

Aus der  
Abteilung für Vergleichende Medizin  
(Leiter: Prof. Dr. J. Schmidt)  
des GSF – Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg

Vorgelegt über den  
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie  
am Institut für Tierpathologie  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl)

**Untersuchungen zur Funktion der  
Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase  
anhand eines Knock-out-Mausmodells**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Manuela Schneider  
aus  
Bayreuth

München, 2006

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer  
Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl  
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. B. Aigner

Tag der Promotion: 10. Februar 2006

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Selen und Selenoproteine	1
1.2 Biosynthese von Selenoproteinen	6
1.3 Knock-out-Mausmodelle zur Untersuchung von Selenