysen an der Orbitrap zeichnen sich durch eine hohe Genauigkeit, eine sehr gute Auflösung, hohe Sensitivität und Fragmentierungseffektivität aus und sind daher geeignet für die Analyse von möglichen GPx4-Bindungspartnern. Die Spektren der einzelnen Proben wurden mittels LC-MS (*Liquid chromatography/ mass spectrometry*) Progenesis Software (Version 2.5) vergleichend quantifiziert, wobei die relative Quantifizierung auf dem Vergleich der Intensitäten der Peptide jedes Proteins über alle Proben basiert. Dabei wurden die Abundanzen auf die ursprünglichen Häufigkeiten normalisiert, um experimentell bedingte Abweichungen zu korrigieren. Die daraus resultierenden normalisierten Häufigkeiten wurden zur statistischen Analyse (ANOVA) von Varianzen zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen

genutzt. Die Häufigkeiten aller einzelnen Peptide, die einem Protein zuzuordnen sind, flossen kumulativ in die quantitative Analyse ein. Die Identifizierung der Proteine wurde mithilfe von Mascot (Version 2.2) durchgeführt auf Basis der Ensembl Datenbank (Spezies: Maus). Die Ergebnisse der MS-Analyse lieferten die Basis für die Validierung von möglichen Interaktionspartnern.

3. Ergebnisse

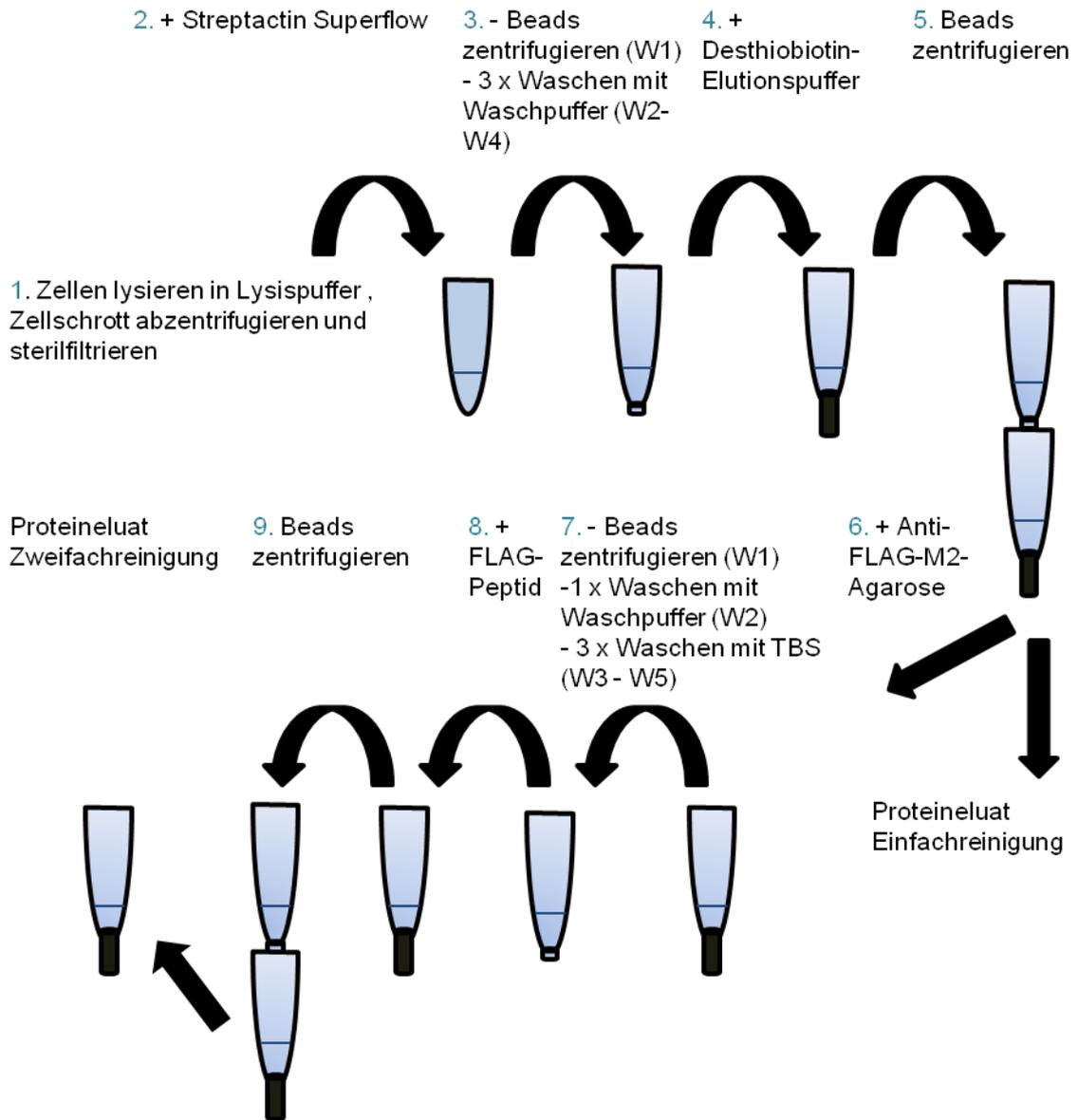
3.1 Ein Blick auf die Methoden

3.1.1 Prinzip der Proteinaufreinigung von Flag-Strep-getaggten Proteinen

Die Isolierung und Identifizierung von Multiproteinkomplexen stellen wichtige Schritte in der Entschlüsselung von Interaktionspartnern von Proteinen und somit von Signalwegen dar. Eine Methode, die diese Schritte ermöglicht, ist die *Tandem-Affinity-Purification* (TAP), erstmals angewandt und beschrieben von Rigaut und Kollegen sowie Puig und Kollegen (Puig et al., 2001; Rigaut et al., 1999). Das Prinzip hinter dieser Methode ist die Herstellung eines Fusionsproteins, bestehend aus dem Zielprotein und dem TAP-Tag, mithilfe dessen das Zielprotein und seine Bindungspartner in zwei konsekutiven Reinigungsschritten aus Zelllysaten isoliert werden können.

Gloeckner und Kollegen entwickelten einen neuen Tandem-Tag bestehend aus einem Strep-Tag mit einem Flag-Tag (Gloeckner et al., 2007). Dieser Tag erwies sich als eine verbesserte Kombination im Hinblick auf die dadurch zu erzielende Reinheit und Proteinausbeute sowie eines verringerten Zeit- und Materialaufwandes. Die Anwendung der SF (Strep-Flag-Tag)-TAP-Kombination ermöglichte zudem eine Reduktion der Tag-Größe um das Vierfache auf 4,6 kDa im Vergleich zum ursprünglichen Tag. Beide Tags können dank ihrer mittleren Affinität und Avidität zu ihren Bindungspartnern schnell durch kompetitive Mechanismen während der Elution unter den nativen Bedingungen von diesen getrennt werden, was eine Verkürzung der Inkubationszeiten um zwei Stunden im Vergleich zum TAP-Tag-Verfahren bedeutet. Dabei wird im ersten Schritt mithilfe von Desthiobiotin und im zweiten Schritt mithilfe des FLAG-Peptids eluiert. Bindungspartner können über kovalente Bindungen oder intermolekulare Wechselwirkungen an das Zielprotein gebunden sein. Abbildung 6 stellt den Ablauf des SF-TAP-Verfahrens dar.

A



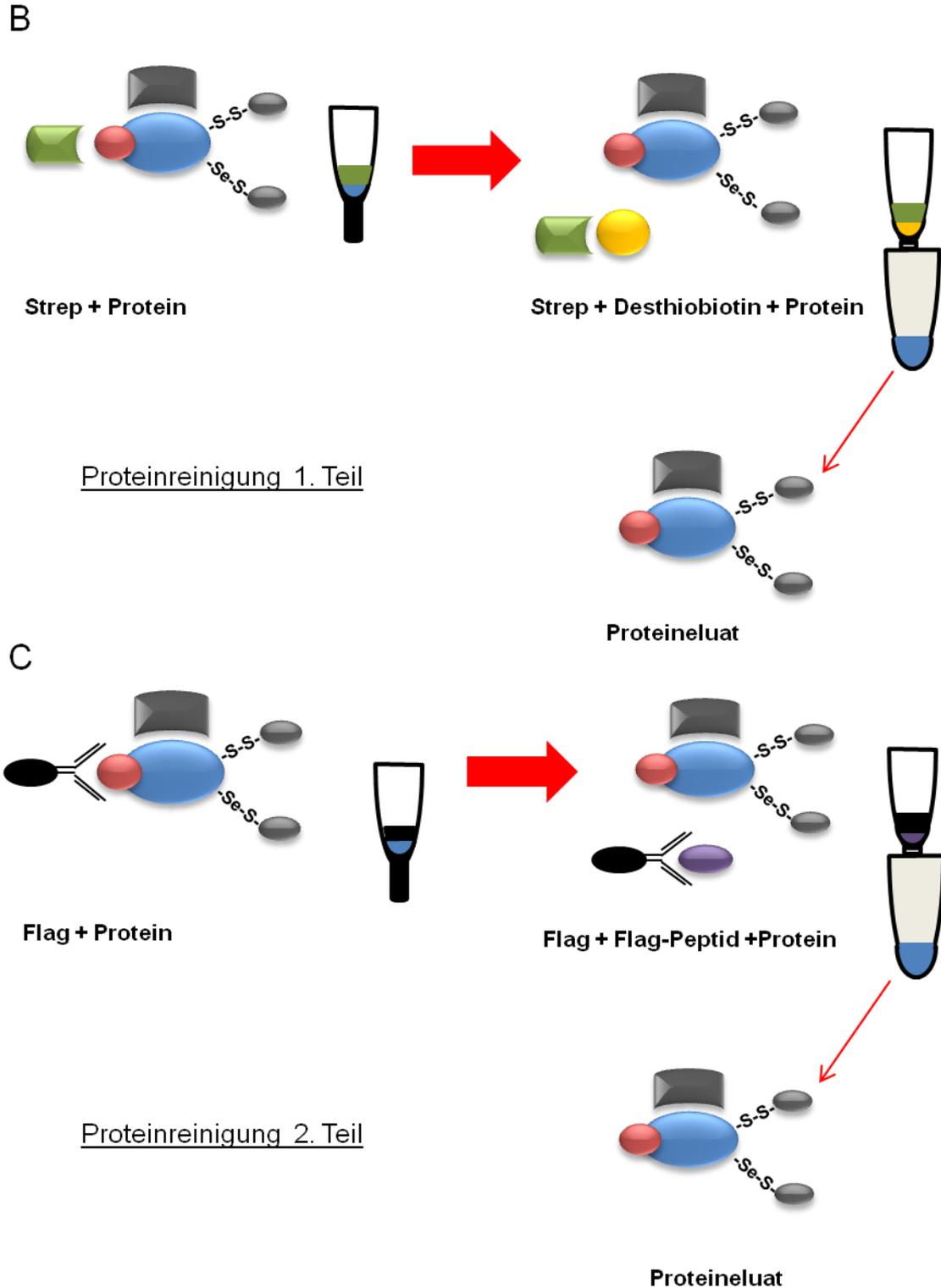


Abb. 6. Prinzip des SF-TAP-Verfahrens. (A) Schematischer Ablauf des SF-TAP-Verfahrens. (B) Erster Schritt der Proteinaufreinigung. SF-getaggetes (rot) GPx4 (blau) inklusive möglicher Interaktionspartner (grau) werden mit Strep-Tactin-Superflow (grün) inkubiert. Kompetitiv wird diese Bindung eluiert durch Desthiobiotin (gelb). Desthiobiotin bleibt mit den Strep-Tactin-Beads an der Säule hängen. Das Eluat wird aufgefangen und entweder nach einer Einfachaufreinigung gelagert und analysiert oder dem zweiten Schritt der Proteinaufreinigung zugeführt (C). Anti-FLAG-M2-Agarose (schwarz) wird zugegeben und nach der Inkubation mit dem FLAG-Peptid (lila) eluiert. Die Beads werden von der Säule zurückgehalten und das gewonnene Proteineluat bis zur Analyse aufbewahrt.

Das gewonnene Proteineluat kann auf verschiedenen Wegen analysiert werden: im Falle dieser Arbeit mithilfe der Massenspektrometrie oder durch Auftrennung der Komplexe durch ein SDS-PAGE-Gel mit anschließender Silberfärbung bzw. Immunoblots.

Abbildung 7 veranschaulicht die Schritte des TAP-Verfahrens (Abb. 7A). Aus Zelllysaten von Kulturen, die die GPx4 stabil überexprimieren, wurden in einer Doppelaufreinigung Proteineluate gewonnen. Von jedem einzelnen Waschschrift wurde ein Aliquot entnommen, und die Proteine auf einem SDS-PAGE Gel durch Elektrophorese getrennt und anschließend mithilfe der Silberfärbung sichtbar gemacht. Deutlich zu erkennen ist wie mit jedem Waschschrift die Proben von Proteinen gereinigt werden, die nicht getaggetes GPx4 sind oder mit diesem einen Komplex bilden. Leider lässt die Expression der exogenen GPx4 (24 kDa) mit zunehmender Zellpassage nach, sodass das aufgereinigte Eluat nur wenig Protein enthält, wie man an den schwachen Banden (Abb. 7B) erkennen kann. Dennoch kann es mit dem sehr genauen und sensitiven Verfahren der LC/MS (*Liquid chromatography/ mass spectrometry*) analysiert werden. Für Western Blots wurden hingegen Proteineluate von Einfachaufreinigungen verwendet, da dieses Verfahren für den Nachweis möglicher Interaktionspartner ausreicht. Bei Einfachaufreinigungen wurde das Experiment nach der Elution mit Desthiobiotin unter Auslassung des zweiten Aufreinigungsschrittes mit Anti-FLAG-M2-Agarose beendet. Das daraus gewonnene Eluat enthält mehr Proteine, was an zusätzlichen Banden bei 35, 45 und 55 in der Silberfärbung sichtbar wird (Abb. 6A, Spur E). Um sicher zu stellen, dass es sich bei diesen Banden um spezifisch an GPx4 gebundene Proteine handelt und nicht um nicht-spezifische Proteine aufgrund eines unzulänglichen TAP-Verfahrens, wurde eine Einfachaufreinigung mit Pfa1 mock Zellen als Kontrolle durchgeführt (Abb. 6C). Pfa1 mock Zellen besitzen statt der exogen exprimierten WT GPx4 den leeren Vektor. Zu erkennen ist, dass sich im Eluat weder die GPx4 noch nicht-spezifische Proteinbanden befinden; ein Indiz dafür, dass die Proteinaufreinigung spezifisch für das getaggte Protein ist, und sich keine Proteine aufgrund von Verunreinigungen oder einem wenig effektivem Verfahren im Eluat befinden. Zudem konnte man feststellen, dass die nicht-spezifischen Proteinbanden im Eluat von WT GPx4 exprimierenden Zellen nach der Einfachaufreinigung sich im Bezug auf die Aufreinigung der Pfa1 mock Zellen vor allem im Waschschrift 3 und 4 (Abb. 7C, Spur W3 und W4) wiederfinden. Besonders prägnant erscheint im GPx4 WT Eluat die Proteinbande bei 45 kDa, die sogar noch stärker im Rückstand von Strep-Tactin nach der Elution mit Desthiobiotin erscheint (Abb. 7A, Spuren Strep und E). Diese Bande kann man allerdings selbst im Strep-Tactin-Rückstand der Pfa1 mock Aufreinigung nicht finden. Deshalb muss man annehmen, dass die Proteine dieser Bande schon bei vorherigen Waschschriften entfernt wurden und deshalb an GPx4 assoziiert sind, wie auch die anderen Proteine bei 55 und 35 kDa.

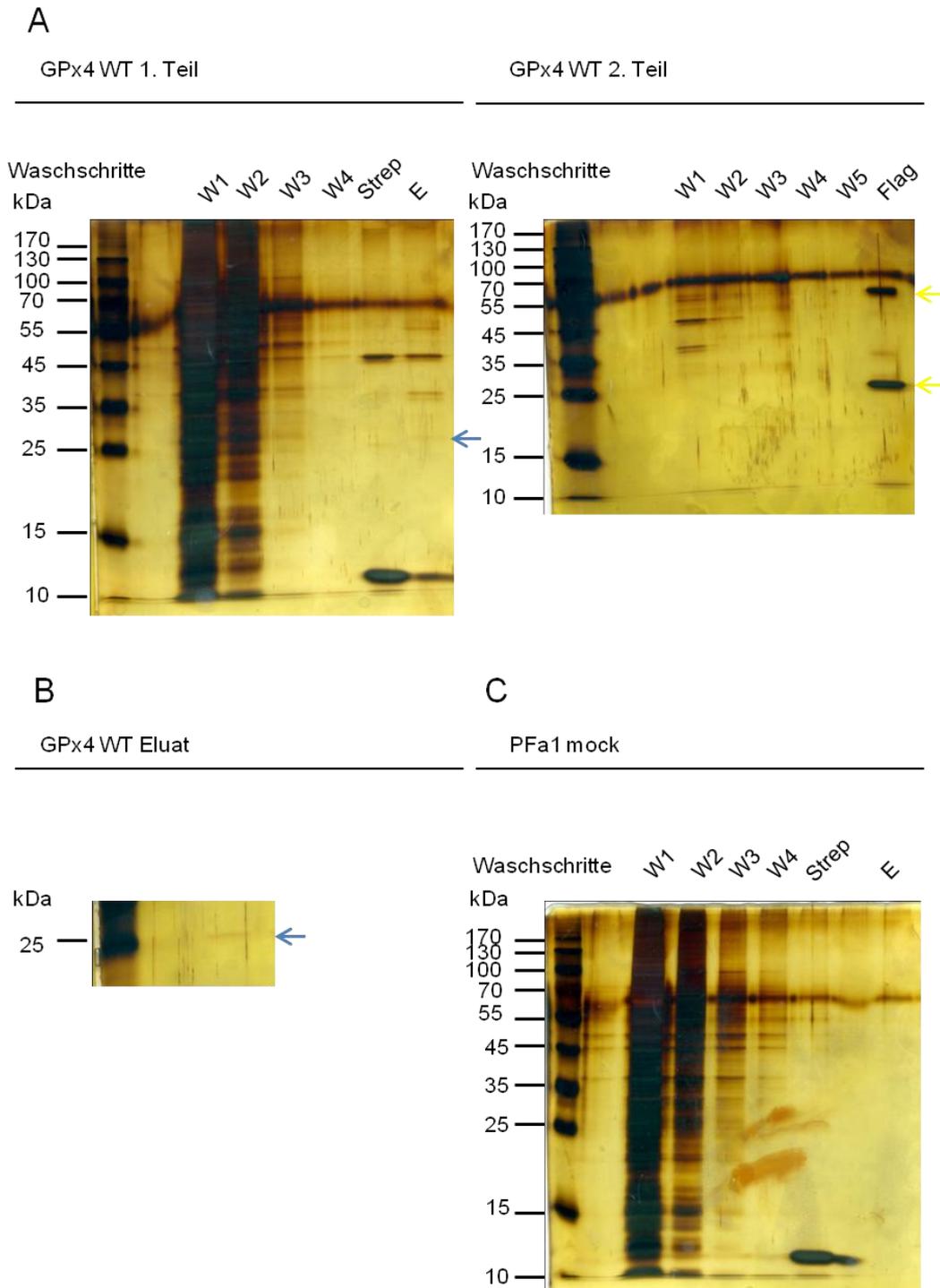


Abb. 7 Waschschrirte und Eluat von *GPx4 WT* (A und B) exprimierenden und PFa1 mock Zellen (C) nach der TAP. (A-D) *GPx4 WT*- und PFa1 mock-Zellen wurden in Gegenwart von 10 mM IAA lysiert. IAA verhindert durch irreversible Alkylierung und damit Blockierung der freien SH- und SeH- Gruppen eine unspezifische Ausbildung von inter- und intramolekularen Disulfidbindungen während des Aufreinigungsvorgangs. Proteinkomplexe wurden im Zug der TAP isoliert. (A) Strep-Tactin-Superflow (Spur Strep, 20 kDa) wurde mit einem blauen Pfeil markiert, Anti-FLAG-M2-Agarose (Spur Flag, 25 und 50 kDa) mit einem gelben Pfeil. Durch die anschließende Silberfärbung des Gels, wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht. Zu erkennen sind die mit jedem Waschschrirte der Doppelaufreinigung abnehmenden Mengen an Proteinen, die ausgewaschen werden. (B)

Getaggtetes GPx4 mit einer Größe von 24 kDa ist im Eluat als schwache Bande zu sehen (blauer Pfeil). (C) Waschschriffe und Eluat der Einfachaufreinigung von PFA1 mock- Zellen dienen als Kontrolle, in der kein GPx4 im Eluat nachweisbar ist (Spur E).

3.1.2 Aufreinigung von GPx4 Interaktionspartnern unter physiologischen Bedingungen und unter oxidativem Stress

GPx4 besitzt im Gegensatz zu anderen GPxs eine breite Substratspezifität sowohl hinsichtlich des Reduktans also auch des Oxidans (Ursini et al., 1995). Neben GSH als Reduktionsmittel können auch andere Proteinthiole als Elektronenquelle dienen, wie in der Spermienentwicklung gezeigt wurde (Maiorino et al., 2005b; Pfeifer et al., 2001; Schneider et al., 2009; Ursini et al., 1999)

Um Interaktionspartner der GPx4 sowohl unter physiologischen als auch unter oxidativen Stress Bedingungen zu identifizieren, wurden GPx4 WT Zellen und die all cys/ser WT Mutante sowie als Kontrollen die US Mutante und PFA1 mock Zellen mit Stress-induzierenden Agentien behandelt. BSO hemmt das entscheidende Enzym der GSH-Synthese, γ -GCS. Dadurch verringert sich in somatischen Zellen die zelluläre GSH-Konzentration um etwa 90% und somit den wichtigsten reduzierenden Reaktionspartner von GPx4. Durch diesen Schritt soll die GPx4 dazu gebracht werden, Thiole von Peptiden und Proteinen als Reduktans zu nutzen. Der GSH-depletierende Effekt von BSO tritt 12 - 24 Stunden nach Zugabe in das Zellkulturmedium ein. tBOOH induziert direkten oxidativen Stress und aktiviert damit verbundene Zelltod-Signalwege. Die Zellen wurden für 14 Stunden mit BSO in einer finalen Konzentration 100 μ M und zusätzlich für 30 Minuten mit tBOOH in einer finalen Konzentration von ebenfalls 100 μ M behandelt oder blieben als Kontrolle unbehandelt. Anschließend wurde die Proteinaufreinigung im TAP-Verfahren durchgeführt. Zellen, die für die anschließende Analyse durch die LC/MS bestimmt waren, wurden, wie oben erwähnt, einer Doppelaufreinigung unterzogen, bzw. einer Einfachaufreinigung für die anschließenden Immunoblots. Somit wurden Proteinkomplexe aus allen vier Zelllinien unter physiologischen Bedingungen und unter oxidativem Stress isoliert.

Abbildung 8 zeigt mögliche Proteinkomplexe, die auf einem 12% SDS-PAGE-Gel getrennt und durch die Silberfärbung visualisiert wurden. Dabei können die GPx4 Mutanten untereinander (GPx4 WT, US Mutante und All cys/ser, PFA1 mock zur Kontrolle) sowie die

isolierten Proteinkomplexe unter gestressten und physiologischen Bedingungen verglichen werden.

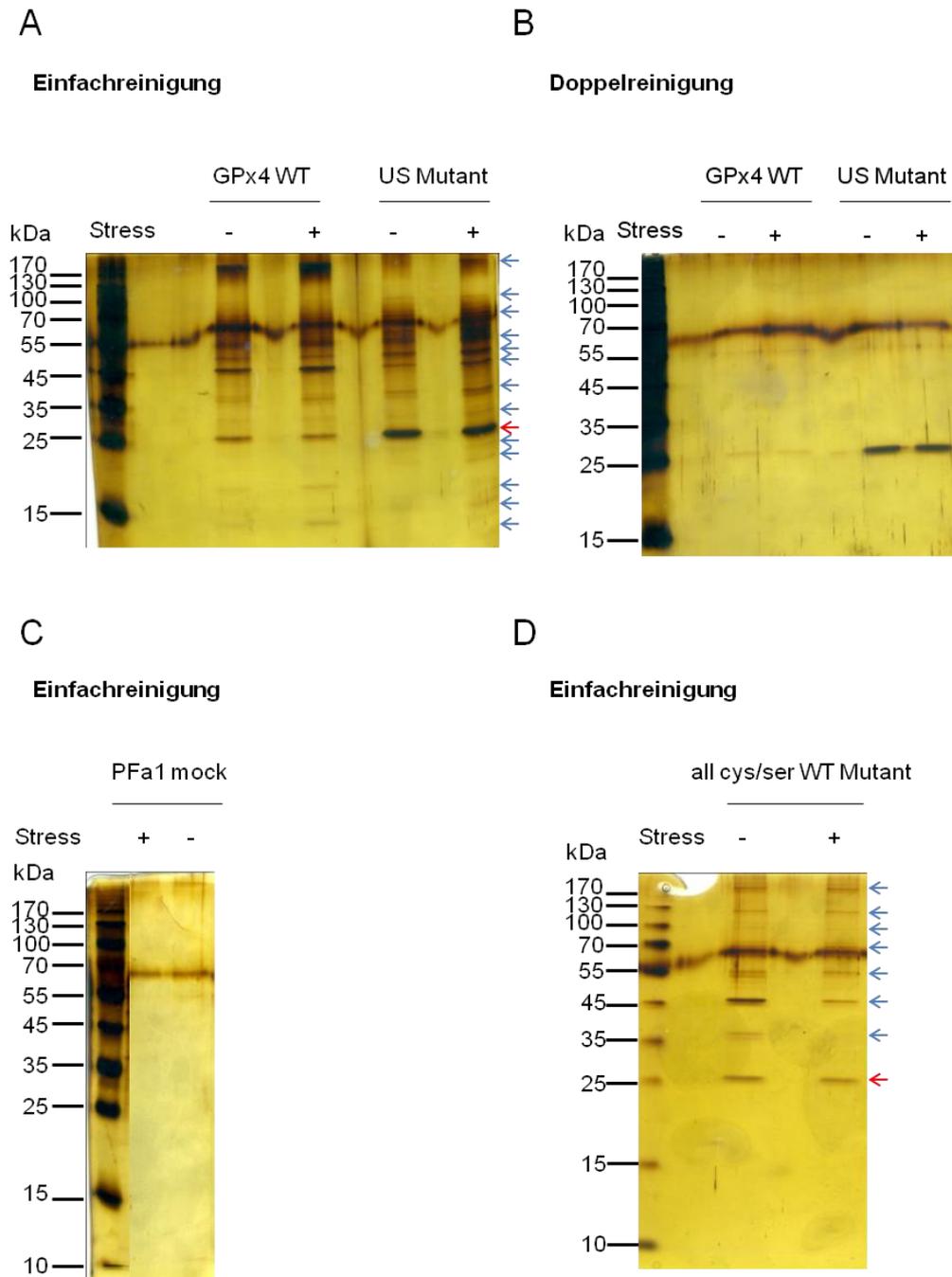


Abb. 8. Aufreinigung von an GPx4 assoziierten Proteine unter physiologischen Bedingungen und unter oxidativem Stress. Die verschiedenen Zelllinien wurden vor dem TAP-Verfahren mit BSO und tBOOH behandelt oder unbehandelt gelassen. 20 µl Proteineluat der Einfachaufreinigungen (A, C und D) und 10 µl der Zweifachaufreinigung (B) wurden durch Elektrophorese auf einem SDS-PAGE-Gel getrennt, und anschließend Proteinbanden durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Zusätzliche Proteinbanden sind mit einem blauen Pfeil und die GPx4 Bande mit einem roten Pfeil markiert.

In Abbildung 8A sind die Komplexe einer Einfachaufreinigung durch Silberfärbung eines SDS-PAGE-Gels und in Abbildung 8B die Komplexe einer Zweifachaufreinigung sichtbar gemacht. Deutlich zu erkennen ist, dass bei der Einfachaufreinigung mehr Proteine isoliert werden können im Gegensatz zur Zweifachaufreinigung, in der nur die GPx4-Bande bei 24 kDa erscheint. Diese zusätzlichen Proteinkomplexe scheinen bei den weiteren Waschschriften verloren zu gehen bzw. deren Konzentration unter die Detektionsschwelle der Silberfärbung zu sinken. Man kann ebenfalls festhalten, dass die US-Mutante der getaggen *GPx4* stärker exprimiert wird als die WT-Form, was man an der stärkeren Proteinbande erkennt. Bei der Einfachaufreinigung von PFa1 mock Zellen (Abb. 8C) wurden keine zusätzlichen Proteinkomplexe isoliert, woraus man schließen kann, dass neben der Verlässlichkeit des TAP-Verfahrens alle in den anderen Experimenten gefundenen Komplexe mit GPx4 assoziiert sein müssen.

Abbildung 8D zeigt die Einfachaufreinigung von GPx4 in dem alle 8 Cys-Reste (außer das katalytische aktive Sec) zu Serin mutiert wurden (Mannes et al., 2011). Dadurch sollten kovalente Bindungen von Proteinen an die nicht-katalytischen Cys verhindert werden. Proteinkomplexe, die mit dieser Mutante der *GPx4* isoliert wurden, sind somit entweder kovalent an das katalytische Zentrum gebunden oder über intermolekulare Wechselwirkungen an die GPx4 assoziiert. Interessanterweise wurde ein Proteinkomplex bei 130 kDa sichtbar, der bei allen anderen Experimenten nicht isoliert werden konnte (Abb. 8D und Tabelle 1). Berücksichtigt werden sollte bei allen Überlegungen allerdings, dass die Aufreinigung von GPx4 WT wegen der geringen Expression auch eine geringere Menge an zusätzlichen Proteinkomplexen nach sich zieht, die sich in schwächeren Banden bzw. nicht-detektierbaren Mengen auf dem SDS-PAGE-Gel ausdrücken.

Tabelle 1 Verteilung und Intensität der isolierten Proteinbanden bei den verschiedenen Mutanten.

Protein-komplex bei (kDa)	GPx4 WT	GPx4 WT Stress	US Mut.	US Mut. Stress	All cys/ser	All cys/ser Stress
>170	-	-	-	-	(+)	(+)
170	++	+++	-	+	+	+
130	-	-	-	-	+	+
100	(+)	(+)	+	+	(+)	(+)
70*	+	+	+	++	(+)	(+)
55*	++	++	++	+++	++	+
50	+	+	++	+++	(+)	(+)
45	++	+++	+	++	++	+
35*	+	+	+	++	+	-
27	(+)	(+)	(+)	+	-	-
22	-	-	(+)	+	-	-
20	-	-	(+)	+	-	-
17	(+)	+	-	-	-	-
15	-	-	(+)	+	-	-
13	(+)	+	-	-	-	-

Isolierte Proteinkomplexe aus den Einfachaufreinigungen und deren entsprechenden Größen wurden anhand ihres Vorkommens in den unterschiedlichen Mutanten (+ oder -) und anhand ihrer relativen Stärke ((+),+, ++, +++) zueinander verglichen (* Doppelbande).

3.1.3 Aufreinigung von GPx4 Interaktionspartnern unter Aufhebung von Disulfid- und Selenylsulfidbindungen

Aus den Ergebnissen der oben beschriebenen Proteinreinigungen ergibt sich die Frage, ob die an die GPx4 assoziierten Proteinkomplexe über Disulfid- oder Selenylsulfidbrücken gebunden sind oder über andere intermolekulare Wechselwirkungen mit GPx4 komplexieren. Um dieser Frage Rechnung zu tragen, wurden Zellen der all cys/ser WT Mutante, wie oben beschrieben, entweder durch Zugabe von BSO und tBOOH oxidativem Stress ausgesetzt oder unbehandelt gelassen. Zusätzlich wurden die Proteineluate mit Dithiotreitol (DTT) inkubiert oder im Fall der Kontrolle unbehandelt gelassen. DTT reduziert Disulfidbrücken, trennt daher kovalent an Cys oder Sec gebundene Proteine und löst damit solche Proteinkomplexe auf. In Abbildung 9 ist die Silberfärbung des SDS-PAGE-Gels nach Auftrennung der Waschschriffe und der Proteineluate dargestellt.

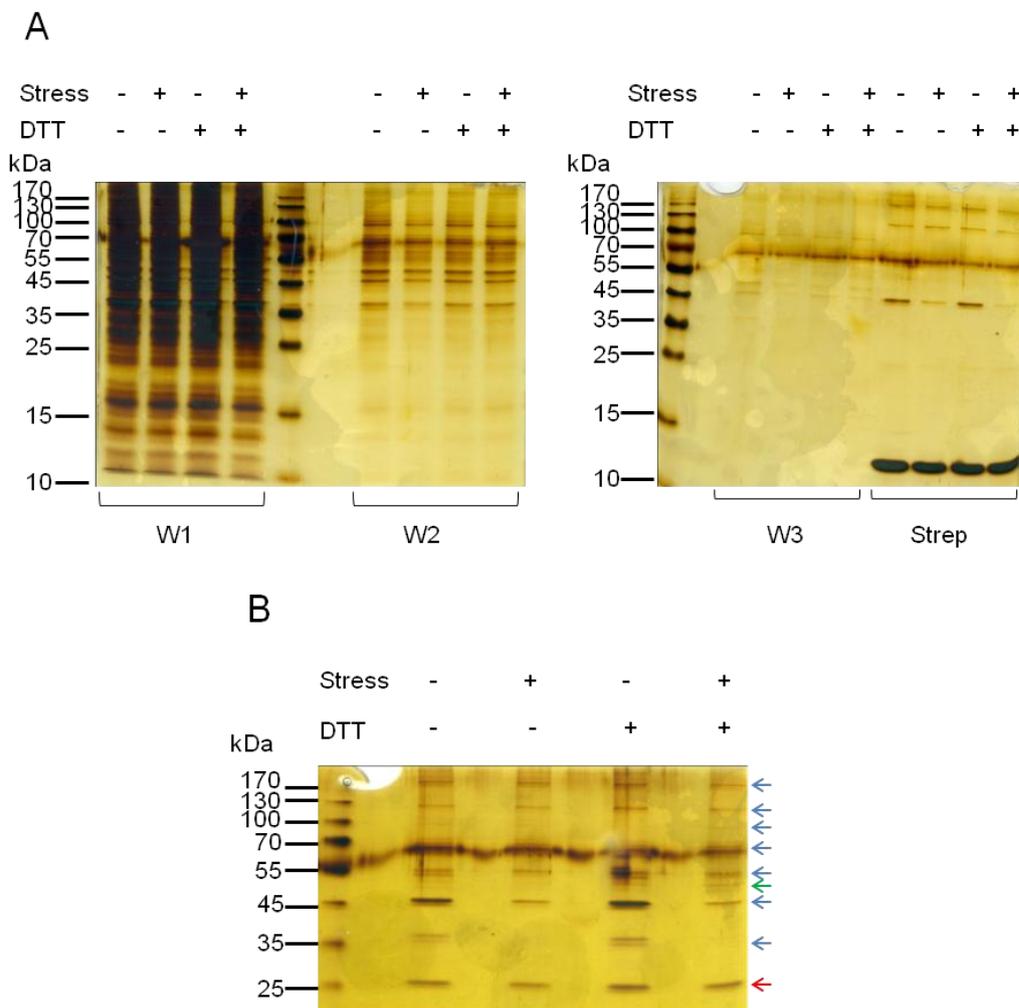


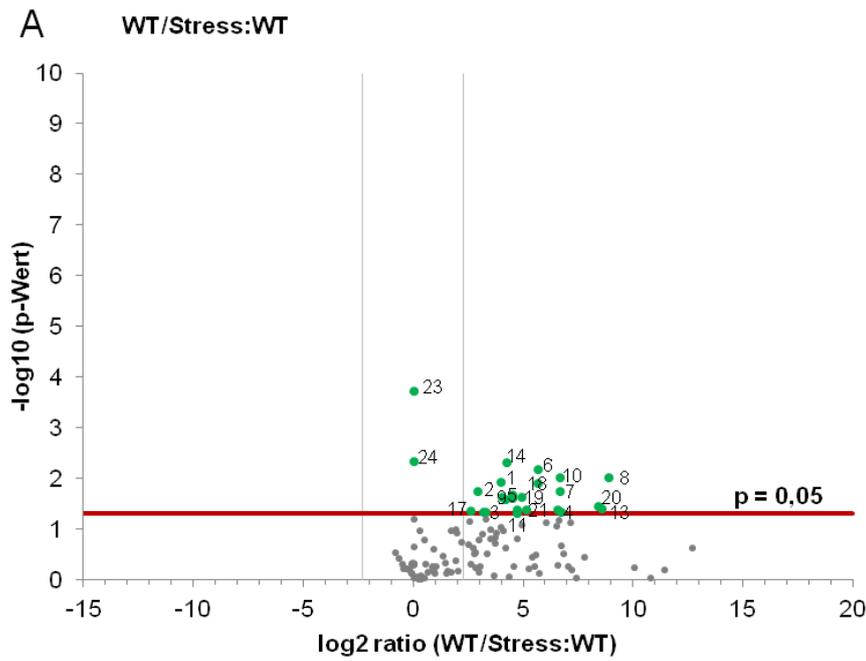
Abb. 9. Silberfärbung einer Einfachaufreinigung der all *cys/ser* WT Mutante unter Zugabe von DTT. In (A) sind die Waschschrte dargestellt und in (B) die Eluate. Zusätzliche Proteinbanden sind mit einem blauen Pfeil gekennzeichnet, die GPx4-Bande mit einem roten Pfeil. Bei 48 kDa konnte eine Bande nur bei Zugabe von DTT nachgewiesen werden, die deutlicher unter oxidativem Stress (BSO, tBOOH) erkennbar ist (grüner Pfeil). Von den Waschschrten und Proteineluaten wurden jeweils 20 μ l auf dem SDS-PAGE-Gel getrennt.

Zellen wurden mit 100 μ M BSO für 16 Stunden und anschließend 100 μ M tBOOH für 30 Minuten inkubiert oder unbehandelt gelassen. Es folgte eine Einfachreinigung mit Strep-Tactin Superflow. In den Waschschrten 1 und 2 wurde jeweils 10 mM DTT zum Waschpuffer gegeben und die *Beads* für jeweils 10 Minuten inkubiert. Die Kontrollen wurden ohne Zusatz von DTT mit Waschpuffer inkubiert. Waschschritt 3 erfolgte für alle Proben ohne DTT-Zugabe. Anschließend wurde mit Desthiobiotin eluiert. Bis auf eine zusätzliche Bande bei 48 kDa nach Zugabe von DTT (grüner Pfeil) lassen sich keine Unterschiede der Proteinbanden im Fall der Eluate (Abb. 9B) erkennen. Auch die Waschschrte (Abb. 9A) weisen keine Unterschiede im Muster der Proteinbanden auf. Man kann daher

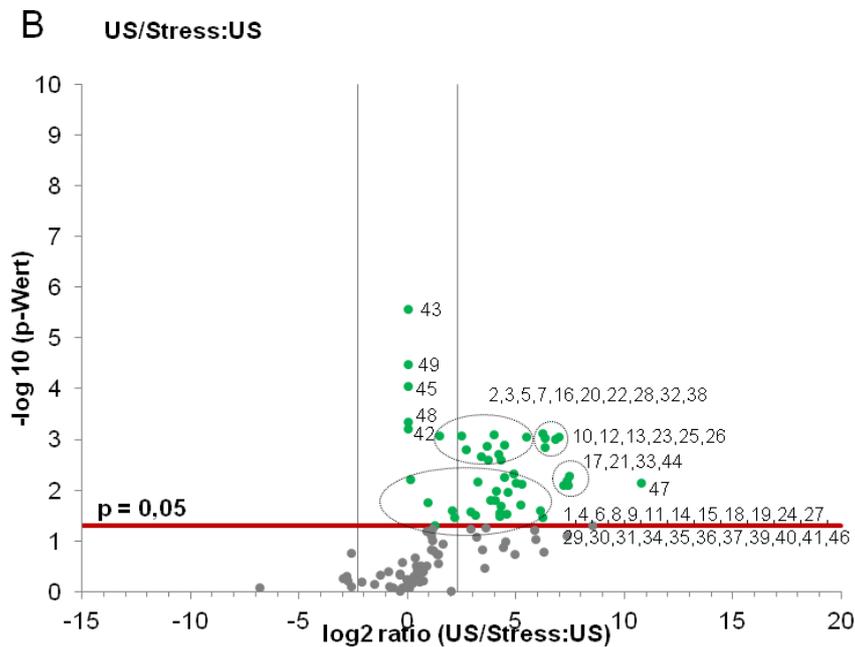
schlussfolgern, dass die isolierten Proteine über nicht-kovalente Wechselwirkungen an GPx4 assoziiert sein müssen.

3.2 Analyse von GPx4 Interaktionspartner durch die *Liquid chromatography*/Massenspektrometrie

Die aus den Zweifachreinigungen gewonnenen Proben wurden von unserer Kooperationspartnerin Dr. Stefanie Hauck (Helmholtz Zentrum München, Abteilung Proteomanalytik) mithilfe der Massenspektrometrie analysiert. Die daraus erhaltenen Daten möglicher neuer Interaktionspartner wurden statistisch ausgewertet und zur Verbesserung der Anschaulichkeit mithilfe von Tabellen (Tabellen siehe Anhang) und Volcano Plots ausgearbeitet (Abb. 10A-E). In diesen Diagrammen wurden jeweils die Ergebnisse zweier Proben miteinander verglichen, und die Anreicherung von Bindungspartnern dargestellt. Allerdings kann man diese Vergleiche zwar aus qualitativer, jedoch nur bedingt aus quantitativer Sicht sehen, da die Expression der einzelnen Mutanten der *GPx4* aufgrund der lentiviralen Expression nicht reguliert werden konnte. Da die *US-Mutante* um etwa das 4-fache stärker exprimiert wird als die *GPx4 WT* Mutante und auch die Expression der *all cys/ser* Mutante höher ist im Vergleich zur *GPx4 WT*, konnte aus den Reinigungen dieser Mutanten mehr potenzielle Interaktionspartner gewonnen werden (Mannes et al., 2011). Dies kann fälschlicherweise den Eindruck erwecken, dass diese Mutanten mehr Bindungspartner besitzen. Nichtsdestotrotz kann man erkennen, dass im Vergleich zu unbehandelten Proben unter oxidativem Stress mehr mögliche Bindungspartner isoliert werden konnten (Abb. 10A,B,E). Bei dem Vergleich der Aufreinigung der WT Mutante und der US Mutante (Abb. 10C) fällt auf, dass mehr Proteine in den Proben der US Mutante isoliert wurden, was vermutlich durch die erhöhte Expression und damit auch Menge an Protein der US Mutante erklärt werden kann (siehe oben).

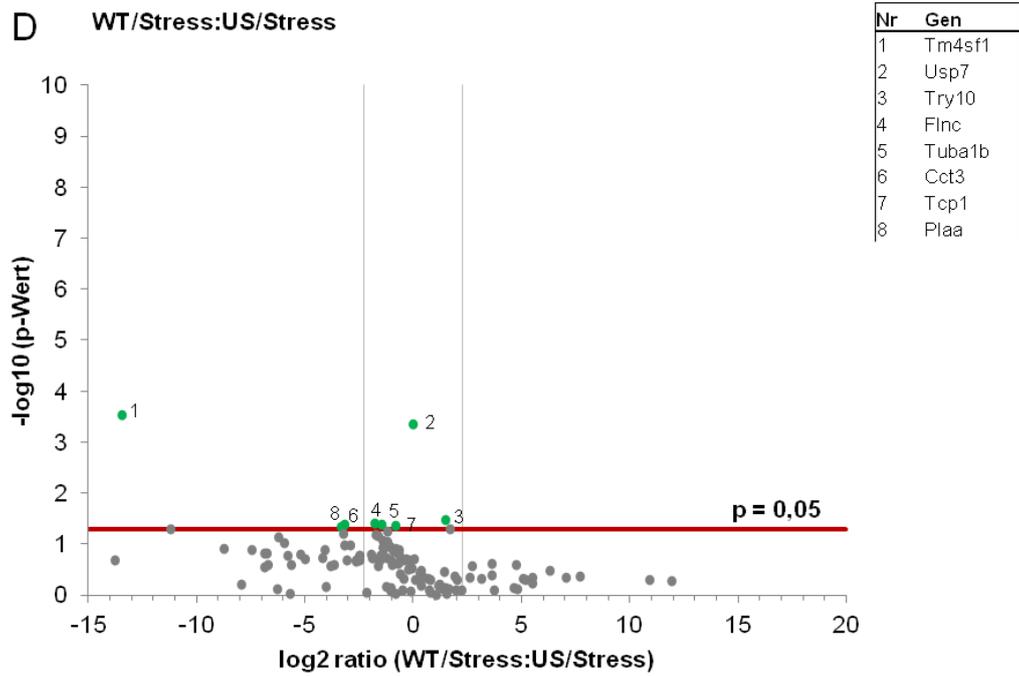
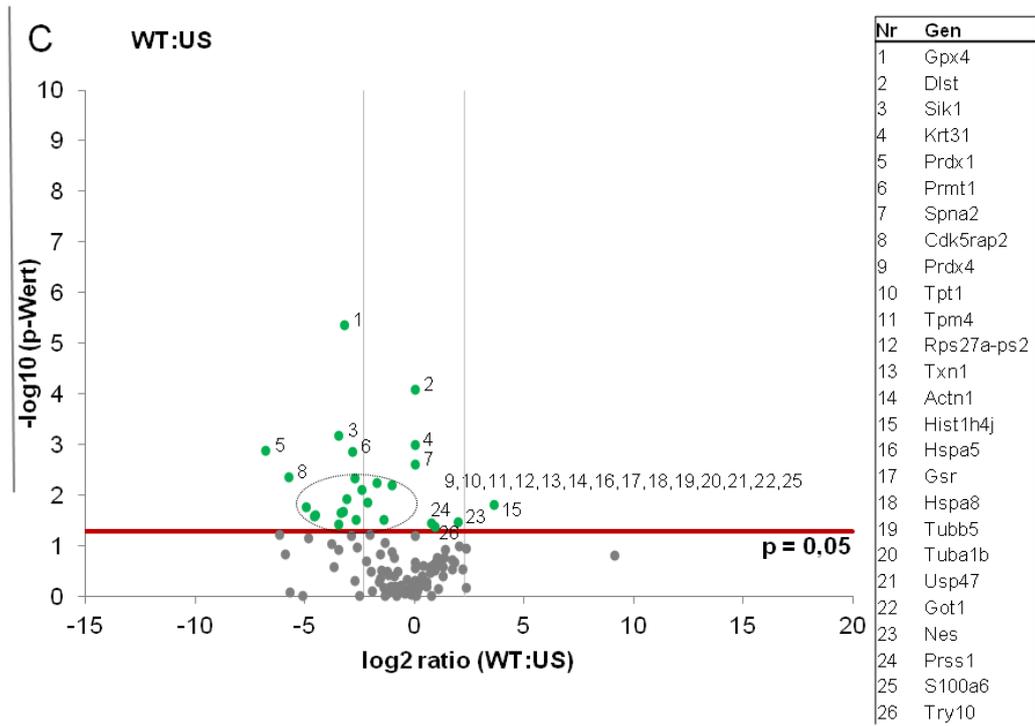


Nr	Gen
1	Finc
2	Tcp1
3	Dhx15
4	Ankrd50
4	Usp47
	Plaa
5	Uba1
	Hspa5
6	Hsph1
7	Prmt1
8	Gsr
9	Tubb5
	Cct4
10	Cryz11
11	Tpi1
	Txn1
12*	Hspa5
13	Flna
14	Tuba1b
15*	Cct4
16*	Ankrd50
	Rps27a-ps2
17	Cct6a
18	Cct5
19	Ywhae
20	Spag7
22*	Txn1
23	Lgals1
24	Tor1aip2
25*	Plaa



Nr	Gen
1	Gpx4
2	Actn1
3	Cct2
4	Finc
5	Tpm4
6	Tcp1
7	Hspa4
8	Dhx15
9	Eif5a
10	Usp47
11	Uba1
12	Prmt1
13	Gsr
14	Cct7
15	Myh9
16	Prdx4
17	Cryz11
18	Tpi1
19	Rnh1
20	Tpm3
21	Cpne3
22	Got1
23	Cct3
24	Cct4
25	Faf1
26	Ubr7
27	Ankrd50
28	Ddb1
29	S100a11
30	Txnrd1
31	Cct6a
32	Tpt1
33	Dhps

34	Txn11	40	S100a6	46	Gm8894
35	Ywhae	41	Fasn	47	Tm4sf1
36	Spag7	42	Lgals1	48	Usp7
37	Prdx1	43	Shcbp1	49	Ap3b1
38	Cct8	44	Cpne1		
39	Txn1	45	Gars		



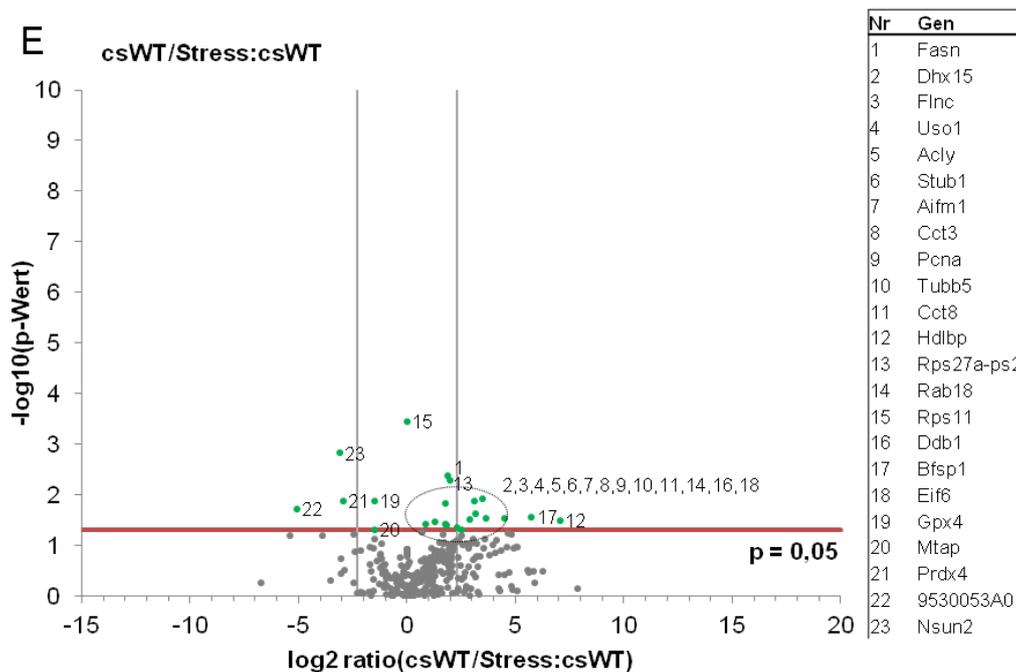


Abb. 10. Relativer Vergleich unter verschiedenen Bedingungen isolierter, möglicher GPx4-Bindepartner mittels Volcano Plot. (A-E) In den einzelnen Diagrammen wurden je zwei Experimente miteinander verglichen. Jedes Experiment wurde drei Mal wiederholt. Aus den Abundanzen der identifizierten Proteine wurden die Mittelwerte gebildet, und das Verhältnis (*Ratio*) dieser Mittelwerte der beiden Experimente zueinander berechnet. Das Logarithmieren der *Ratio* und des p- Wertes ermöglichten die übersichtliche Darstellung aller Werte in einem Diagramm. Die Grenzen wurden arbiträr auf $p = 0,05$ (rote Linie) und einer 5-fachen Anreicherung ($\log_2 \text{ratio}(5) = 2,3$; graue Linien) gelegt. Alle Bindungspartner mit einem p-Wert $> 0,05$ und einer *Ratio* < 5 wurden als nicht signifikant erachtet. Alle Bindungspartner mit einem p-Wert $< 0,05$ wurden grün markiert und befinden sich oberhalb der roten Linie. Alle Bindungspartner mit einer *Ratio* > 5 befinden sich links und rechts der grauen Linien. Die Gen-Namen der Bindungspartner wurden durchnummeriert und sind in der Tabelle neben den Diagrammen zugeordnet. Im Diagramm erscheinen nur die Nummern. Der Anschaulichkeit halber wurden sehr eng zusammenstehende Punkte in einem Kreis zusammengefasst und die Nummern daneben aufgeführt. Im Plot A wurden die Gen-Namen von Punkten, die nicht eindeutig getrennt werden konnten unter einer Nummer aufgeführt und die eigentlich zugehörige Nummer mit einem * versehen.

In Tabelle A im Anhang sind die Bindungspartner, die in den einzelnen Experimenten isoliert wurden, ebenfalls nach p-Werten und Anreicherung aufgelistet. Zur weiteren Eingrenzung wurden zudem alle Proteine mit einer *Ratio* < 5 und einem *peptide count* von < 2 pro Protein in der Massenspektrometrie ausgeschlossen.

3.3 Bestätigung der GPx4 Interaktionspartner mittels co-Immunpräzipitation

Um mögliche Bindungspartner der GPx4 zusätzlich immunchemisch nachzuweisen, wurden 15 verschiedene Antikörper getestet, die auf Grundlage der bisher bekannten Funktionen im Redox-Metabolismus, in Zelltodsignalwegen und im Zellzyklus als Interaktionspartner der

GPx4 in Frage kommen könnten. Als Proben dienten die Proteineluate der Einfachaufreinigung von WT und US Mutante unbehandelt, unter oxidativem Stress in Form von BSO und tBOOH sowie die gestressten und unbehandelten Proben der all cys/ser Mutante mit und ohne Behandlung mit DTT. Als Kontrollgruppe wurden wiederum die Eluate der Pfa1 mock Zellen in gestresstem und unbehandeltem Zustand verwendet.

Bei der Analyse und Interpretation der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass die Qualität der Antikörper variiert und keine quantitativen Aussagen anhand der Stärke der Signale getroffen werden können, da die Expression und damit auch Proteinmengen der Mutanten nicht kontrolliert werden konnten. In Abbildung 11 ist der Immunoblot von GPx4 dargestellt.



Abb. 11. Immunoblot gegen die GPx4. (A) Als Proben dienten die Eluate der Einfachaufreinigung der WT und US Mutante sowie der all cys/ser Mutante unter normalen Bedingungen und oxidativem Stress (\pm Stress) und Zugabe von DTT (\pm DTT). In den Western Blot-Analysen der Pfa1 mock Zellen konnte kein GPx4 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Jeweils 20 μ l der jeweiligen Eluate wurden verwendet.

3.3.1 Peroxiredoxine

Peroxiredoxine (Prxs) sind eine Peroxidase-Familie, von denen bis heute um die 50 Isoformen entdeckt wurden (Wood et al., 2003). Säugetiere exprimieren 6 verschiedene Prxs, die zwischen 20 und 30 kDa groß (Prx1: 20 kDa, Pxr2: 20 kDa, Pxr3: 26 kDa, Pxr4: 28 kaA, Pxr5: 21 kDa, Pxr 6: 22 kDa) und in verschiedenen subzellulären Kompartimenten lokalisiert sind: Prx1, 2 und 6 lokalisieren im Zytosol, Prx3 in Mitochondrien, Prx4 im endoplasmatischem Retikulum und in Sekreten. Prx5 weist eine komplexe Verteilung auf und ist u.a. in Peroxisomen, Mitochondrien und im Zytosol zu finden. Außer Pxr6 besitzen sämtliche Säugetier-Prxs eine Thioredoxin-abhängige Peroxidaseaktivität und benutzen Thioredoxin, Txnrdn und NADPH als reduzierende Systeme. Eingeteilt werden können die Peroxiredoxine darüber hinaus auf der Grundlage von Sequenzanalysen in 2-Cys-Prx, Pxr II,

Pxr Q und 1-Cys-Prx. Während bei den ersten drei Gruppen 2 Cysteine an der katalytischen Reaktion beteiligt sind, ist es bei den 1-Cys Prx nur ein Cys ähnlich den GPxs (Brehelin et al., 2003; Rouhier and Jacquot, 2005). Alle haben einen gemeinsamen Reaktionsmechanismus, bei dem das katalytische Cys zur Sulfensäure oxidiert und anschließend schrittweise regeneriert wird durch verschiedene reduzierende Moleküle. Abhängig von dem jeweiligen Peroxiredoxin handelt es sich dabei um Thioredoxin, Glutaredoxin oder GSH. Pxr1-5 sind 2-Cys Pxrs (Rhee et al., 2005), Pxr5 ist ein Typ II Pxr (Knoops et al., 1999) und Pxr6 ein 1-Cys Pxr (Choi et al., 1998). Ihre Funktionen in der Redox-Regulation der Zelle werden in Zusammenhang mit Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose gebracht.

Abbildung 12 zeigt die Immunoblots von verschiedenen Proben, die mit Antikörpern gegen Prxs1 bis 6 getestet wurden. Als Proben dienten die Eluate, die auch für die Silberfärbung und für die LC/MS genutzt wurden: die Einfachaufreinigung der WT und US Mutante, die oxidativem Stress in Form von BSO und t-BOOH Zugabe ausgesetzt oder unbehandelt gelassen wurden, sowie die all cys/ser Mutante, die zusätzlichen zum oxidativen Stress noch mit DTT behandelt wurde (Abb. 12 A). Als Negativkontrolle wurden Proben der Pfa1 mock Zellen genutzt.

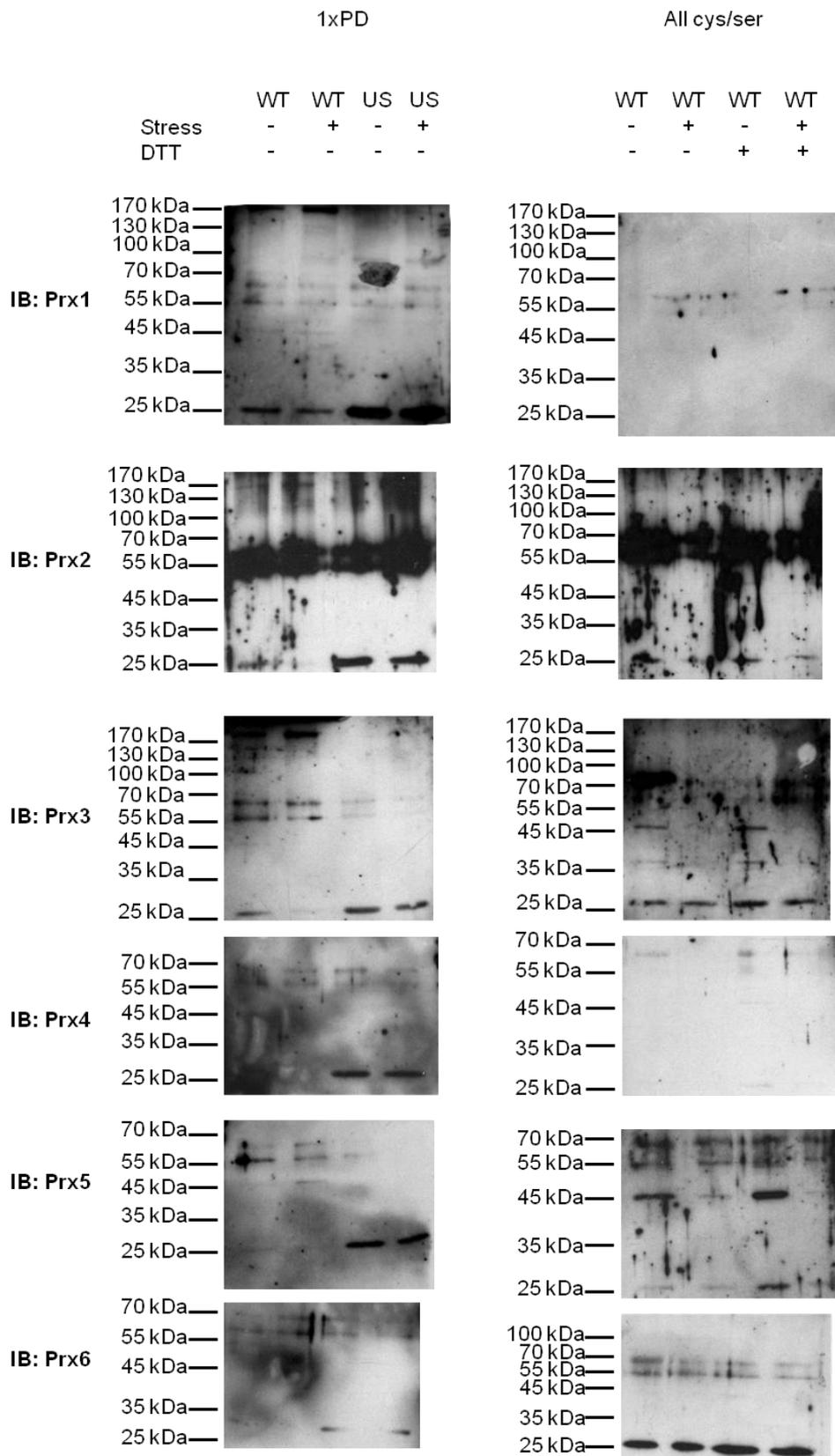


Abb. 12. co-Immunpräzipitation von Prx1-6. Proben der Einfachaufreinigung der GPx4 WT und US Mutanten unter normalen Bedingungen und unter oxidativem Stress sowie Proben der Einfachaufreinigung der all cys/ser Mutante unter normalen Bedingungen und oxidativem Stress mit und ohne DTT-Zugabe wurden mit Antikörpern gegen Prx1-6 getestet. Als Kontrolle dienten Eluate der Einfachaufreinigung von Pfa1 mock-Zellen unter

normalen Bedingungen und unter oxidativem Stress, die erwarteter Weise keine Banden ergaben (Daten nicht gezeigt). Jeweils 20 μ l der jeweiligen Proben wurden aufgetrennt. Die Banden bei 70 und 55 kDa sind unspezifische Antikörperbindungen.

Betrachtet man die Proben der Einfachaufreinigung so lassen sich in den Immunoblots gegen alle 6 Prxs Proteinbanden bei etwa 25 kDa detektieren, wobei diese hauptsächlich bei Proben der US Mutante deutlich wurden. Nur im Falle des Immunoblots gegen Prx1 waren deutliche Banden auch bei den Proben der WT-Mutante zu sehen. Allerdings konnte kein Unterschied zwischen unbehandelten und mit BSO/t-BOOH behandelten Proben festgestellt werden. Interessanterweise finden sich ausschließlich in den Proben der WT Mutante Banden bei 170 kDa in den Immunoblots gegen Prx1-3 (Abb. 12, Spuren 1 und 2).

Bei der all cys/ser Mutante wurden in den Analysen der Silberfärbung keine bemerkenswerten Unterschiede im Vergleich zur WT Mutante gefunden. Diese Beobachtung bestätigte sich bei den Immunfärbungen gegen die Prxs. Bei den Blots gegen Prx1 und 4 waren keine spezifischen Banden der Antikörper vorhanden. Im Falle für Prx2 konnten schwache Banden bei 25 kDa festgestellt werden, die bei den Immunoblots gegen Prx3 und vor allem 6 deutlich sichtbar waren. Auch der Blot gegen Prx5 ergab Banden bei 25 kDa, allerdings sehr schwach bei der Probe von all cys/ser WT mit und ohne Stress, dafür deutlich bei der all cys/ser WT Mutante mit DTT und ohne oxidativen Stress (Abb. 12, Spur 3). Darüber hinaus konnte man bei dem Western Blot gegen Pxr5 zusätzliche Banden bei 45 kDa detektieren, die besonders deutlich bei den nicht mit oxidativem Stress ausgesetzten Proben waren (Abb. 12, Spuren 1 und 3). Diese Banden ließen sich auch beim Blot gegen Pxr3 feststellen sowie weitere Banden bei 35 kDa, die ausschließlich bei den unbehandelten Proben zu erkennen waren (Abb. 12, Spuren 1 und 3). Daraus lässt sich erschließen, dass die möglichen Bindungspartner nicht über Disulfid- bzw. Selenylsulfidbrücken an die GPx4 gebunden sein können, da keine Unterschiede mit und ohne DTT-Behandlung zu erkennen waren.

Tabelle 2 Semiquantitative Bewertung der Prx co-Immünpräzipitationen.

	WT	WT Stress	US	US Stress	cys/ser WT	cys/ser WT	cys/ser WT DTT	cys/ser WT Stress DTT
Pxr1								
170kDa	+	+	-	-	-	-	-	-
25kDa	+	+	+	+	-	-	-	-
Pxr2								
170kDa	+	+	-	-	-	-	-	-
25kDa	-	-	+	+	+	+	+	+
Pxr3								
170kDa	+	+	-	-	-	-	-	-
45kDa	-	-	-	-	+	-	+	-
35kDa	-	-	-	-	+	-	+	-
25kDa	+	+	+	+	+	+	+	+
Pxr4								
25kDa	-	-	+	+	-	-	-	-
Pxr5								
45kDa	-	-	-	-	+	-	+	-
25kDa	-	-	+	+	+	+	+	+
Pxr6								
25kDa	-	-	+	+	+	+	+	+

3.3.2 Regulatoren apoptotischer und nicht-apoptotischer Zelltodsignalwege

Um die mögliche Verbindung von GPx4 zu verschiedenen Zelltodsignalwegen und Zellzyklusregulatoren zu untersuchen, wurden neun verschiedene Antikörper gegen Proteine getestet, die eine entscheidende Rolle im Zelltodgeschehen und bei der Übertragung von extrazellulären Todessignalen spielen. Dabei handelt es sich um AIF, Bcl-x_{S/L}, Bid, Bax, Caspase-8, *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2), *receptor interacting protein kinase-1* (RIP1) und RIP3 sowie *TNF-receptor-associated-factor 3* (TRAF3).

Abbildung 13 zeigt die Immunoblots gegen Bax, Bcl-x_{S/L}, RIP3, AIF, RIP1, Caspase-8, TRAF3 und Bid.

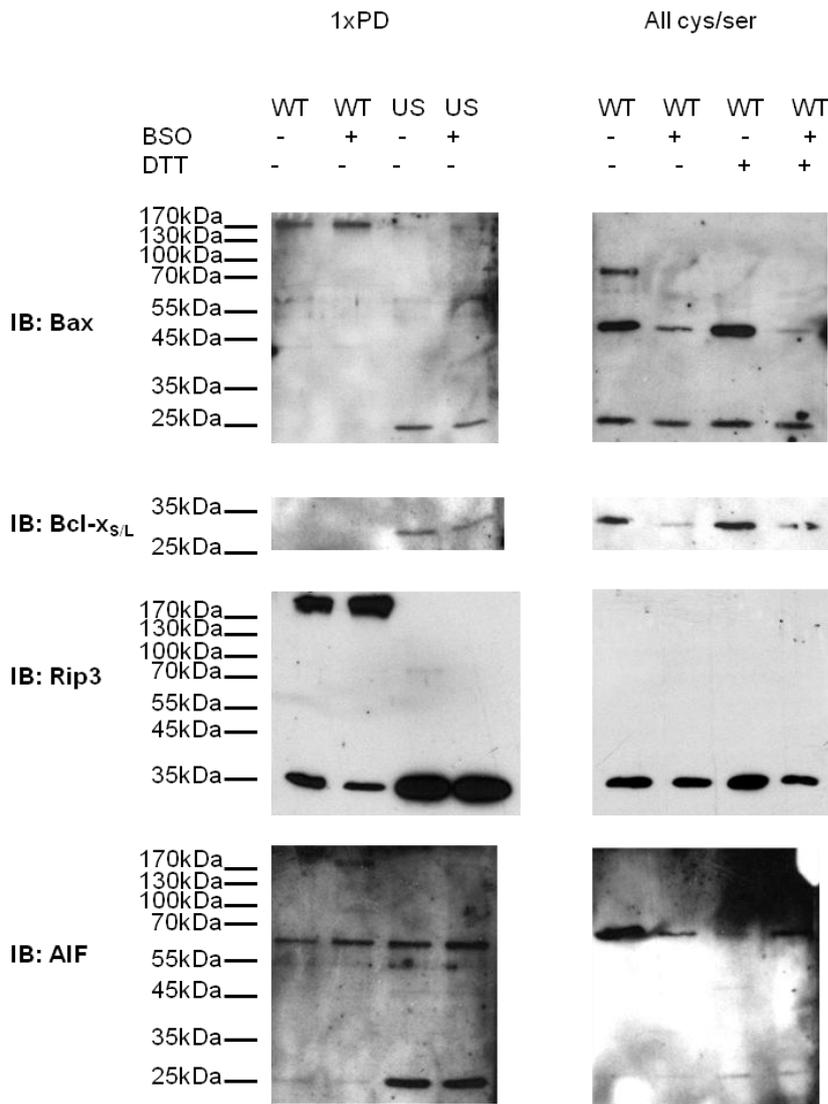


Abbildung 13. Immunoblot gegen Moleküle des apoptotischen und nicht-apoptotischen Zelltods. Proben der Einfachaufreinigung der WT und US Mutanten unter normalen Zellkultur-Bedingungen und unter oxidativem Stress (BSO- und tBOOH-Zugabe) sowie Proben der Einfachaufreinigung der all cys/ser Mutante unter normalen Bedingungen und oxidativem Stress mit und ohne DTT-Zugabe wurden mit den Antikörpern gegen Bax, Bcl, RIP3, und AIF inkubiert. Als Kontrolle dienten Eluate der Einfachaufreinigung von Pfa1 mock-Zellen unter normalen Bedingungen und unter oxidativem Stress. Bei diesen Immunoblots konnten keine Banden detektiert werden (Daten nicht gezeigt). 20 µl der jeweiligen Eluate wurden für die Western Blots verwendet

Bax ist 23 kDa groß und man konnte entsprechende Banden bei der Einfachaufreinigung in den Proben der US-Mutante und allen Proben der all cys/ser Mutante erkennen (Abb. 13). Obwohl keine entsprechend große Bande bei der WT GPx4 zu erkennen war, konnte dafür eine Bande bei 170 kDa detektiert werden. Bei der all cys/ser WT Mutante konnte man eine Bande bei 70 kDa unter unbehandelten Bedingungen feststellen sowie Banden bei 55 kDa bei allen 4 Proben, allerdings waren sie am stärksten ausgeprägt bei WT und WT plus DTT.

Der Bcl-x_{S/L} –Antikörper richtet sich sowohl gegen Bcl-x_S als auch gegen Bcl-x_L. Die Bcl-x_{S/L} Proteine befinden sich in einer Größenordnung zwischen 25 und 35 kDa. In diesem Bereich fanden sich auch Banden bei allen Proben der all cys/ser Mutante, wobei die WT Proben mit und ohne DTT unter sonst normalen Bedingungen die stärksten Banden aufwiesen. Bei der WT Mutante waren keine Banden sichtbar, bei der US-Mutante nur sehr schwach.

Die RIP3 Kinase ist ein etwa 60 kDa großes Protein. Allerdings war in diesem Größenbereich keine einzige Bande in sämtlichen Proben sichtbar. Hingegen konnte man Banden bei 35 kDa in allen Proben und Banden von über 170 kDa in der WT GPx4 unter gestressten und unbehandelten Bedingungen feststellen.

AIF ist etwa 57 kDa groß, und es konnten Banden bei ca. 60 kDa detektiert werden. Bei den drei Mutanten fanden sich Banden im Bereich von 30 kDa, die als Banden unspezifische Antikörperbindung erachtet wurden. Auch die Banden bei 170 kDa bei der WT-Mutante sind unter diesem Aspekt zu sehen. Es ließen sich keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Mutanten und Bedingungen feststellen.

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass die getaggte GPx4 ebenfalls im Immunoblot Banden bei ungefähr 25 kDa aufweist. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei Banden in diesem Größenbereich um eine unspezifische Bindung der Peroxiredoxin-, Bax- oder Bcl-x_{S/L} Antikörper an die GPx4 handelt.

Die Western Blots von RIP1, Caspase-8, Nrf2, TRAF3 und Bid ergaben keine Banden in den Einfachaufreinigungen der WT und US Mutante (Daten nicht gezeigt).

4. Diskussion

4.1 GPx4 als Redoxsensor mit Thiolperoxidasefunktion

Die Grundlage dieser Arbeit war die frühere Erkenntnis, dass GPx4 u.a. als Redox-Sensor agieren kann und bei Änderung des zellulären Redoxpotentials in der Lage ist, Disulfide in Proteine einzufügen.

Delaunay und Kollegen konnten zum ersten Mal zeigen, dass das GPx4-Homolog in Hefe, die GPx3, als Sensor für oxidativen Stress fungiert und über Oxidation und Aktivierung des Transkriptionsfaktors Yap1 an der Kontrolle von Redox-regulierten Signalwegen in der Zelle teilnimmt (Delaunay et al., 2002). Der Hefe-Transkriptionsfaktor Yap1 wird in Anwesenheit von H₂O₂ oder tBOOH durch die Modifikation seines nukleären Exportsignals aktiviert (Delaunay et al., 2000; Kuge et al., 1997; Kuge et al., 1998; Yan et al., 1998), das zur Akkumulation von Yap1 im Zellkern führt und somit die Expression von Genen erhöht, die für enzymatische Antioxidantien und Komponenten des zellulären thiolreduzierenden Signalwegs kodieren (Carmel-Harel et al., 2001; Gasch et al., 2000; Kuge and Jones, 1994; Vido et al., 2001; Wu et al., 1993). Diese Aktivierung wird durch Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbindung im Yap1 Molekül zwischen Cys303 und Cys598 ausgelöst (Delaunay et al., 2000). Allerdings wird Yap1 nicht direkt durch H₂O₂ oxidiert, sondern von GPx3, welches eine intermolekulare Disulfidbrücke zu dem Cys598 des Yap1 ausbildet, das wiederum notwendig für die Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbindung von Yap1 ist (Delaunay et al., 2002). Es wird angenommen, dass ein nicht-kovalenter Yap1-GPx3-Komplex dieser Interaktion über Disulfide vorausgeht. GPx3 ist eine von drei Hefe-GPxs, welche alle keine Selenoproteine sind, sondern im aktiven Zentrum ein Cys exprimieren (Avery and Avery, 2001; Inoue et al., 1999). GPx3 besitzt drei Cys an den Stellen 36, 64 und 82, wobei das Cys36 dem konservierten Sec/Cys des aktiven Zentrums von GPx4 entspricht (Delaunay et al., 2002). Während der Reaktionsinitiation bildet auch die GPx3 zunächst eine intramolekulare Disulfidbrücke zwischen dem Cys36 und Cys82 aus, die unabkömmlich für die Peroxidaseaktivität von GPx3 ist. Darüber hinaus konnten Delaunay und Kollegen zeigen, dass zur Regeneration von GPx3, nicht wie in der Regel bei GPxs von Säugern, GSH sondern Thioredoxin als Elektronendonator dient. Alle drei Hefe-GPxs ähneln der GPx4-Unterfamilie aufgrund ihrer Struktur und ihrer breiten Substratspezifität, die H₂O₂, tBOOH und Phospholipidhydroperoxide beinhalten. Sie sind alle Monomere und es fehlt ihnen, wie auch der GPx4-Subfamilie, die Arginine, die die homotetrameren Säuger-GPxs

besitzen, welche zur Orientierung von GSH zum aktiven Zentrum beitragen. Darüber hinaus konnten Gutscher und Kollegen zeigen, dass die Hefe GPx3 nicht nur die Oxidation von Yap1 fördert, sondern auch in der Lage ist, roGFP (*redox-sensitive green fluorescent protein*) in Zellen von Säugern zu oxidieren (Gutscher et al., 2009). In derselben Studie wurden zudem Fusionsproteine aus GPx3 respektive GPx4 und roGFP konstruiert, wobei beide GPxs in der Lage waren, das Peroxid-Signal durch Oxidation von roGFP zu propagieren (Gutscher et al., 2009). Dies ist zumindest der erste formale Beweis, dass die GPx4 auch in somatischen Zellen in der Lage ist, intramolekulare Disulfide in Proteine einzuführen.

Diese Thiolperoxidaseaktivität, die Delaunay und Kollegen für die Hefe-GPx3 molekular beschrieben, konnte indirekt schon früher für die GPx4 nachgewiesen werden (Delaunay et al., 2002). Ursini und Kollegen fanden heraus, dass die GPx4 ihre Funktion während der Spermienreifung wechselt von einer löslichen, aktiven Peroxidase in Spermatisden zu einem inaktiven unlöslichen Strukturprotein in der Kapsel von Spermienmitochondrien, das dort durch die Oxidation und Ausbildung intra- und intermolekularer Disulfide mit anderen Proteinen quervernetzt vorliegt (Ursini et al., 1999). Im Folgenden konnte gezeigt werden, dass die GPx4 in der Tat für die oxidative Polymerisierung von mitochondrialen Kapselproteinen verantwortlich ist (Maiorino et al., 2005b), und selber Homopolymere oder Heteropolymere mit SMCP (*Sperm mitochondrion-associated Cyse-rich protein*) ausbildet (Maiorino et al., 2005a). Durch die experimentelle Reduktion von isolierten mitochondrialen Kapseln mit hohen Konzentrationen von β -Mercaptoethanol konnte die GPx4-spezifische Peroxidase-Aktivität wiedergewonnen werden. Die peroxidative Form der GPx4 katalysiert also in Anwesenheit von H_2O_2 und Abwesenheit von GSH die Entstehung von Aggregaten durch Einführung von intermolekularen Disulfidbrücken zwischen Kapselproteinen (Roveri et al., 2001; Ursini et al., 1999). Weiterhin ist sie auch in der Lage, die eigene Polymerisation, die zwischen dem Sec im aktiven Zentrum und dem Cys an Position 148 stattfindet, zu vermitteln (Mauri et al., 2003). Diese Selenylsulfidbrücke wird gebildet, wenn die Verfügbarkeit anderer reduzierender Substrate (z.B. GSH) begrenzt wird, was letztlich in einer suizidalen Inaktivierung der GPx4 resultiert. Zusätzlich katalysiert die GPx4 die Ausbildung von Disulfiden in SMCP-Molekülen, die wiederum möglicherweise durch *Reshuffling* letztendlich zur Proteinfaltung und endgültigen Struktur der mitochondrialen Kapsel beitragen (Maiorino et al., 2005b). Da GSH mit den Cysteinresten anderer Proteine um das aktive Zentrum von GPx4 konkurriert, stellt der zelluläre Redoxstatus den entscheidenden Initiator für die Ausbildung der Kapsel dar. In diesem Kontext ist es wichtig anzumerken, dass zytosolische GSH-Konzentrationen in den späten Reifestadien der Spermienentwicklung um mehr als 90% abnehmen, wodurch diese Oxidationsprozesse erst ermöglicht werden (Seligman et al., 1994; Seligman and Shalgi, 1991). Die Funktion als

Thiolperoxidase der mitochondrialen Form von GPx4 konnte mithilfe einer Knockout Studie belegt werden (Schneider et al., 2009). Spermatozoen von *mGPx4* Knockout Mäusen besaßen höhere Konzentrationen an Proteinthiolen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. Auch die nukleäre Form von GPx4 zeigt Thiolperoxidaseaktivität, die ebenfalls mit einer Knockout Studie belegt wurde (Conrad et al., 2005). Spermien, die von der Cauda epididymidis von *nGPx4* Knockout Mäusen gewonnen wurden, zeigten einen erhöhten Anteil an freien Thiolgruppen, was auf die Abwesenheit von nGPx4 zurückzuführen ist. Weitere Studien konnten zudem belegen, dass die GPx4 bei niedrigen Glutathionkonzentrationen Thiolgruppen anderer Proteine als Reduktans akzeptieren kann (Godeas et al., 1997; Mauri et al., 2003; Roveri et al., 2001; Ursini et al., 1995).

Diese Arbeit beschäftigte sich daher mit der Frage, ob und welche Interaktionspartner als Ziel der Thiolperoxidaseaktivität von GPx4 in somatischen Zellen möglicherweise in Frage kommen.

4.2. Das TAP Verfahren als geeignete Methode an GPx4 assoziierte Proteine zu identifizieren

Zur Untersuchung dieser Fragestellung entschieden wir uns, GPx4 aus Zelllysaten aufzureinigen in der Hoffnung, dadurch auch an sie assoziierte Reaktionspartner zu gewinnen und diese durch anschließende Massenspektrometrie zu identifizieren. Dazu wurden für die Aufreinigung Zelllinien benutzt, die die mit einem Strep/Flag-Tag versehene *GPx4* nach lentiviraler Transduktion stabil exprimieren. Als Kontrollen wurden zwei weitere Mutanten herangezogen: die *US* Mutante und die *all cys/ser* Mutante. Als weitere Negativkontrolle dienten Zellen, die nur mit leerem Virus transduziert wurden (*PFa1 mock*). Da man aus den in vitro Studien und den Knockout-Studien (siehe oben) annehmen konnte, dass die GPx4 als Redoxsensor agiert, wurden die Zellen oxidativem Stress ausgesetzt, um verfügbares GSH zu reduzieren und möglicherweise auch Zellsignalwege zu aktivieren. Dafür wurde zum einen BSO benutzt, indem es die Glutathionsynthese inhibiert, und andererseits tBOOH, welches direkt die GPx4 oxidiert und zusätzlichen oxidativen Stress ausübt, indem es Lipidperoxidation induziert. Zur Aufreinigung der Zellen wurde ein TAPe-Verfahren benutzt, welches von Gloeckner und Kollegen modifiziert wurde (Gloeckner et al., 2007). Dabei wird das mit dem Strep/Flag-Tag versehene Protein in zwei konsekutiven Reinigungsschritten aus den Zelllysaten isoliert und gereinigt. Dadurch war es möglich

mithilfe dieses Verfahrens die getaggte GPx4 aus Zellen mittels zweier aufeinander folgender Immunpräzipitationsschritte zu isolieren. Vorexperimente ergaben, dass durch den zweiten Reinigungsschritt allerdings viel Protein verloren ging. Deshalb wurde dazu übergegangen, zur weiteren Analyse der Eluate durch Immunoblotting nur Proben aus Einfachaufreinigungen zu nutzen, wohingegen für die Identifizierung möglicher neuer Interaktionspartner Proben aus Zweifachaufreinigungen verwendet wurden, da die Massenspektrometrie sensitiv genug ist, kleinste Mengen von Proteinen nachzuweisen. Da die Expression der *US* und *all cys/ser* Mutante deutlich stärker ist als die der *WT GPx4*, ergab sich für die weiteren Analysen, dass quantitative Aussagen über Reaktionspartner nicht getroffen werden können, da eine erhöhte Expression einer *GPx4* Mutante eine erhöhte Aufreinigung von GPx4 Proteinmengen nach sich zieht und damit auch an GPx4 assoziierte Proteine (Mannes et al., 2011).

Für die höhere Expression der *US* und *all cys/ser* Mutante im Vergleich zur *WT* Mutante ist höchstwahrscheinlich die Ineffizienz des Sec-Einbaus während der Translation verantwortlich, was sich letztlich in der Expression der Gesamtmenge des GPx4 Proteins widerspiegelt (Suppmann et al., 1999). Suppmann und Kollegen zeigten anhand der Expression eines bakteriellen Fusionsgens in *E.coli*, dass die Effizienz der vollständigen Leserate der Selenoprotein-mRNA bei nur 4-5% lag verglichen mit einem Serin-Kodon. Grund dafür war eine weitaus größere Wahrscheinlichkeit der frühzeitigen Beendigung der Translation am UGA-Codon, und der Barriere aufgrund des SECIS-Elements. Im Vergleich zum Sec-Einbau zeigte sich die Insertion von Serin als sehr viel effizienter und wurde beim kompetitiven Vergleich bevorzugt. Aus diesen Studien konnte eine sehr viel höhere Expression der *US* und *all cys/ser* Mutante erwartet werden.

Wie in den Silberfärbungen von Einfachaufreinigungen zu erkennen war, konnten zusätzliche Proteinbanden bei 35, 45 und 55 kDa detektiert werden, die jedoch in der Kontrolle mit Pfa1 mock Zellen nicht vorhanden waren. Dies lässt darauf schließen, dass es sich um an GPx4 assoziierte Proteine handeln muss. Deshalb wurde die TAPe-Methode als geeignetes Verfahren erachtet, um mögliche Bindungspartner von GPx4 aus Zelllysaten zu extrahieren und anschließend zu identifizieren.

4.3. GPx4 und mögliche Interaktionspartner nach Glutathiondepletion

4.3.1 An GPx4 assoziierte Proteine werden unter oxidativem Stress stärker exprimiert

Sämtliche Aufreinigungen wurden mit vier verschiedenen Zelllinien unter zwei verschiedenen Bedingungen, mit oder ohne zusätzliche Behandlung (in Form von BSO, tBOOH, DTT), durchgeführt. Dadurch war es möglich, sowohl Vergleiche zwischen den verschiedenen Bedingungen als auch zwischen den Zelllinien zu ziehen.

Entgegen der Erwartung konnte man bei der Analyse der Silberfärbung keine nennenswerten Unterschiede bei den Proben innerhalb der jeweiligen Zelllinien sehen, die zusätzlichem oxidativem Stress ausgesetzt wurden oder unbehandelt blieben. Zusätzliche Proteinbanden erschienen in der Silberfärbung des SDS-PAGE Gels unter beiden Bedingungen. Lediglich die Intensität der Banden war bei den Proben, die vorher mit BSO und tBOOH behandelt wurden, in der Regel stärker ausgeprägt (Abb. 8A). Dies suggeriert, dass Proteine unter oxidativem Stress vermehrt mit GPx4 in Verbindung treten. Man kann daher annehmen, dass es sich um Proteine handelt, die an Signalwegen beteiligt sind, die durch Veränderungen im zellulären Redoxgleichgewicht der Zelle aktiviert bzw. stärker exprimiert werden, oder aber nach erfolgter Oxidation des aktiven Zentrums der GPx4 eine kovalente Bindung mit GPx4 eingehen

Das Proteinbandenmuster von der GPx4 WT Mutante und der US Mutante unterschied sich bis auf 5 Banden kaum. Proteinbanden bei 15, 20 und 22 kDa erschienen nur bei der US Mutante (Tabelle 1). Bedenkt man jedoch die aufgrund der vermehrten Expression dieser Mutante insgesamt erhöhten Proteinnengen, ist davon auszugehen, dass diese Proteine auch in den Proben der WT Mutante vorkommen, allerdings nur in zu geringen Mengen, um durch die Silberfärbung detektiert zu werden. Bei 13 und 17 kDa wurden Banden beobachtet, die ausschließlich bei der WT Mutante vorzufinden waren. Da diese Banden weder bei der US Mutante noch der all cys/ser Mutante festgestellt werden konnten, kann man annehmen, dass es sich daher um Proteine handeln muss, die entweder direkt mit dem aktiven Zentrum der GPx4 oder aber eins der anderen Cys-Reste interagieren können. Proteinbanden bei 13, 15, 17, 20 und 27 kDa konnten nicht bei der all cys/ser Mutante nachgewiesen werden, weshalb angenommen werden kann, dass diese Proteine über die nicht-katalytischen

Cysteine an GPx4 gebunden vorliegen. Es lassen sich zwei Banden bei 130 und über 180 kDa ausschließlich bei der all cys/ser Mutante detektieren. Alle weiteren Banden, die sowohl bei der WT und US Mutante als auch der all cys/ser Mutante vorkommen, lassen darauf schließen, dass es sich um Proteine handelt, die weder eine kovalente Bindung zum Sec ausbilden noch zu den nicht-peroxidativen Cysresten sondern über noch nicht spezifizierte Bindungen an GPx4 gebunden sind.

Um herauszufinden, ob die an GPx4 assoziierten Proteine über kovalente Disulfid- oder Selenylsulfidbrücken gebunden sind, wurde in einem Aufreinigungsansatz der all cys/ser Mutanten das Reduktans DTT verwendet. Erstaunlicherweise konnten keine nennenswerten Unterschiede zwischen der Aufreinigung mit und ohne DTT gefunden werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei den Proteinen um nicht-kovalent an GPx4 gebundene Proteine handeln muss. Eine kovalente Bindung lässt sich für die Proteine, deren Banden ausschließlich bei der WT und US Mutante gefunden wurden weder bestätigen noch ausschließen. Weitere experimentelle Untersuchungen dieser Mutanten mit DTT sind notwendig, um zu eruieren, ob diese Proteine an eins oder mehrere der 8 nicht-peroxidativen Cysen oder an das Sec kovalent gebunden sind oder aber über nicht-kovalente Bindungen an die GPx4 assoziiert sind.

Bei der folgenden Analyse der Proteineluate aus den Aufreinigungen durch die LC/MS ließ sich die Hypothese bestätigen, dass zusätzliche Proteine besonders unter Bedingungen des oxidativen Stresses vermehrt gefunden wurden und deren Auftreten somit als Folge eines pro-oxidativen Geschehens angesehen werden kann. Bei den Experimenten, die die US Mutante mit der WT Mutanten verglichen, waren mehr assoziierte Proteine in Proben der US Mutante zu finden, was, wie schon oben erwähnt, möglicherweise auf die im Zusammenhang mit stärkerer Expression der US Mutante höhere Gesamtproteinmenge in diesen Proben zurückzuführen ist.

Für die anschließende Untersuchung der Proben durch Western Blotting wurden 15 verschiedene Antikörper gegen Proteine verwendet, deren Interaktion mit GPx4 anhand des aktuellen Wissensstands über ihre Funktion für möglich zu erachten ist.

4.3.2. An GPx4 assoziierte Proteine von thiolabhängigen antioxidativen Systemen

Neben dem GSH-abhängigem System zählt das Thioredoxin-System zu den wichtigsten Systemen, die für die Aufrechterhaltung des zellulären Redoxgleichgewichts verantwortlich sind. Beide sind thiolabhängige antioxidative Systeme, deren wichtige Enzyme eine für Thioredoxin typische Faltungsstruktur besitzen, wie beispielsweise Glutaredoxin (Grx) (Fernandes and Holmgren, 2004), Peroxidredoxin (Wood et al., 2003) und die Glutathionperoxidasen (Ladenstein et al., 1979). Zu dem Thioredoxin-System gehören die Trx, Txnrdn und Prx. Trxs sind relativ kleine, ubiquitär exprimierte Proteine, die eine Rolle bei der Zell-Zellkommunikation, Signaltransduktion, Proteinfaltung, dem DNS-Metabolismus und der Transkriptionsregulation spielen (Arner and Holmgren, 2006; Holmgren, 1985; Nordberg and Arner, 2001). In somatischen Zellen von Säugern existieren zwei Trxs: das zytosolische Trx1- und das mitochondriale Trx2-System. Mäuse, denen Trx1 fehlt, sterben bereits im Blastozystenstadium (E3,5) (Matsui et al., 1996), wohingegen die transgene Überexpression Schutz vor verschiedenen Stress-induzierenden Bedingungen verleiht (Mitsui et al., 2002; Nakamura et al., 2002). Unter Verbrauch von NADPH/H⁺ reduzieren Txnrdn die Trx, wodurch diese regeneriert werden. Sie kommen, ebenso wie die Trxs, im Cytosol (Txnrd1) und im Mitochondrium vor (Txnrd2) (Lu and Holmgren, 2009). Su und Kollegen entdeckten mit der Thioredoxin/Glutathionreduktase (TGR) ein neues Mitglied in der Txnrd-Familie, die aber hauptsächlich im Hoden exprimiert wird (Su et al., 2005) .

Trx 1 konnte in der WT und US Mutante unter oxidativen Stress Bedingungen, sowie in der US Mutante im Bezug zur WT Mutante als interagierendes Protein mit der GPx4 nachgewiesen werden. Die Thioredoxinreduktase 1 konnte nur nach BSO und tBOOH - Zugabe in der US Mutante detektiert werden.

Trotz der überlappenden Funktionen des Trx- und GSH-Systems nahm man lange Zeit an, dass beide Systeme parallel agieren. Neuere Erkenntnisse hingegen belegen, dass eine enge Redundanz zwischen den beiden thiolabhängigen Redox-Systemen stattfinden kann (Conrad et al., 2004). Txnrd2-defiziente MEFs, die von Conrad und Kollegen generiert wurden, reagierten sehr empfindlich auf exogene ROS, wenn gleichzeitig die Glutathionsynthese gehemmt war. Du und Kollegen konnten zeigen, dass GSH und Grx in physiologischen Konzentrationen *in vitro* in der Lage sind, oxidiertes Trx zu reduzieren (Du et al., 2012). Damit liegt nahe, dass das GSH-System als Backup für die Txnrds dienen kann, da die Herunterregulierung von Txnrd1 keinen Effekt auf den Trx1 Redoxstatus hatte,

hingegen aber eine Kombination bei gleichzeitiger Hemmung des GSH-Systems (Du et al., 2012; Watson et al., 2008; Zhang et al., 2011).

TGR besitzt Gemeinsamkeiten mit GPx4 und ist auch funktionell mit dieser verbunden, wie Daten von Su und Kollegen nahe legen (Su et al., 2005). Es ist in niedrigen Konzentrationen in verschiedenen Geweben anzutreffen, wird jedoch verstärkt vor allem im Hoden nach der Pubertät exprimiert. TGR besitzt im Gegensatz zu den anderen beiden Txnrd zusätzlich eine N-terminale, Glutaredoxin-ähnliche Domäne (Sun et al., 2001), worüber, wie durch massenspektrometrische Ansätze bewiesen wurde, die GPx4 an TGR bindet (Su et al., 2005). Daher wurde ein funktionell interagierendes System postuliert, in dem die GPx4 zunächst Disulfide in Spermienproteine einführt und die TGR als Disulfidisomerase – analog den Proteindisulfid-Isomerasen im endoplasmatischen Retikulum - die korrekte Faltung dieser Proteine durch Isomerisierungsreaktionen sicherstellt. Dadurch wird das komplexe Netzwerk aus Spermatidstrukturproteinen über komplexe Disulfidbrücken organisiert und stabilisiert. Inwieweit die anderen Trxs und Txnrds in der Lage sind mit GPx4 zu interagieren, bleibt aber noch unbekannt. Leider konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Assoziation der TGR an GPx4 nachgewiesen werden. Sicher bietet sich in dieser Hinsicht aber eine interessante Richtung für weitere Forschungsprojekte.

Die Glutathionreduktase (Gsr) wurde in beträchtlichen Mengen in den Aufreinigungen der WT- und US-Mutanten gefunden, in beiden Fällen unter Stressbedingungen im Vergleich zum ungestressten Zustand, sowie bei der US Mutante im Vergleich zur WT Mutante. Gsr reduziert Glutathiondisulfid (GSSG) zu GSH unter Verbrauch von NADPH/H⁺ und spielt damit eine entscheidende Rolle im GSH-abhängigen Redoxsystem. Inwieweit Gsr direkt mit GPx4 interagiert, wurde bis jetzt nicht beschrieben und sollte in weiterführenden Studien molekular untersucht werden.

Die vermehrte Anreicherung der oben genannten Proteine in den Proben der US Mutante kann u.a. als Folge der vermehrten Expression der US Mutante gewertet werden. Es ist davon auszugehen, dass diese Proteine nicht von dem Sec im aktiven Zentrum abhängig sind. Da keins der hier besprochenen Enzyme in der all cys/ser WT Mutante nachgewiesen werden konnte, kann man annehmen, dass eine Bindung über eines oder mehrere der nicht-peroxidativen Cyse stattfindet oder die Proteine über noch nicht spezifizierte Bindungen an GPx4 assoziiert ist.

4.3.3 Peroxiredoxine als mögliche Targets für die Thiolperoxidaseaktivität der GPx4

In der LC/MS konnten Prx1 und 4 unter Stressbedingungen in der US Mutante nachgewiesen werden. Prx1 konnte zudem in der WT Mutante und Prx4 in der all cys/ser WT Mutante unter Stressbedingungen detektiert werden. Sowohl Prx1 als auch Prx4 wurden im Vergleich zur WT Mutanten in der US Mutante angereichert vorgefunden. Bestätigt werden konnten diese Ergebnisse durch die Immunoblot-Färbungen, wobei Antikörper gegen die weiteren 4 Prxs ebenfalls Banden in dem für die Prxs typischen Größenbereich von 20-30 kDa ergaben. Dabei kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die getaggte GPx4 handelt, die sich im selben Größenbereich befindet. Darüber hinaus konnten weitere Banden detektiert werden. Besonders die Banden im hochmolekularen Bereich von 170 kDa bei den Blots gegen Pxr1 bis 3 sind interessant, da sie ausschließlich bei der WT Mutante auftreten. Prxs, als wichtige Mitglieder der antioxidativen Abwehr, wurden zuerst als Thiolperoxidasen, die Hydroperoxide zu Wasser reduzieren, beschrieben (Rhee and Woo, 2011; Wood et al., 2003). Allerdings nimmt man an, dass die Rolle viel komplexer ausfällt als bisher vermutet: so sollen sie auch als Redox-Sensoren agieren, die über die Kontrolle von Signaltransduktionen verschiedene Zellsignalwege beeinflussen (Fourquet et al., 2008; Winterbourn and Hampton, 2008). Bei Pxr1 bis 3 handelt es sich um 2-Cys Prxs, die, nachdem das peroxidative Cys im aktiven Zentrum zur Sulfensäure oxidiert wurde, eine Disulfidbindung mit dem *releasing* Cys (C_R) ausbilden (Parsonage et al., 2008; Peskin et al., 2007; Sayed and Williams, 2004). Da die 2-Cys Pxr als Homodimere vorliegen, bildet sich diese Bindung zwischen den beiden Momomeren. Deshalb besteht die Möglichkeit, dass die GPx4 in der Lage ist, diese Reaktion zu katalysieren, was einer ähnlichen Funktion entsprechen würde, wie sie sie in Spermien erfüllt (siehe oben) (Maiorino et al., 2005b; Schneider et al., 2009; Ursini et al., 1999).

4.3.4 Interaktion der GPx4 mit Zelltod-regulierenden Proteinen

AIF ist ein 57 kDa großes Protein, das im Mitochondrium lokalisiert ist (Modjtahedi et al., 2006; Zamzami et al., 1996). Nach dessen proteolytischer Spaltung und Freisetzung aus dem Intermembranraum transloziert es zum Zellkern und induziert dort die DNA-Fragmentierung, Chromatinkondensation und den Caspase-unabhängigen Zelltod.

Die Freisetzung von Proteinen aus dem Intermembranraum, in der Regel infolge eines apoptotischen Insults, wird von Proteinen der Bcl2-Familie reguliert. Zu dieser Familie gehört auch das Bcl-x-Protein, welches in zwei Isoformen existiert: Bcl-x_L und Bcl-x_S - beide zwischen 25 und 35kDa groß (Boise et al., 1993). Bcl-2 inhibiert den Zelltod und dessen Überexpression führt zur Hemmung der Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien (Susin et al., 1996). Bcl-x_L verhindert den Zelltod ebenfalls, während Bcl-x_S als Inhibitor von Bcl-2 fungiert (Boise et al., 1993). Ebenfalls ein Inhibitor von Bcl-2 ist Bax (23 kDa) (Oltvai et al., 1993): Bax und Bcl-2 bilden jeweils Homodimere oder können zusammen ein Heterodimer bilden. Der Transkriptionsfaktor Nrf2 reguliert die Expression von verschiedenen Genen, die unter anderem für zytoprotektive Proteine kodieren, darunter Bcl-2, dessen Expression von Nrf2 hoch reguliert wird (Niture and Jaiswal, 2012). Darüber hinaus spielt es eine entscheidende Rolle im Nrf2/ Keap1 (*Kelch-like-ECH-associated protein 1*)-Signalweg (Nrf2/Keap1-Signalweg) (siehe unten). Bid (22kDa) gehört ebenso zur Bcl-2-Familie (Wang et al., 1996) und liegt als inaktive Vorstufe im Zytosol vor (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). Aktiviert wird Bid durch die proteolytische Spaltung durch Caspase-8 im Fas-Signalweg, woraufhin das trunkierte Bid (tBid) zum Mitochondrium transloziert. Infolgedessen wird Cytochrom C durch die Aktivierung von Bax und Bak freigesetzt, was Caspase-abhängige Apoptose zur Folge hat (Gross et al., 1999; Li et al., 1998; Luo et al., 1998; Wei et al., 2001; Yin et al., 1999). Caspase-8 (18, 45, 57 kDa) wird nicht nur durch CD95 (Fas/APO1) aktiviert, sondern auch durch TNFR1 (*TNF receptor 1*) (Boldin et al., 1996; Fernandes-Alnemri et al., 1996; Muzio et al., 1996). Caspase-8 spaltet und aktiviert daraufhin nachgeschaltete Caspasen wie z.B. Caspase-1,-3,-6 und -7 und induziert über Caspase 3 die Apoptose. Zellsignale werden u.a. über die Bindung von *Tumor necrosis factor* (TNF) an den TNFR1 und TNFR2 vermittelt (Tartaglia and Goeddel, 1992). Beide Rezeptoren gehören zur TNF Rezeptor-Familie, die auch das Fas Antigen und CD40 umfasst (Smith et al., 1994). TRAF3 bindet an die zytoplasmatische Domäne von CD40 (Cheng et al., 1995; Hu et al., 1994). Zur RIP-Familie gehören RIP1 und RIP4. Sie können das Überleben der Zelle über den NF-κB Signalweg regulieren oder auch die Apoptose über die Interaktion mit Fas und TRAFs einleiten (Devin et al., 2000; Hsu et al., 1996; Meylan and Tschopp, 2005; Stanger et al., 1995; Zhang et al., 2000). Die Caspase-8 abhängige Spaltung von RIP1 (78 kDa) aktiviert die apoptotische Aktivität von RIP1 (Lin et al., 1999). RIP3 (60 kDa) bindet an RIP1 und TNFR1 und verstärkt so die RIP1 induzierte NF-κB Aktivierung bzw. vermittelt die TNFR1 induzierte Apoptose (Pazdernik et al., 1999; Sun et al., 1999; Yu et al., 1999). Darüber hinaus spielen RIP1 und RIP3 eine ebenso wichtige Rolle bei dem nicht-apoptotischen Zelltod, der sogenannten Nekroptose (Vanden Berghe et al., 2014).

Wie bereits erwähnt, konnten frühere Daten aus unserem Labor belegen, dass nach dem Knockout der *GPx4* in murinen embryonalen Fibroblasten ein AIF-abhängiger und Caspase-unabhängiger Zelltod induziert wird, der über Lipidhydroperoxide vermittelt wird (Seiler et al., 2008). Cole-Ezea und Kollegen fanden heraus, dass der Knockdown von *GPx4* in humanen Kolon-Adenokarzinomzellen (Caco-2) eine erhöhte mitochondriale und zytosolische Proteinexpression von AIF bzw. vermehrten zytosolischen und verminderten mitochondrialen Proteinmengen von Bax führt (Cole-Ezea et al., 2012). Darüber hinaus zog der *GPx4* Knockdown Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette sowie mitochondrialer Konzentrationen an ROS und Lipidperoxidation nach sich. Eine Interaktion von Bax und Proteinen der Bcl-2 Familie mit *GPx4* wäre denkbar, da zumindest schon eine Verbindung von Bax und Bcl-2 zu GSH belegt werden konnte: GSH-Mangel beeinflusst sowohl den intrinsischen als auch den extrinsischen apoptotischen Signalweg (Armstrong and Jones, 2002; Varghese et al., 2003). Zum einem geschieht dies durch die Aktivierung von Bax über dessen oxidationsabhängige Dimerisierung (Sato et al., 2004), und zum anderen reguliert Bcl-2 den GSH Gehalt in verschiedenen Zellkompartimenten (Ellerby et al., 1996; Zimmermann et al., 2007). Bcl-2, als antioxidatives und antiapoptotisches Enzym, besitzt eine Domäne (BH3-Domäne), in der Proteine binden, die diese Funktionen antagonisieren (Zimmermann et al., 2007). Zimmermann und Kollegen zeigten 2007, dass BH3-Agonisten einen GSH-sensitiven mitochondrialen oxidativen Stress mit drauffolgender Apoptose in neuronalen Zellen von Ratten auslösen. Darüber hinaus konnte die direkte Bindung von Bcl2 zu GSH bewiesen werden, die durch BH3-Mimetika antagonisierbar war (Zimmermann et al., 2007).

AIF konnte mithilfe der Immunoblots in den Aufreinigungen aller Mutanten nachgewiesen werden. Nur bei der WT Mutante zeigten sich allerdings Banden bei 170 kDa. Bcl-x_{L/S} ließ sich bei der *US* und *all cys/ser* WT Mutante detektieren, die stärker als die *WT* Mutante exprimiert werden, was eine höhere Proteinmenge zur Folge hat. Die Westernblot-Analysen gegen Bax zeigten in den Aufreinigungen der *US* und *all cys/ser* Mutante Banden im erwarteten Größenbereich von 23 kDa. Dies entspricht allerdings auch der Größe der getaggtten *GPx4*. Somit könnte es sich auch um eine unspezifische Antikörperbindung handeln, was auch bei den Prx und Bcl-x_{S/L} Immunoblots berücksichtigt werden sollte, da diese Proteine sich ebenfalls in diesem Größenbereich aufhalten. Überraschenderweise konnten Banden bei 170 kDa ausschließlich in der *WT* Mutante detektiert werden. In der *all cys/ser* Mutante konnten zusätzlich Banden bei 70 und 55 kDa nachgewiesen werden. Wie aber genau die *GPx4* mit diesen Proteinen molekular interagiert, sollte Gegenstand zukünftiger Forschungsprojekte sein.

Rip3 konnte in den Aufreinigungen aller Mutanten mithilfe des Immunoblots nachgewiesen werden. Unerwartet zeigten sich Banden in der WT Mutante bei >170 kDa, die möglicherweise auf einen großen und sehr stabilen Proteinkomplex hinweisen. Der Immunoblot gegen Rip1 ergab hingegen keine Banden.

Rip1 und Rip3 spielen eine entscheidende Rolle bei nicht-apoptischen Zelltodsignalwegen. Neben der Apoptose und Nekrose hat der Begriff Nekroptose als Synonym für die programmierte Nekrose 2005 offiziell Einzug in die Terminologie erhalten (Degterev et al., 2005). Eine Reihe von Molekülen wurden als Initiatoren, Modulatoren oder Effektoren der Nekroptose identifiziert, u.a. Rip1 und Rip3 (Cho et al., 2009; He et al., 2009; Holler et al., 2000; Hsu et al., 1996; Zhang et al., 2009). Es wird angenommen, dass die Kinase-Aktivität von Rip3 die Aktivierung von TNFR1 mit der Überproduktion von ROS vermittelt, was eine Möglichkeit darstellt, Nekroptose zu initiieren (Zhang et al., 2009). Darüber wäre eine mögliche Verbindung zwischen oxidativem Stress, Lipidperoxidation und GPx4-Aktivität in Betracht zu ziehen, die allerdings noch einiger Aufklärung bedarf (Vandenabeele et al., 2010).

Eine weitere Form des nicht-apoptischen Zelltodes bezeichnet man als Ferroptose, die sich morphologisch, biochemisch und genetisch von der Apoptose, Nekrose oder Autophagozytose unterscheidet. Das Stockwell Labor beschrieb dabei zwei strukturell nicht verwandte Moleküle, die selektiv den Zelltod in onkogenen RAS Mutanten Zelllinien auslösten: Erastin und RSL3 (Dixon et al., 2012; Dolma et al., 2003; Yang and Stockwell, 2008). Die Art des Zelltods blieb unbekannt, jedoch zeigte er keine typischen Anzeichen der Apoptose (Dolma et al., 2003; Yagoda et al., 2007; Yang and Stockwell, 2008), ging mit erhöhten Konzentrationen an ROS einher und konnte durch Eisenchelatoren oder genetischer Hemmung der Eisenaufnahme verhindert werden (Yagoda et al., 2007; Yang and Stockwell, 2008). Dixon und Kollegen identifizierten das kleine Molekül Ferrostatin-1 als erster Inhibitor der Ferroptose in HT-1080-Krebszellen (Dixon et al., 2012). Da dem Zelltod eine eisenabhängige Anreicherung von ROS in Zellen vorausgeht und Ferrostatin-1 eine N-Cyclohexyl-Einheit besitzt, nimmt man an, dass es als lipophiler Anker in biologischen Membranen als Antioxidans agiert (Skouta et al., 2014). Zudem verhindert Ferrostatin-1 die durch hohe extrazelluläre Glutamat-Konzentrationen ausgelöste Ferroptose in *ex vivo* kultivierten Neuronen (Dixon et al., 2012). Hohe Konzentrationen an extrazellulärem Glutamat inhibieren, ähnlich wie der Inhibitor Erastin, den Cystin/Glutamat-Antiporter (System x_c^-), wodurch die Cystin-Aufnahme gehemmt wird und der dadurch ausgelöste intrazelluläre Cys-Mangel eine massive GSH-Depletion und somit den Zelltod induziert.

Interessanterweise kann neben Ferrostatin auch Trolox vor dem durch Erastin-induzierten Zelltod in HAT-1080 Zellen schützen, was dafür spricht, dass die auftretende Lipidperoxidation zentral für die Ferroptose ist (Yagoda et al., 2007). Die gleiche Gruppe bestätigte 2014, dass Erastin durch Verminderung der GSH-Konzentration die Ferroptose auslöst (Yang et al., 2014). Eben diese verringerte Konzentration inaktiviert auch GPx4. Zudem zeigten Yang und Kollegen, dass RSL-3 direkt an GPx4 bindet und dieses inaktiviert. Damit wurde bewiesen, dass die GPx4 direkt an der Regulation dieses neuen Zelltodsignalwegs beteiligt ist.

Weitere Aussagen über die Bedeutung der zusätzlichen Proteinbanden bei den oben genannten Immunoblots können erst nach weiteren Untersuchungen gemacht werden. Ein besonderes Augenmerk sollte dabei auf die 170 kDa großen Proteinkomplexe, die in Blots gegen AIF, Bax, Prx1-3 und Rip3 gefunden worden, gelegt werden, da diese ausschließlich bei den WT exprimierenden Zellen erschienen.

Ein weiteres Augenmerk sollte ebenso auf den Nrf2/ Keap1-Signalweg gelegt werden, der einer der wichtigsten Regulatoren der zytoprotektiven Antwort auf endogenen und exogenen oxidativen Stress darstellt. Dabei bindet Nrf2 als Transkriptionsfaktor im Zellkern an das *antioxidant response element* (ARE) und initiiert dadurch die Transkription antioxidativer Proteine (Kansanen et al., 2012). Darunter fallen auch Enzyme, die für den Glutathionhaushalt verantwortlich sind, wie zum Beispiel einige GPxs (reviewed von (Hayes et al., 2010; Zhang and Gordon, 2004). Unter basalen Bedingungen befindet sich Nrf2 in einem Komplex mit Keap1. Dabei arrangieren sich zwei Keap1-Moleküle derart, dass die Ubiquitinierung und der proteasomale Abbau von Nrf2 gefördert wird (Kansanen et al., 2012; McMahon et al., 2006; Tong et al., 2007; Zhang et al., 2004). Humanes Keap1 besitzt 27 Cys-Reste, die durch verschiedene Stimuli, wie z.B. oxidativem Stress oder elektrophile Substanzen, von diesen angegriffen und kovalent gebunden werden können, unter anderem auch unter Ausbildung von Disulfidbindungen, oder zur Sulfensäure oxidiert werden können (Dinkova-Kostova et al., 2002; McMahon et al., 2010; Zhang and Hannink, 2003). Man nimmt an, dass durch die Modifikation der Thiole, Keap1 seine Konformation ändert, was zu einer Verhinderung der Ubiquitinierung und Freisetzung von Nrf2 führt, welches daraufhin zum Nucleus transloziert (McMahon et al., 2006). Auch in diese Richtung sind weitere Forschungsprojekte notwendig um die genaue Interaktion von GPx4 in diesem Signalweg zu klären.

5 Literaturverzeichnis

Al-Taie, O.H., Uceyler, N., Eubner, U., Jakob, F., Mork, H., Scheurlen, M., Brigelius-Flohe, R., Schottker, K., Abel, J., Thalheimer, A., *et al.* (2004). Expression profiling and genetic alterations of the selenoproteins GI-GPx and SePP in colorectal carcinogenesis. *Nutrition and cancer* 48, 6-14.

Allmang, C., Wurth, L., and Krol, A. (2009). The selenium to selenoprotein pathway in eukaryotes: more molecular partners than anticipated. *Biochimica et biophysica acta* 1790, 1415-1423.

Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., and Mustelin, T. (2004). Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 117, 699-711.

Arai, M., Imai, H., Koumura, T., Yoshida, M., Emoto, K., Umeda, M., Chiba, N., and Nakagawa, Y. (1999). Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a major role in preventing oxidative injury to cells. *The Journal of biological chemistry* 274, 4924-4933.

Armstrong, J.S., and Jones, D.P. (2002). Glutathione depletion enforces the mitochondrial permeability transition and causes cell death in Bcl-2 overexpressing HL60 cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16, 1263-1265.

Arner, E.S. (2010). Selenoproteins-What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? *Exp Cell Res.*

Arner, E.S., and Holmgren, A. (2006). The thioredoxin system in cancer. *Semin Cancer Biol* 16, 420-426.

Aumann, K.D., Bedorf, N., Brigelius-Flohe, R., Schomburg, D., and Flohe, L. (1997). Glutathione peroxidase revisited--simulation of the catalytic cycle by computer-assisted molecular modelling. *Biomedical and environmental sciences : BES* 10, 136-155.

Avery, A.M., and Avery, S.V. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *The Journal of biological chemistry* 276, 33730-33735.

Avissar, N., Ornt, D.B., Yagil, Y., Horowitz, S., Watkins, R.H., Kerl, E.A., Takahashi, K., Palmer, I.S., and Cohen, H.J. (1994). Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. *The American journal of physiology* 266, C367-375.

Baliga, M.S., Wang, H., Zhuo, P., Schwartz, J.L., and Diamond, A.M. (2007). Selenium and GPx-1 overexpression protect mammalian cells against UV-induced DNA damage. *Biological trace element research* 115, 227-242.

Banning, A., Florian, S., Deubel, S., Thalmann, S., Muller-Schmehl, K., Jacobasch, G., and Brigelius-Flohe, R. (2008). GPx2 counteracts PGE2 production by dampening COX-2 and mPGES-1 expression in human colon cancer cells. *Antioxidants & redox signaling* 10, 1491-1500.

Banning, A., Schnurr, K., Bol, G.F., Kupper, D., Muller-Schmehl, K., Viita, H., Yla-Herttuala, S., and Brigelius-Flohe, R. (2004). Inhibition of basal and interleukin-1-induced VCAM-1 expression by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and 15-lipoxygenase in rabbit aortic smooth muscle cells. *Free radical biology & medicine* 36, 135-144.

Barone, J.G., De Lara, J., Cummings, K.B., and Ward, W.S. (1994). DNA organization in human spermatozoa. *J Androl* 15, 139-144.

Behne, D., Kyriakopoulos, A., Weiss-Nowak, C., Kalckloesch, M., Westphal, C., and Gessner, H. (1996). Newly found selenium-containing proteins in the tissues of the rat. *Biological trace element research* 55, 99-110.

Bell, J.G., Cowey, C.B., and Youngson, A. (1984). Rainbow trout liver microsomal lipid peroxidation. The effect of purified glutathione peroxidase, glutathione S-transferase and other factors. *Biochimica et biophysica acta* 795, 91-99.

Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G., and Thompson, C.B. (1993). *bcl-x*, a *bcl-2*-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597-608.

Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., and Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815.

Bosello-Travain, V., Conrad, M., Cozza, G., Negro, A., Quartesan, S., Rossetto, M., Roveri, A., Toppo, S., Ursini, F., Zaccarin, M., *et al.* (2013). Protein disulfide isomerase and glutathione are alternative substrates in the one Cys catalytic cycle of glutathione peroxidase 7. *Biochimica et biophysica acta* 1830, 3846-3857.

Bosl, 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*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 5531-5534.

Bozinovski, S., Seow, H.J., Crack, P.J., Anderson, G.P., and Vlahos, R. (2012). Glutathione peroxidase-1 primes pro-inflammatory cytokine production after LPS challenge in vivo. *PloS one* 7, e33172.

Brehelin, C., Meyer, E.H., de Souris, J.P., Bonnard, G., and Meyer, Y. (2003). Resemblance and dissemblance of Arabidopsis type II peroxiredoxins: similar sequences for divergent gene expression, protein localization, and activity. *Plant physiology* 132, 2045-2057.

Brielmeier, M., Bechet, J.M., Suppmann, S., Conrad, M., Laux, G., and Bornkamm, G.W. (2001). Cloning of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) as an anti-apoptotic and growth promoting gene of Burkitt lymphoma cells. *BioFactors* (Oxford, England) 14, 179-190.

Brigelius-Flohe, R. (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free radical biology & medicine* 27, 951-965.

Brigelius-Flohe, R., Aumann, K.D., Blocker, H., Gross, G., Kiess, M., Kloppel, K.D., Maiorino, M., Roveri, A., Schuckelt, R., Usani, F., *et al.* (1994). Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence. *The Journal of biological chemistry* 269, 7342-7348.

Brigelius-Flohe, R., and Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica et biophysica acta* 1830, 3289-3303.

Brigelius-Flohe, R., Maurer, S., Lotzer, K., Bol, G., Kallionpaa, H., Lehtolainen, P., Viita, H., and Yla-Herttuala, S. (2000). Overexpression of PHGPx inhibits hydroperoxide-induced oxidation, NFkappaB activation and apoptosis and affects oxLDL-mediated proliferation of rabbit aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 152, 307-316.

Caban, K., and Copeland, P.R. (2006). Size matters: a view of selenocysteine incorporation from the ribosome. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63, 73-81.

Carmel-Harel, O., Stearman, R., Gasch, A.P., Botstein, D., Brown, P.O., and Storz, G. (2001). Role of thioredoxin reductase in the Yap1p-dependent response to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology* 39, 595-605.

Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., Kauselmann, G., Kern, H., Zevnik, B., Garrel, C., Saez, F., Cadet, R., Henry-Berger, J., *et al.* (2009). Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *J Clin Invest* 119, 2074-2085.

Chen, B., Rao, X., House, M.G., Nephew, K.P., Cullen, K.J., and Guo, Z. (2011). GPx3 promoter hypermethylation is a frequent event in human cancer and is associated with tumorigenesis and chemotherapy response. *Cancer letters* 309, 37-45.

Chen, C.J., Huang, H.S., and Chang, W.C. (2003). Depletion of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase up-regulates arachidonate metabolism by 12S-

lipoxygenase and cyclooxygenase 1 in human epidermoid carcinoma A431 cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17, 1694-1696.

Chen, C.J., Huang, H.S., Lin, S.B., and Chang, W.C. (2000). Regulation of cyclooxygenase and 12-lipoxygenase catalysis by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in A431 cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 62, 261-268.

Cheng, G., Cleary, A.M., Ye, Z.S., Hong, D.I., Lederman, S., and Baltimore, D. (1995). Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling. *Science (New York, NY)* 267, 1494-1498.

Chiarugi, P., Cirri, P., Taddei, M.L., Giannoni, E., Fiaschi, T., Buricchi, F., Camici, G., Raugei, G., and Ramponi, G. (2002). Insight into the role of low molecular weight phosphotyrosine phosphatase (LMW-PTP) on platelet-derived growth factor receptor (PDGF-r) signaling. LMW-PTP controls PDGF-r kinase activity through TYR-857 dephosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 277, 37331-37338.

Chiu, S.T., Hsieh, F.J., Chen, S.W., Chen, C.L., Shu, H.F., and Li, H. (2005). Clinicopathologic correlation of up-regulated genes identified using cDNA microarray and real-time reverse transcription-PCR in human colorectal cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 14, 437-443.

Cho, Y.S., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T.D., Guildford, M., and Chan, F.K. (2009). Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* 137, 1112-1123.

Choi, H.J., Kang, S.W., Yang, C.H., Rhee, S.G., and Ryu, S.E. (1998). Crystallization and preliminary X-ray studies of hORF6, a novel human antioxidant enzyme. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 54, 436-437.

Chu, F.F., Doroshov, J.H., and Esworthy, R.S. (1993). Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *The Journal of biological chemistry* 268, 2571-2576.

Cole-Ezea, P., Swan, D., Shanley, D., and Hesketh, J. (2012). Glutathione peroxidase 4 has a major role in protecting mitochondria from oxidative damage and maintaining oxidative phosphorylation complexes in gut epithelial cells. *Free radical biology & medicine* 53, 488-497.

Conrad, M. (2009). Transgenic mouse models for the vital selenoenzymes cytosolic thioredoxin reductase, mitochondrial thioredoxin reductase and glutathione peroxidase 4. *Biochimica et biophysica acta* 1790, 1575-1585.

Conrad, M., Jakupoglu, C., Moreno, S.G., Lippl, S., Banjac, A., Schneider, M., Beck, H., Hatzopoulos, A.K., Just, U., Sinowatz, F., *et al.* (2004). Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. *Molecular and cellular biology* 24, 9414-9423.

Conrad, M., Moreno, S.G., Sinowatz, F., Ursini, F., Kolle, S., Roveri, A., Brielmeier, M., Wurst, W., Maiorino, M., and Bornkamm, G.W. (2005). The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Molecular and cellular biology* 25, 7637-7644.

Conrad, M., Sandin, A., Forster, H., Seiler, A., Frijhoff, J., Dagnell, M., Bornkamm, G.W., Radmark, O., Hooft van Huijsduijnen, R., Aspenstrom, P., *et al.* (2010). 12/15-lipoxygenase-derived lipid peroxides control receptor tyrosine kinase signaling through oxidation of protein tyrosine phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 15774-15779.

Conrad, M., Schneider, M., Seiler, A., and Bornkamm, G.W. (2007). Physiological role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammals. *Biological chemistry* 388, 1019-1025.

de Haan, J.B., Bladier, C., Griffiths, P., Kelner, M., O'Shea, R.D., Cheung, N.S., Bronson, R.T., Silvestro, M.J., Wild, S., Zheng, S.S., *et al.* (1998). Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased

susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *The Journal of biological chemistry* 273, 22528-22536.

Dear, T.N., Campbell, K., and Rabbitts, T.H. (1991). Molecular cloning of putative odorant-binding and odorant-metabolizing proteins. *Biochemistry* 30, 10376-10382.

Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G.D., Mitchison, T.J., Moskowitz, M.A., and Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 1, 112-119.

Delaunay, A., Isnard, A.D., and Toledano, M.B. (2000). H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *The EMBO journal* 19, 5157-5166.

Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M.B., Vinh, J., and Toledano, M.B. (2002). A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111, 471-481.

Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M., and Liu, Z. (2000). The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity* 12, 419-429.

Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M., and Talalay, P. (2002). Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11908-11913.

Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E., Patel, D.N., Bauer, A.J., Cantley, A.M., Yang, W.S., *et al.* (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 149, 1060-1072.

Dolma, S., Lessnick, S.L., Hahn, W.C., and Stockwell, B.R. (2003). Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer cell* 3, 285-296.

Du, Y., Zhang, H., Lu, J., and Holmgren, A. (2012). Glutathione and glutaredoxin act as a backup of human thioredoxin reductase 1 to reduce thioredoxin 1 preventing cell death by aurothioglucose. *The Journal of biological chemistry* 287, 38210-38219.

Ellerby, L.M., Ellerby, H.M., Park, S.M., Holleran, A.L., Murphy, A.N., Fiskum, G., Kane, D.J., Testa, M.P., Kayalar, C., and Bredesen, D.E. (1996). Shift of the cellular oxidation-reduction potential in neural cells expressing Bcl-2. *Journal of neurochemistry* 67, 1259-1267.

Epp, O., Ladenstein, R., and Wendel, A. (1983). The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. *European journal of biochemistry / FEBS* 133, 51-69.

Esworthy, R.S., Aranda, R., Martin, M.G., Doroshov, J.H., Binder, S.W., and Chu, F.F. (2001). Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 281, G848-855.

Esworthy, R.S., Yang, L., Frankel, P.H., and Chu, F.F. (2005). Epithelium-specific glutathione peroxidase, Gpx2, is involved in the prevention of intestinal inflammation in selenium-deficient mice. *The Journal of nutrition* 135, 740-745.

Falck, E., Karlsson, S., Carlsson, J., Helenius, G., Karlsson, M., and Klinga-Levan, K. (2010). Loss of glutathione peroxidase 3 expression is correlated with epigenetic mechanisms in endometrial adenocarcinoma. *Cancer cell international* 10, 46.

Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R.C., Krebs, J., Srinivasula, S.M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L.C., Trapani, J.A., Tomaselli, K.J., Litwack, G., *et al.* (1996). In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 7464-7469.

Fernandes, A.P., and Holmgren, A. (2004). Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxidants & redox signaling* 6, 63-74.

Flohe, L., Gunzler, W.A., and Schock, H.H. (1973). Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett* 32, 132-134.

- Flohe, L., Loschen, G., Gunzler, W.A., and Eichele, E. (1972). Glutathione peroxidase, V. The kinetic mechanism. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie* 353, 987-999.
- Flohe, L., Toppo, S., Cozza, G., and Ursini, F. (2011). A comparison of thiol peroxidase mechanisms. *Antioxidants & redox signaling* 15, 763-780.
- Flohe, L., and Ursini, F. (2008). Peroxidase: a term of many meanings. *Antioxidants & redox signaling* 10, 1485-1490.
- Florian, S., Krehl, S., Loewinger, M., Kipp, A., Banning, A., Esworthy, S., Chu, F.F., and Brigelius-Flohe, R. (2010). Loss of GPx2 increases apoptosis, mitosis, and GPx1 expression in the intestine of mice. *Free radical biology & medicine* 49, 1694-1702.
- Florian, S., Wingler, K., Schmehl, K., Jacobasch, G., Kreuzer, O.J., Meyerhof, W., and Brigelius-Flohe, R. (2001). Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue. *Free radical research* 35, 655-663.
- Fomenko, D.E., Marino, S.M., and Gladyshev, V.N. (2008). Functional diversity of cysteine residues in proteins and unique features of catalytic redox-active cysteines in thiol oxidoreductases. *Molecules and cells* 26, 228-235.
- Fourquet, S., Huang, M.E., D'Autreaux, B., and Toledano, M.B. (2008). The dual functions of thiol-based peroxidases in H₂O₂ scavenging and signaling. *Antioxidants & redox signaling* 10, 1565-1576.
- Garry, M.R., Kavanagh, T.J., Faustman, E.M., Sidhu, J.S., Liao, R., Ware, C., Vliet, P.A., and Deeb, S.S. (2008). Sensitivity of mouse lung fibroblasts heterozygous for GPx4 to oxidative stress. *Free radical biology & medicine* 44, 1075-1087.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P.O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular biology of the cell* 11, 4241-4257.
- Giannoni, E., Chiarugi, P., Cozzi, G., Magnelli, L., Taddei, M.L., Fiaschi, T., Buricchi, F., Raugei, G., and Ramponi, G. (2003). Lymphocyte function-associated antigen-1-mediated T cell adhesion is impaired by low molecular weight phosphotyrosine phosphatase-dependent inhibition of FAK activity. *The Journal of biological chemistry* 278, 36763-36776.
- Gladyshev, V.N., Hatfield, D.L., and Berry, M.J. (2006). Selenoprotein and selenoproteins. *Selenium. Its Molecular Biology and Role in Human Health*. Springer, New York, 99-110.
- Gloeckner, C.J., Boldt, K., Schumacher, A., Roepman, R., and Ueffing, M. (2007). A novel tandem affinity purification strategy for the efficient isolation and characterisation of native protein complexes. *Proteomics* 7, 4228-4234.
- Godeas, C., Tramer, F., Micali, 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 novel role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 57, 1502-1508.
- Gross, A., Yin, X.M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Korsmeyer, S.J. (1999). Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *The Journal of biological chemistry* 274, 1156-1163.
- Gunzler, W.A., Vergin, H., Muller, I., and Flohe, L. (1972). [Glutathione peroxidase VI: the reaction of glutathione peroxidase with various hydroperoxides]. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie* 353, 1001-1004.
- Guo, Z., Ran, Q., Roberts, L.J., 2nd, Zhou, L., Richardson, A., Sharan, C., Wu, D., and Yang, H. (2008). Suppression of atherosclerosis by overexpression of glutathione peroxidase-4 in apolipoprotein E-deficient mice. *Free radical biology & medicine* 44, 343-352.

- Gutscher, M., Sobotta, M.C., Wabnitz, G.H., Ballikaya, S., Meyer, A.J., Samstag, Y., and Dick, T.P. (2009). Proximity-based protein thiol oxidation by H₂O₂-scavenging peroxidases. *The Journal of biological chemistry* 284, 31532-31540.
- Hatfield, D.L., Tsuji, P.A., Carlson, B.A., and Gladyshev, V.N. (2014). Selenium and selenocysteine: roles in cancer, health, and development. *Trends in biochemical sciences* 39, 112-120.
- Hayes, J.D., McMahon, M., Chowdhry, S., and Dinkova-Kostova, A.T. (2010). Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway. *Antioxidants & redox signaling* 13, 1713-1748.
- He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L., and Wang, X. (2009). Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- α . *Cell* 137, 1100-1111.
- He, Y., Wang, Y., Li, P., Zhu, S., Wang, J., and Zhang, S. (2011). Identification of GPX3 epigenetically silenced by CpG methylation in human esophageal squamous cell carcinoma. *Digestive diseases and sciences* 56, 681-688.
- Herbette, S., Roedel-Drevet, P., and Drevet, J.R. (2007). Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *The FEBS journal* 274, 2163-2180.
- Ho, Y.S., Magnenat, J.L., Bronson, R.T., Cao, J., Gargano, M., Sugawara, M., and Funk, C.D. (1997). Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *The Journal of biological chemistry* 272, 16644-16651.
- Hofmann, B., Hecht, H.J., and Flohe, L. (2002). Peroxiredoxins. *Biological chemistry* 383, 347-364.
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.L., Schneider, P., Seed, B., and Tschopp, J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature immunology* 1, 489-495.
- Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Annual review of biochemistry* 54, 237-271.
- Hondal, R.J., and Ruggles, E.L. (2011). Differing views of the role of selenium in thioredoxin reductase. *Amino acids* 41, 73-89.
- Hsu, H., Huang, J., Shu, H.B., Baichwal, V., and Goeddel, D.V. (1996). TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 4, 387-396.
- Hu, H.M., O'Rourke, K., Boguski, M.S., and Dixit, V.M. (1994). A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40. *The Journal of biological chemistry* 269, 30069-30072.
- Huang, C., Ding, G., Gu, C., Zhou, J., Kuang, M., Ji, Y., He, Y., Kondo, T., and Fan, J. (2012). Decreased selenium-binding protein 1 enhances glutathione peroxidase 1 activity and downregulates HIF-1 α to promote hepatocellular carcinoma invasiveness. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18, 3042-3053.
- Huang, H.S., Chen, C.J., Suzuki, H., Yamamoto, S., and Chang, W.C. (1999). Inhibitory effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase on the activity of lipoxygenases and cyclooxygenases. *Prostaglandins & other lipid mediators* 58, 65-75.
- Hurst, R., Korytowski, W., Kriska, T., Esworthy, R.S., Chu, F.F., and Girotti, A.W. (2001). Hyperresistance to cholesterol hydroperoxide-induced peroxidative injury and apoptotic death in a tumor cell line that overexpresses glutathione peroxidase isotype-4. *Free radical biology & medicine* 31, 1051-1065.
- Imai, H., Hirao, F., Sakamoto, T., Sekine, K., Mizukura, Y., Saito, M., Kitamoto, T., Hayasaka, M., Hanaoka, K., and Nakagawa, Y. (2003). Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene. *Biochemical and biophysical research communications* 305, 278-286.

Imai, H., and Nakagawa, Y. (2003). Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free radical biology & medicine* 34, 145-169.

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. *The Journal of biological chemistry* 273, 1990-1997.

Inoue, Y., Matsuda, T., Sugiyama, K., Izawa, S., and Kimura, A. (1999). Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 274, 27002-27009.

Jakupoglu, C., Przemeck, G.K., Schneider, M., Moreno, S.G., Mayr, N., Hatzopoulos, A.K., de Angelis, M.H., Wurst, W., Bornkamm, G.W., Brielmeier, M., *et al.* (2005). Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development. *Molecular and cellular biology* 25, 1980-1988.

Jung, B.G., Lee, K.O., Lee, S.S., Chi, Y.H., Jang, H.H., Kang, S.S., Lee, K., Lim, D., Yoon, S.C., Yun, D.J., *et al.* (2002). A Chinese cabbage cDNA with high sequence identity to phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases encodes a novel isoform of thioredoxin-dependent peroxidase. *The Journal of biological chemistry* 277, 12572-12578.

Kansanen, E., Jyrkkanen, H.K., and Levonen, A.L. (2012). Activation of stress signaling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids. *Free radical biology & medicine* 52, 973-982.

Keaney, J.F., Jr., Larson, M.G., Vasan, R.S., Wilson, P.W., Lipinska, I., Corey, D., Massaro, J.M., Sutherland, P., Vita, J.A., Benjamin, E.J., *et al.* (2003). Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23, 434-439.

Kim, I.Y., Guimaraes, M.J., Zlotnik, A., Bazan, J.F., and Stadtman, T.C. (1997). Fetal mouse selenophosphate synthetase 2 (SPS2): characterization of the cysteine mutant form overproduced in a baculovirus-insect cell system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 418-421.

Kipp, A., Banning, A., and Brigelius-Flohe, R. (2007). Activation of the glutathione peroxidase 2 (GPx2) promoter by beta-catenin. *Biological chemistry* 388, 1027-1033.

Kipp, A.P., Muller, M.F., Goken, E.M., Deubel, S., and Brigelius-Flohe, R. (2012). The selenoproteins GPx2, TrxR2 and TrxR3 are regulated by Wnt signalling in the intestinal epithelium. *Biochimica et biophysica acta* 1820, 1588-1596.

Klinghoffer, R.A., and Kazlauskas, A. (1995). Identification of a putative Syp substrate, the PDGF beta receptor. *The Journal of biological chemistry* 270, 22208-22217.

Knoops, B., Clippe, A., Bogard, C., Arsalane, K., Wattiez, R., Hermans, C., Duconseille, E., Falmagne, P., and Bernard, A. (1999). Cloning and characterization of AOEB166, a novel mammalian antioxidant enzyme of the peroxiredoxin family. *The Journal of biological chemistry* 274, 30451-30458.

Koh, C.S., Didierjean, C., Navrot, N., Panjikar, S., Mulliert, G., Rouhier, N., Jacquot, J.P., Aubry, A., Shawkataly, O., and Corbier, C. (2007). Crystal structures of a poplar thioredoxin peroxidase that exhibits the structure of glutathione peroxidases: insights into redox-driven conformational changes. *Journal of molecular biology* 370, 512-529.

Kohrle, J. (2005). Selenium and the control of thyroid hormone metabolism. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 15, 841-853.

Kovalenko, M., Denner, K., Sandstrom, J., Persson, C., Gross, S., Jandt, E., Vilella, R., Bohmer, F., and Ostman, A. (2000). Site-selective dephosphorylation of the platelet-derived growth factor beta-receptor by the receptor-like protein-tyrosine phosphatase DEP-1. *The Journal of biological chemistry* 275, 16219-16226.

Kryukov, G.V., Castellano, S., Novoselov, S.V., Lobanov, A.V., Zehab, O., Guigo, R., and Gladyshev, V.N. (2003). Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science (New York, NY)* 300, 1439-1443.

Kuge, S., and Jones, N. (1994). YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *The EMBO journal* 13, 655-664.

Kuge, S., Jones, N., and Nomoto, A. (1997). Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *The EMBO journal* 16, 1710-1720.

Kuge, S., Toda, T., Iizuka, N., and Nomoto, A. (1998). Crm1 (Xpol) dependent nuclear export of the budding yeast transcription factor yAP-1 is sensitive to oxidative stress. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 3, 521-532.

Kwon, J., Qu, C.K., Maeng, J.S., Falahati, R., Lee, C., and Williams, M.S. (2005). Receptor-stimulated oxidation of SHP-2 promotes T-cell adhesion through SLP-76-ADAP. *The EMBO journal* 24, 2331-2341.

Ladenstein, R., Epp, O., Bartels, K., Jones, A., Huber, R., and Wendel, A. (1979). Structure analysis and molecular model of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 2.8 Å resolution. *Journal of molecular biology* 134, 199-218.

Lee, O.J., Schneider-Stock, R., McChesney, P.A., Kuester, D., Roessner, A., Vieth, M., Moskaluk, C.A., and El-Rifai, W. (2005). Hypermethylation and loss of expression of glutathione peroxidase-3 in Barrett's tumorigenesis. *Neoplasia (New York, NY)* 7, 854-861.

Lee, S.R., Kwon, K.S., Kim, S.R., and Rhee, S.G. (1998). Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *The Journal of biological chemistry* 273, 15366-15372.

Lee, Y.S., Kim, A.Y., Choi, J.W., Kim, M., Yasue, S., Son, H.J., Masuzaki, H., Park, K.S., and Kim, J.B. (2008). Dysregulation of adipose glutathione peroxidase 3 in obesity contributes to local and systemic oxidative stress. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 22, 2176-2189.

Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.

Liang, H., Yoo, S.E., Na, R., Walter, C.A., Richardson, A., and Ran, Q. (2009). Short form glutathione peroxidase 4 is the essential isoform required for survival and somatic mitochondrial functions. *The Journal of biological chemistry* 284, 30836-30844.

Lin, Y., Devin, A., Rodriguez, Y., and Liu, Z.G. (1999). Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes & development* 13, 2514-2526.

Liu, J., Du, J., Zhang, Y., Sun, W., Smith, B.J., Oberley, L.W., and Cullen, J.J. (2006). Suppression of the malignant phenotype in pancreatic cancer by overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Hum Gene Ther* 17, 105-116.

Loh, K., Deng, H., Fukushima, A., Cai, X., Boivin, B., Galic, S., Bruce, C., Shields, B.J., Skiba, B., Ooms, L.M., *et al.* (2009). Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. *Cell Metab* 10, 260-272.

Lu, J., and Holmgren, A. (2009). Selenoproteins. *The Journal of biological chemistry* 284, 723-727.

Lu, L., Oveson, B.C., Jo, Y.J., Lauer, T.W., Usui, S., Komeima, K., Xie, B., and Campochiaro, P.A. (2009). Increased expression of glutathione peroxidase 4 strongly protects retina from oxidative damage. *Antioxidants & redox signaling* 11, 715-724.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.

Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Mizuno, K., Matsuzawa, Y., and Matsubara, K. (1997). Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. *Gene* 190, 227-235.

Mahadev, K., Zilbering, A., Zhu, L., and Goldstein, B.J. (2001). Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. *The Journal of biological chemistry* 276, 21938-21942.

Maiorino, M., Aumann, K.D., Brigelius-Flohe, R., Doria, D., van den Heuvel, J., McCarthy, J., Roveri, A., Ursini, F., and Flohe, L. (1995). Probing the presumed catalytic triad

of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biol Chem Hoppe Seyler* 376, 651-660.

Maiorino, M., Mauri, P., Roveri, A., Benazzi, L., Toppo, S., Bosello, V., and Ursini, F. (2005a). Primary structure of the nuclear forms of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) in rat spermatozoa. *FEBS Lett* 579, 667-670.

Maiorino, M., Roche, C., Kiess, M., Koenig, K., Gawlik, D., Matthes, M., Naldini, E., Pierce, R., and Flohe, L. (1996). A selenium-containing phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase in *Schistosoma mansoni*. *European journal of biochemistry / FEBS* 238, 838-844.

Maiorino, M., Roveri, A., Benazzi, L., Bosello, V., Mauri, P., Toppo, S., Tosatto, S.C., and Ursini, F. (2005b). Functional interaction of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase with sperm mitochondrion-associated cysteine-rich protein discloses the adjacent cysteine motif as a new substrate of the selenoperoxidase. *The Journal of biological chemistry* 280, 38395-38402.

Maiorino, M., Scapin, M., Ursini, F., Biasolo, M., Bosello, V., and Flohe, L. (2003). Distinct promoters determine alternative transcription of *gpx-4* into phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase variants. *The Journal of biological chemistry* 278, 34286-34290.

Maiorino, M., Ursini, F., Bosello, V., Toppo, S., Tosatto, S.C., Mauri, P., Becker, K., Roveri, A., Bulato, C., Benazzi, L., *et al.* (2007). The thioredoxin specificity of *Drosophila* GPx: a paradigm for a peroxiredoxin-like mechanism of many glutathione peroxidases. *Journal of molecular biology* 365, 1033-1046.

Mannes, A.M., Seiler, A., Bosello, V., Maiorino, M., and Conrad, M. (2011). Cysteine mutant of mammalian GPx4 rescues cell death induced by disruption of the wild-type selenoenzyme. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25, 2135-2144.

Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F.K., and Margis-Pinheiro, M. (2008). Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *The FEBS journal* 275, 3959-3970.

Mariotti, M., Ridge, P.G., Zhang, Y., Lobanov, A.V., Pringle, T.H., Guigo, R., Hatfield, D.L., and Gladyshev, V.N. (2012). Composition and evolution of the vertebrate and mammalian selenoproteomes. *PloS one* 7, e33066.

Matsui, M., Oshima, M., Oshima, H., Takaku, K., Maruyama, 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.

Mauri, P., Benazzi, L., Flohe, L., Maiorino, M., Pietta, P.G., Pilawa, S., Roveri, A., and Ursini, F. (2003). Versatility of selenium catalysis in PHGPx unraveled by LC/ESI-MS/MS. *Biological chemistry* 384, 575-588.

McClung, J.P., Roneker, C.A., Mu, W., Lisk, D.J., Langlais, P., Liu, F., and Lei, X.G. (2004). Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 8852-8857.

McMahon, M., Lamont, D.J., Beattie, K.A., and Hayes, J.D. (2010). Keap1 perceives stress via three sensors for the endogenous signaling molecules nitric oxide, zinc, and alkenals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 18838-18843.

McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M., and Hayes, J.D. (2006). Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a "tethering" mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. *The Journal of biological chemistry* 281, 24756-24768.

Meng, T.C., Fukada, T., and Tonks, N.K. (2002). Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Molecular cell* 9, 387-399.

Meylan, E., and Tschopp, J. (2005). The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends in biochemical sciences* 30, 151-159.

- Mills, G.C. (1957). Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *The Journal of biological chemistry* 229, 189-197.
- Mitsui, A., Hamuro, J., Nakamura, H., Kondo, N., Hirabayashi, Y., Ishizaki-Koizumi, S., Hirakawa, T., Inoue, T., and Yodoi, J. (2002). Overexpression of human thioredoxin in transgenic mice controls oxidative stress and life span. *Antioxidants & redox signaling* 4, 693-696.
- Modjtahedi, N., Giordanetto, F., Madeo, F., and Kroemer, G. (2006). Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends Cell Biol* 16, 264-272.
- Moreno, S.G., Laux, G., Brielmeier, M., Bornkamm, G.W., and Conrad, M. (2003). Testis-specific expression of the nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biological chemistry* 384, 635-643.
- Mork, H., al-Taie, O.H., Bahr, K., Zierer, A., Beck, C., Scheurlen, M., Jakob, F., and Kohrle, J. (2000). Inverse mRNA expression of the selenocysteine-containing proteins GI-GPx and SeP in colorectal adenomas compared with adjacent normal mucosa. *Nutrition and cancer* 37, 108-116.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., *et al.* (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-827.
- Nakamura, H., Mitsui, A., and Yodoi, J. (2002). Thioredoxin overexpression in transgenic mice. *Methods in enzymology* 347, 436-440.
- Nguyen, V.D., Saaranen, M.J., Karala, A.R., Lappi, A.K., Wang, L., Raykhel, I.B., Alanen, H.I., Salo, K.E., Wang, C.C., and Ruddock, L.W. (2011). Two endoplasmic reticulum PDI peroxidases increase the efficiency of the use of peroxide during disulfide bond formation. *Journal of molecular biology* 406, 503-515.
- Niture, S.K., and Jaiswal, A.K. (2012). Nrf2 protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 287, 9873-9886.
- Noblanc, A., Peltier, M., Damon-Soubeyrand, C., Kerchkove, N., Chabory, E., Vernet, P., Saez, F., Cadet, R., Janny, L., Pons-Rejraji, H., *et al.* (2012). Epididymis response partly compensates for spermatozoa oxidative defects in snGPx4 and GPx5 double mutant mice. *PLoS one* 7, e38565.
- Nomura, K., Imai, H., Koumura, T., Arai, M., and Nakagawa, Y. (1999). Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. *The Journal of biological chemistry* 274, 29294-29302.
- Norberg, E., Gogvadze, V., Vakifahmetoglu, H., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2010a). Oxidative modification sensitizes mitochondrial apoptosis-inducing factor to calpain-mediated processing. *Free radical biology & medicine* 48, 791-797.
- Norberg, E., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2010b). Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochemical and biophysical research communications* 396, 95-100.
- Nordberg, J., and Arner, E.S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology & medicine* 31, 1287-1312.
- Olson, G.E., Whitin, J.C., Hill, K.E., Winfrey, V.P., Motley, A.K., Austin, L.M., Deal, J., Cohen, H.J., and Burk, R.F. (2010). Extracellular glutathione peroxidase (Gpx3) binds specifically to basement membranes of mouse renal cortex tubule cells. *American journal of physiology Renal physiology* 298, F1244-1253.
- Oltvai, Z.N., Millman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619.
- Omaye, S.T., and Tappel, A.L. (1974). Effect of dietary selenium on glutathione peroxidase in the chick. *The Journal of nutrition* 104, 747-753.
- Ostman, A., and Bohmer, F.D. (2001). Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends Cell Biol* 11, 258-266.

Parsonage, D., Karplus, P.A., and Poole, L.B. (2008). Substrate specificity and redox potential of AhpC, a bacterial peroxiredoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 8209-8214.

Pazdernik, N.J., Donner, D.B., Goebel, M.G., and Harrington, M.A. (1999). Mouse receptor interacting protein 3 does not contain a caspase-recruiting or a death domain but induces apoptosis and activates NF-kappaB. *Molecular and cellular biology* 19, 6500-6508.

Peng, D.F., Razvi, M., Chen, H., Washington, K., Roessner, A., Schneider-Stock, R., and El-Rifai, W. (2009). DNA hypermethylation regulates the expression of members of the Mu-class glutathione S-transferases and glutathione peroxidases in Barrett's adenocarcinoma. *Gut* 58, 5-15.

Persson, C., Savenhed, C., Bourdeau, A., Tremblay, M.L., Markova, B., Bohmer, F.D., Haj, F.G., Neel, B.G., Elson, A., Heldin, C.H., *et al.* (2004). Site-selective regulation of platelet-derived growth factor beta receptor tyrosine phosphorylation by T-cell protein tyrosine phosphatase. *Molecular and cellular biology* 24, 2190-2201.

Peskin, A.V., Low, F.M., Paton, L.N., Maghzal, G.J., Hampton, M.B., and Winterbourn, C.C. (2007). The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H₂O₂ is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents. *The Journal of biological chemistry* 282, 11885-11892.

Pfeifer, H., Conrad, M., Roethlein, 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 journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15, 1236-1238.

Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., and Clevers, H. (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes & development* 17, 1709-1713.

Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods (San Diego, Calif)* 24, 218-229.

Pushpa-Rekha, T.R., Burdsall, A.L., Oleksa, L.M., Chisolm, G.M., and Driscoll, D.M. (1995). Rat phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. cDNA cloning and identification of multiple transcription and translation start sites. *The Journal of biological chemistry* 270, 26993-26999.

Ran, Q., Liang, H., Gu, M., Qi, W., Walter, C.A., Roberts, L.J., 2nd, Herman, B., Richardson, A., and Van Remmen, H. (2004). Transgenic mice overexpressing glutathione peroxidase 4 are protected against oxidative stress-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 279, 55137-55146.

Ran, Q., Liang, H., Ikeno, Y., Qi, W., Prolla, T.A., Roberts, L.J., 2nd, Wolf, N., Van Remmen, H., and Richardson, A. (2007). Reduction in glutathione peroxidase 4 increases life span through increased sensitivity to apoptosis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62, 932-942.

Rejraji, H., Vernet, P., and Drevet, J.R. (2002). GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymidis lumen at three different locations. *Molecular reproduction and development* 63, 96-103.

Rhee, S.G., Kang, S.W., Jeong, W., Chang, T.S., Yang, K.S., and Woo, H.A. (2005). Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr Opin Cell Biol* 17, 183-189.

Rhee, S.G., and Woo, H.A. (2011). Multiple functions of peroxiredoxins: peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H₂O₂, and protein chaperones. *Antioxidants & redox signaling* 15, 781-794.

Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature biotechnology* 17, 1030-1032.

Rocher, C., Lalanne, J.L., and Chaudiere, J. (1992). Purification and properties of a recombinant sulfur analog of murine selenium-glutathione peroxidase. *European journal of biochemistry / FEBS* 205, 955-960.

- Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G., and Hoekstra, W.G. (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science (New York, NY)* 179, 588-590.
- Rouhier, N., and Jacquot, J.P. (2005). The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free radical biology & medicine* 38, 1413-1421.
- Roveri, A., Maiorino, M., Nisii, C., and Ursini, F. (1994). Purification and characterization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from rat testis mitochondrial membranes. *Biochimica et biophysica acta* 1208, 211-221.
- Roveri, A., Ursini, F., Flohe, L., and Maiorino, M. (2001). PHGPx and spermatogenesis. *BioFactors (Oxford, England)* 14, 213-222.
- Sakamoto, H., Imai, H., and Nakagawa, Y. (2000). Involvement of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the modulation of prostaglandin D2 synthesis. *The Journal of biological chemistry* 275, 40028-40035.
- Salmeen, A., and Barford, D. (2005). Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases. *Antioxidants & redox signaling* 7, 560-577.
- Sato, T., Machida, T., Takahashi, S., Iyama, S., Sato, Y., Kuribayashi, K., Takada, K., Oku, T., Kawano, Y., Okamoto, T., *et al.* (2004). Fas-mediated apoptosome formation is dependent on reactive oxygen species derived from mitochondrial permeability transition in Jurkat cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 173, 285-296.
- Sayed, A.A., and Williams, D.L. (2004). Biochemical characterization of 2-Cys peroxiredoxins from *Schistosoma mansoni*. *The Journal of biological chemistry* 279, 26159-26166.
- Schneider, M., Forster, H., Boersma, A., Seiler, A., Wehnes, H., Sinowatz, F., Neumuller, C., Deutsch, M.J., Walch, A., Hrabe de Angelis, M., *et al.* (2009). Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, 3233-3242.
- Schneider, M., Vogt Weisenhorn, D.M., Seiler, A., Bornkamm, G.W., Brielmeier, M., and Conrad, M. (2006). Embryonic expression profile of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Gene Expr Patterns* 6, 489-494.
- Schomburg, L., and Kohrle, J. (2008). On the importance of selenium and iodine metabolism for thyroid hormone biosynthesis and human health. *Molecular nutrition & food research* 52, 1235-1246.
- Schomburg, L., and Schweizer, U. (2009). Hierarchical regulation of selenoprotein expression and sex-specific effects of selenium. *Biochimica et biophysica acta*.
- Seiler, A., Schneider, M., Forster, H., Roth, S., Wirth, E.K., Culmsee, C., Plesnila, N., Kremmer, E., Radmark, O., Wurst, W., *et al.* (2008). Glutathione Peroxidase 4 Senses and Translates Oxidative Stress into 12/15-Lipoxygenase Dependent- and AIF-Mediated Cell Death. *Cell Metab* 8, 237-248.
- Seligman, J., Kosower, N.S., Weissenberg, R., and Shalgi, R. (1994). Thiol-disulfide status of human sperm proteins. *J Reprod Fertil* 101, 435-443.
- Seligman, J., and Shalgi, R. (1991). Protein thiols in spermatozoa and epididymal fluid of rats. *J Reprod Fertil* 93, 399-408.
- Sengupta, A., Lichti, U.F., Carlson, B.A., Cataisson, C., Ryscavage, A.O., Mikulec, C., Conrad, M., Fischer, S.M., Hatfield, D.L., and Yuspa, S.H. (2013). Targeted disruption of glutathione peroxidase 4 in mouse skin epithelial cells impairs postnatal hair follicle morphogenesis that is partially rescued through inhibition of COX-2. *The Journal of investigative dermatology* 133, 1731-1741.
- Sengupta, A., Lichti, U.F., Carlson, B.A., Ryscavage, A.O., Gladyshev, V.N., Yuspa, S.H., and Hatfield, D.L. (2010). Selenoproteins are essential for proper keratinocyte function and skin development. *PLoS one* 5, e12249.
- Shalgi, R., Seligman, J., and Kosower, N.S. (1989). Dynamics of the thiol status of rat spermatozoa during maturation: analysis with the fluorescent labeling agent monobromobimane. *Biol Reprod* 40, 1037-1045.

- Shi, Z.Z., Osei-Frimpong, J., Kala, G., Kala, S.V., Barrios, R.J., Habib, G.M., Lukin, D.J., Danney, C.M., Matzuk, M.M., and Lieberman, M.W. (2000). Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 5101-5106.
- Shidoji, Y., Okamoto, K., Muto, Y., Komura, S., Ohishi, N., and Yagi, K. (2006). Prevention of geranylgeranoic acid-induced apoptosis by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene. *J Cell Biochem* 97, 178-187.
- Singh, D.K., Kumar, D., Siddiqui, Z., Basu, S.K., Kumar, V., and Rao, K.V. (2005). The strength of receptor signaling is centrally controlled through a cooperative loop between Ca²⁺ and an oxidant signal. *Cell* 121, 281-293.
- Skouta, R., Dixon, S.J., Wang, J., Dunn, D.E., Orman, M., Shimada, K., Rosenberg, P.A., Lo, D.C., Weinberg, J.M., Linkermann, A., *et al.* (2014). Ferrostatins inhibit oxidative lipid damage and cell death in diverse disease models. *Journal of the American Chemical Society* 136, 4551-4556.
- Smith, C.A., Farrah, T., and Goodwin, R.G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76, 959-962.
- Soerensen, J., Jakupoglu, C., Beck, H., Forster, H., Schmidt, J., Schmahl, W., Schweizer, U., Conrad, M., and Brielmeier, M. (2008). The role of thioredoxin reductases in brain development. *PLoS one* 3, e1813.
- Stanger, B.Z., Leder, P., Lee, T.H., Kim, E., and Seed, B. (1995). RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* 81, 513-523.
- Su, D., Novoselov, S.V., Sun, Q.A., Moustafa, M.E., Zhou, Y., Oko, R., Hatfield, D.L., and Gladyshev, V.N. (2005). Mammalian selenoprotein thioredoxin-glutathione reductase. Roles in disulfide bond formation and sperm maturation. *The Journal of biological chemistry* 280, 26491-26498.
- Sun, Q.A., Kirnarsky, L., Sherman, S., and Gladyshev, V.N. (2001). Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 3673-3678.
- Sun, X., Lee, J., Navas, T., Baldwin, D.T., Stewart, T.A., and Dixit, V.M. (1999). RIP3, a novel apoptosis-inducing kinase. *The Journal of biological chemistry* 274, 16871-16875.
- Suppmann, S., Persson, B.C., and Bock, A. (1999). Dynamics and efficiency in vivo of UGA-directed selenocysteine insertion at the ribosome. *The EMBO journal* 18, 2284-2293.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., *et al.* (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.
- Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M., and Kroemer, G. (1996). Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *The Journal of experimental medicine* 184, 1331-1341.
- Tartaglia, L.A., and Goeddel, D.V. (1992). Two TNF receptors. *Immunology today* 13, 151-153.
- Thomas, J.P., Geiger, P.G., Maiorino, M., Ursini, F., and Girotti, A.W. (1990). Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteins. *Biochimica et biophysica acta* 1045, 252-260.
- Tong, K.I., Padmanabhan, B., Kobayashi, A., Shang, C., Hirotsu, Y., Yokoyama, S., and Yamamoto, M. (2007). Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response. *Molecular and cellular biology* 27, 7511-7521.
- Tonks, N.K. (2006). Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 833-846.
- Toppo, S., Flohe, L., Ursini, F., Vanin, S., and Maiorino, M. (2009). Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochimica et biophysica acta* 1790, 1486-1500.

- Toppo, S., Vanin, S., Bosello, V., and Tosatto, S.C. (2008). Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily. *Antioxidants & redox signaling* 10, 1501-1514.
- Tosatto, S.C., Bosello, V., Fogolari, F., Mauri, P., Roveri, A., Toppo, S., Flohe, L., Ursini, F., and Maiorino, M. (2008). The catalytic site of glutathione peroxidases. *Antioxidants & redox signaling* 10, 1515-1526.
- Ueta, T., Inoue, T., Furukawa, T., Tamaki, Y., Nakagawa, Y., Imai, H., and Yanagi, Y. (2012). Glutathione peroxidase 4 is required for maturation of photoreceptor cells. *The Journal of biological chemistry* 287, 7675-7682.
- Ursini, F., and Bindoli, A. (1987). The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. *Chemistry and physics of lipids* 44, 255-276.
- Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., and Flohe, L. (1999). Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science (New York, NY)* 285, 1393-1396.
- Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohe, R., Aumann, K.D., Roveri, A., Schomburg, D., and Flohe, L. (1995). Diversity of glutathione peroxidases. *Methods in enzymology* 252, 38-53.
- Ursini, F., Maiorino, M., and Gregolin, C. (1985). The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochimica et biophysica acta* 839, 62-70.
- Ursini, F., Maiorino, M., Valente, M., Ferri, L., and Gregolin, C. (1982). Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochimica et biophysica acta* 710, 197-211.
- V.N.; G. (2006). Selenoproteins and selenoproteomes. *Selenium: Its molecular biology and role in human health*, Second Edition, Springer Science+Business Media LLC, 99-110.
- Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., and Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature reviews Molecular cell biology* 15, 135-147.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., and Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 700-714.
- Varghese, J., Khandre, N.S., and Sarin, A. (2003). Caspase-3 activation is an early event and initiates apoptotic damage in a human leukemia cell line. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 8, 363-370.
- Vido, K., Spector, D., Lagniel, G., Lopez, S., Toledano, M.B., and Labarre, J. (2001). A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 276, 8469-8474.
- Wallace E., C.G.W., and Calvin H. L. (1983). Effects of selenium deficiency on the shape and arrangement of rodent sperm mitochondria. *Gamete Res* 4, 389-399.
- Wang, H.P., Qian, S.Y., Schafer, F.Q., Domann, F.E., Oberley, L.W., and Buettner, G.R. (2001). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase protects against singlet oxygen-induced cell damage of photodynamic therapy. *Free radical biology & medicine* 30, 825-835.
- Wang, K., Yin, X.M., Chao, D.T., Milliman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1996). BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes & development* 10, 2859-2869.
- Watson, W.H., Heilman, J.M., Hughes, L.L., and Spielberger, J.C. (2008). Thioredoxin reductase-1 knock down does not result in thioredoxin-1 oxidation. *Biochemical and biophysical research communications* 368, 832-836.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science (New York, NY)* 292, 727-730.
- Wei, P.C., Hsieh, Y.H., Su, M.I., Jiang, X., Hsu, P.H., Lo, W.T., Weng, J.Y., Jeng, Y.M., Wang, J.M., Chen, P.L., *et al.* (2012). Loss of the oxidative stress sensor NPGPx

compromises GRP78 chaperone activity and induces systemic disease. *Molecular cell* **48**, 747-759.

Whitin, J.C., Bhamre, S., Tham, D.M., and Cohen, H.J. (2002). Extracellular glutathione peroxidase is secreted basolaterally by human renal proximal tubule cells. *American journal of physiology Renal physiology* **283**, F20-28.

Winterbourn, C.C., and Hampton, M.B. (2008). Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free radical biology & medicine* **45**, 549-561.

Wirth, E.K., Conrad, M., Winterer, J., Wozny, C., Carlson, B.A., Roth, S., Schmitz, D., Bornkamm, G.W., Coppola, V., Tessarollo, L., *et al.* (2010). Neuronal selenoprotein expression is required for interneuron development and prevents seizures and neurodegeneration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **24**, 844-852.

Wood, Z.A., Schroder, E., Robin Harris, J., and Poole, L.B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in biochemical sciences* **28**, 32-40.

Wortmann, M., Schneider, M., Pircher, J., Hellfritsch, J., Aichler, M., Vegi, N., Kolle, P., Kuhlencordt, P., Walch, A., Pohl, U., *et al.* (2013). Combined deficiency in glutathione peroxidase 4 and vitamin e causes multiorgan thrombus formation and early death in mice. *Circulation research* **113**, 408-417.

Wu, A., Wemmie, J.A., Edgington, N.P., Goebel, M., Guevara, J.L., and Moye-Rowley, W.S. (1993). Yeast bZip proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance. *The Journal of biological chemistry* **268**, 18850-18858.

Wu, S.H., Oldfield, J.E., Whanger, P.D., and Weswig, P.H. (1973). Effect of selenium, vitamin E, and antioxidants on testicular function in rats. *Biol Reprod* **8**, 625-629.

Yagoda, N., von Rechenberg, M., Zaganjor, E., Bauer, A.J., Yang, W.S., Fridman, D.J., Wolpaw, A.J., Smukste, I., Peltier, J.M., Boniface, J.J., *et al.* (2007). RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature* **447**, 864-868.

Yan, C., Lee, L.H., and Davis, L.I. (1998). Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *The EMBO journal* **17**, 7416-7429.

Yang, W.S., SriRamaratnam, R., Welsch, M.E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V.S., Cheah, J.H., Clemons, P.A., Shamji, A.F., Clish, C.B., *et al.* (2014). Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell* **156**, 317-331.

Yang, W.S., and Stockwell, B.R. (2008). Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells. *Chemistry & biology* **15**, 234-245.

Yang, Y., Cheng, J.Z., Singhal, S.S., Saini, M., Pandya, U., Awasthi, S., and Awasthi, Y.C. (2001). Role of glutathione S-transferases in protection against lipid peroxidation. Overexpression of hGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation. *The Journal of biological chemistry* **276**, 19220-19230.

Yant, L.J., Ran, Q., Rao, L., Van Remmen, H., Shibatani, T., Belter, J.G., Motta, L., Richardson, A., and Prolla, T.A. (2003). The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free radical biology & medicine* **34**, 496-502.

Yin, X.M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K.A., and Korsmeyer, S.J. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* **400**, 886-891.

Yoo, M.H., Gu, X., Xu, X.M., Kim, J.Y., Carlson, B.A., Patterson, A.D., Cai, H., Gladyshev, V.N., and Hatfield, D.L. (2010). Delineating the role of glutathione peroxidase 4 in protecting cells against lipid hydroperoxide damage and in Alzheimer's disease. *Antioxidants & redox signaling* **12**, 819-827.

Yoo, S.E., Chen, L., Na, R., Liu, Y., Rios, C., Van Remmen, H., Richardson, A., and Ran, Q. (2012). Gpx4 ablation in adult mice results in a lethal phenotype accompanied by neuronal loss in brain. *Free radical biology & medicine*.

Yu, P.W., Huang, B.C., Shen, M., Quast, J., Chan, E., Xu, X., Nolan, G.P., Payan, D.G., and Luo, Y. (1999). Identification of RIP3, a RIP-like kinase that activates apoptosis and NFkappaB. *Current biology* : CB 9, 539-542.

Yu, Y.P., Yu, G., Tseng, G., Cieply, K., Nelson, J., Defrances, M., Zarnegar, R., Michalopoulos, G., and Luo, J.H. (2007). Glutathione peroxidase 3, deleted or methylated in prostate cancer, suppresses prostate cancer growth and metastasis. *Cancer research* 67, 8043-8050.

Zamzami, N., Susin, S.A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M., and Kroemer, G. (1996). Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *The Journal of experimental medicine* 183, 1533-1544.

Zhang, D.D., and Hannink, M. (2003). Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Molecular and cellular biology* 23, 8137-8151.

Zhang, D.D., Lo, S.C., Cross, J.V., Templeton, D.J., and Hannink, M. (2004). Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Molecular and cellular biology* 24, 10941-10953.

Zhang, D.W., Shao, J., Lin, J., Zhang, N., Lu, B.J., Lin, S.C., Dong, M.Q., and Han, J. (2009). RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science (New York, NY)* 325, 332-336.

Zhang, S.Q., Kovalenko, A., Cantarella, G., and Wallach, D. (2000). Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamm) upon receptor stimulation. *Immunity* 12, 301-311.

Zhang, X., Zheng, Y., Fried, L.E., Du, Y., Montano, S.J., Sohn, A., Lefkove, B., Holmgren, L., Arbiser, J.L., Holmgren, A., *et al.* (2011). Disruption of the mitochondrial thioredoxin system as a cell death mechanism of cationic triphenylmethanes. *Free radical biology & medicine* 50, 811-820.

Zhang, Y., and Gordon, G.B. (2004). A strategy for cancer prevention: stimulation of the Nrf2-ARE signaling pathway. *Molecular cancer therapeutics* 3, 885-893.

Zimmermann, A.K., Loucks, F.A., Schroeder, E.K., Bouchard, R.J., Tyler, K.L., and Linseman, D.A. (2007). Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: a molecular basis for Bcl-2 antioxidant function at mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 282, 29296-29304.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	<i>Antioxidant response element</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
BSO	Buthioninsulfoximin
cGPx4	zytosolische GPx4
C _P	peroxidatives Cystein
C _R	<i>Resolving Cysteine</i>
COX	Cyclooxygenase
Cys	Cystein
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ehlylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
Ero1	ER Oxidoreductin-1
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
γ-GCS	γ-GlutamylCys-Synthetase
GPx	Glutathionperoxidase
GPx4	Glutathion-Peroxidase 4
GRP78	Glucose-reguliertes Protein 78
Grx	Glutaredoxin
GSH	Glutathion
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
Hsp90	Hitze-Schock-Protein 90

IAA	Iodacetamid
Keap1	<i>Kelch-like-ECH-associated protein 1</i>
LC/MS	<i>Liquid chromatography/mass spectrometry</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LOX	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
2-ME	2- Mercaptoethanol
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
MER	<i>mutated-estrogen receptor</i>
mGPx4	mitochondriale GPx4
MS	Massenspektrometrie
NEM	N-Ethylmaleimid
nGPx4	nukleäre GPx4
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDI	Proteindisulfidisomerase
PGE2	Prostaglandin E2
PHGPx	Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase
Prx	Peroxiredoxin
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
RIP	<i>Receptor interacting protein kinase</i>
RNS	Ribonukleinsäure
roGFP	<i>Redox-sensitive green fluorescent protein</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpL20	ribosomales Protein L20
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SBP2	SECIS bindendes Protein
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Sec	Sec
SECIS-Element	<i>Sec insertion sequence element</i>
Ser	Serin
SF	Strep-Flag-Tag
SMCP	<i>Sperm mitochondrion-associated Cyse-rich protein</i>

TAP	<i>Tandem-Affinity-Purification</i>
TAPe	<i>Tandem-Affinity-Purification-enhanced</i>
tBid	trunkiertes BID
tBOOH	tert-Butylhydroperoxid
TBS-T	<i>Tris-buffered saline and tween 20</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGR	Thioredoxin/Glutathionreduktase
TNF	<i>Tumor-necrosis-factor</i>
TRAF3	<i>TNF-receptor-associated-factor 3</i>
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
Trx	Thioredoxin
Txnrd	Thioredoxin-Reduktase
WT	Wildtyp

6.2 Tabelle A	angereichert in			
Description	WT/ Stress: WT	WT:US	US Stress: US	csWT/Stress: csWT
Acly MGI Symbol ATP citrate lyase Gene				x
Actn1 MGI Symbol actinin, alpha 1			x	
Aifm1 MGI Symbol apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 1 Gene				x
Ankrd50 MGI Symbol ankyrin repeat domain 50	x		x	
Cct2 MGI Symbol chaperonin containing Tcp1, subunit 2 (beta)	x		x	
Cct3 MGI Symbol chaperonin containing Tcp1, subunit 3 (gamma)			x	x
Cct4 MGI Symbol chaperonin containing Tcp1, subunit 4 (delta)	xx		x	
Cct5 MGI Symbol chaperonin containing Tcp1, subunit 5 (epsilon)	x		x	
Cct6a MGI Symbol chaperonin containing Tcp1, subunit 6a (zeta)	x		x	
Cct7 MGI Symbol chaperonin containing Tcp1, subunit 7 (eta)			x	
Cct8 MGI Symbol chaperonin containing Tcp1, subunit 8 (theta) Gene	x			x
Cpne3 MGI Symbol copine III			x	
Cryz1 MGI Symbol crystallin, zeta (quinone reductase)-like 1	x		x	
Ddb1 MGI Symbol damage specific DNA binding protein 1			x	x
Dhps MGI Symbol deoxyhypusine synthase			x	
Dhx15 MGI Symbol DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 15	x		x	
Dnpep MGI Symbol aspartyl aminopeptidase Gene			x	
Eif5a MGI Symbol eukaryotic translation initiation factor 5A			x	

Faf1 MGI Symbol Fas-associated factor 1			x	
Flna MGI Symbol filamin, alpha	x			
Flncl MGI Symbol filamin C, gamma	x		x	
Got1 MGI Symbol glutamate oxaloacetate transaminase 1, soluble			x	
Gsr MGI Symbol glutathione reductase	x		x	
Hdlbp MGI Symbol high density lipoprotein (HDL) binding protein Gene				x
Hist1h4j MGI Symbol histone cluster 1, H4j		x		
Hsp90ab1 MGI Symbol heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1 Gene			x	
Hspa4 MGI Symbol heat shock protein 4			x	
Hspa5 MGI Symbol heat shock protein 5	x			
Hsph1 MGI Symbol heat shock 105kDa/110kDa protein 1	x			
Nudcd1 MGI Symbol NudC domain containing 1 Gene			x	
Pcna MGI Symbol proliferating cell nuclear antigen Gene				x
Prmt1 MGI Symbol protein arginine N-methyltransferase 1	xx		x	
Rab18 MGI Symbol RAB18, member RAS oncogene family Gene				x
Rnh1 MGI Symbol ribonuclease/angiogenin inhibitor 1			x	
Rps27a-ps2 MGI Symbol ribosomal protein S27A, pseudogene 2	x			
S100a11 MGI Symbol S100 calcium binding protein A11 (calgizzarin)			x	
Spag7 MGI Symbol sperm associated antigen 7	x		x	
Tcp1 MGI Symbol t-complex protein 1	x		x	
Tpi1 MGI Symbol triosephosphate isomerase 1	x		x	
Tpm3 MGI Symbol tropomyosin 3, gamma			x	

Tpm4 MGI Symbol tropomyosin 4			x	
Tpt1 MGI Symbol tumor protein, translationally-controlled 1			x	
Tuba1b MGI Symbol tubulin, alpha 1B	x			
Tubb5 MGI Symbol tubulin, beta 5 class I	x			
Txn1 MGI Symbol thioredoxin-like 1			x	
Txnrd1 MGI Symbol thioredoxin reductase 1			x	
Uba1 MGI Symbol ubiquitin-like modifier activating enzyme 1	x		x	
Ubr7 MGI Symbol ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 7 (putative)			x	
Usp47 MGI Symbol ubiquitin specific peptidase 47	x		x	
Ywhae MGI Symbol tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide	x		x	

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. <i>GPx4</i> -Gen und Protein.	6
Abb. 2 Katalytischer Zyklus der <i>GPx4</i>	11
Abb. 3 Tamoxifen-induzierbare <i>GPx4</i> -Deletion.	22
Abb. 4 AIF vermittelter Zelltod durch LOX-Aktivierung.	24
Abb. 5 <i>GPx4</i> beeinflusst die Signaltransduktion von RTKs.	25
Abb. 6. Prinzip des SF-TAP-Verfahrens.	45-46
Abb. 7 Waschschritte und Eluat von <i>GPx4</i> WT (A und B) exprimierenden und PFa1 mock Zellen (C) nach der TAP.	48
Abb. 8. Aufreinigung von an <i>GPx4</i> assoziierten Proteine unter physiologischen Bedingungen und unter oxidativem Stress.	50
Abb. 9. Silberfärbung einer Einfachaufreinigung der all cys/ser WT Mutante unter Zugabe von DTT.	54
Abb. 10. Relativer Vergleich unter verschiedenen Bedingungen isolierter, möglicher <i>GPx4</i> -Bindepartner mittels Volcano Plot. (A-E).	56-58
Abb.11. Immunoblot gegen die <i>GPx4</i> .	59
Abb. 12 co-Immunpräzipitation von Prx1-6.	61
Abb. 13. Immunoblot gegen Moleküle des apoptotischen und nicht-apoptotischen Zelltods.	64
Tabelle 1 Verteilung und Intensität der isolierten Proteinbanden bei den verschiedenen Mutanten	52
Tabelle 2 Semiquantitative Bewertung der Prx co-Immunpräzipitationen.	63

7 Zusammenfassung

GPx4 besitzt vielfältige Funktionen im Redox-Metabolismus von Zellen. Ursprünglich wurde sie als ein Enzym beschrieben, das hoch effizient Phospholipidhydroperoxide zu den entsprechenden Alkoholen unter GSH-Verbrauch reduzieren kann. Weiterhin hatte sich in den letzten 10 bis 15 Jahren gezeigt, dass sie eine essenzielle Rolle als Thiolperoxidase in der Spermienreifung ausübt. Eine weitere Funktion stellt möglicherweise die eines Redox-Sensors dar, der auf die Änderung des zellulären Redox-Milieus mit der Aktivierung von antioxidativen Zellsignalwegen reagiert. Diese Funktion konnte bislang nur für das GPx4-Homolog in der Hefe nachgewiesen werden und kann aufgrund der Rolle, die die GPx4 bei der Spermienreifung in Mäusen spielt, auch für Säugetiere postuliert werden. Es handelt sich dabei um die Fähigkeit der GPx4 in ihrer Funktion als Thiolperoxidase Disulfid- oder auch Selenylsulfidbindungen zwischen anderen Proteinen zu bilden. Dabei ist die GPx4 vermutlich auch in der Lage, ihre eigenen Cysteine als Substrat zu akzeptieren, was allerdings im Falle der Spermienreifung zu einer Inaktivierung der peroxidativen Funktion führt. Diese Thiolperoxidasefunktion ist abhängig von der Menge an freiem GSH.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit war es, mögliche Interaktionspartner in somatischen Zellen zu identifizieren, wobei die Thiolperoxidasefunktion der GPx4 bei Änderung des zellulären Redox-Milieus in Form von oxidativem Stress ausgenutzt werden sollte.

Als Methode wählten wir ein modifiziertes *Tandem-Affinity-Purification-enhanced*-Verfahren (TAPe). Mit Hilfe dessen wurde eine mit einem Strep/Flag-Tag versehene GPx4 oder verschiedene Mutanten stabil in induzierbaren *GPx4* Knockout murinen embryonalen Fibroblasten exprimiert, sodass die getaggte GPx4 mittels des TAPe Verfahren aus den Zellen aufgereinigt werden konnte. Um intrazelluläre GSH-Konzentrationen zu reduzieren und die GPx4 zu oxidieren, wurden die Zellen vor der Lyse mit BSO und tBOOH vorbehandelt. Die Eluate aus diesen Aufreinigungen wurden anschließend anhand der Massenspektrometrie, Silberfärbung und Western Blots analysiert.

Es ließen sich eine ganze Reihe von Proteinen identifizieren, die ebenfalls eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des intrazellulären Redox-Milieus spielen und an der Regulierung von Zellsignalwegen beteiligt sind. Nach den bisherigen Analysen bedarf es aber noch einer Bestätigung mittels co-Immunpräzipitation und Immunoblot-

Analysen. Besonders aktuelle Erkenntnisse, die neue Zelltodsignalwege, wie zum Beispiel die Ferroptose, analysieren, stellen eine interessante und äußerst relevante Richtung für zukünftige Projekte in der Erforschung der GPx4 und ihrer Rolle als Redox-Sensor und Regulator von Zelltodsignalwegen dar.

8 Danksagung

“It always seems impossible until it’s done.” - Nelson Mandela

Die Entstehung dieser Arbeit wäre nie möglich gewesen ohne die Unterstützung einer Vielzahl von Menschen, denen ich hiermit von ganzem Herzen danken möchte.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer und Gruppenleiter Dr. Marcus Conrad bedanken für seine zuverlässige Hilfe und Motivation über all die Jahre hinweg. Ich bin unendlich dankbar für die Motivation, die er mir kontinuierlich, wann immer ich sie brauchte, gab und, dass er mir zu wirklich jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Aus meinem Bekanntenkreis weiß ich, dass das nicht selbstverständlich bei medizinischen Doktorarbeiten ist. Daher bin ich übergelukkig in ihm ein leider seltenes positives Beispiel eines Betreuers getroffen zu haben.

Mein herzlicher Dank gilt auch meinem Doktorvater Prof. Hoffmann für seine Unterstützung und Hilfe.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Stefanie Hauck von Proteomics bedanken für die Analyse der Proben durch die Massenspektrometrie und ihre Hilfe bei den Auswertungen.

Von ganzem Herzen gilt mein Dank meinen Kolleginnen aus dem Labor Heidi Förster und Olena Yefremova, auf deren professionelle und emotionale Unterstützung ich mich immer verlassen konnte und ohne deren Hilfe diese Arbeit unmöglich gewesen wäre. Ich habe unglaublich viel von ihrem Können und ihren Erfahrungen lernen und profitieren dürfen, und sie haben dabei nie die Geduld mit mir verloren. Dank ihnen ist der Spaß an der Arbeit nie verloren gegangen, und ich habe zwei sehr gute Freundinnen dazu gewonnen.

Weiterhin danke ich Tobias Seibt, der mir während meiner Zeit im Labor immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ich danke meinen Freunden aus meiner Lerngruppe- Vincent, Franzi, Sophia, Caro und Martin für eine wundervolle Examenszeit. Durch sie ist das Lernen so viel einfacher geworden und hat sogar Spaß gemacht.

Besonderer Dank gilt auch meinen Freundinnen Eileen und Doro für die jahrelange bedingungslose Freundschaft und wundervolle Urlaube. Ich konnte mich auf ihren Rückhalt und ihre Unterstützung in jeder Lebenslage verlassen und weiß, dass so eine Freundschaft ein lebenslang hält.

Ich danke von ganzem Herzen Simon für seine Hilfe und Unterstützung.

An letzter Stelle möchte ich mich bei meinen Eltern für die Arbeit bedanken, die sie für mich und mit mir mein ganzes Leben lang geleistet haben. Ich kann immer auf ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht zählen. Sie haben nie an meinen Entscheidungen gezweifelt oder dem Weg, den ich gegangen bin und das ist von unschätzbarem Wert für mich. Danke, dass ihr bei mir seid seid.

9 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Nadine Grünler, erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Untersuchungen zur Rolle der Glutathion-Peroxidase 4 als möglicher Redox-Sensor in
Säugetierzellen

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

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

München, 08. Mai 2015

Nadine Grünler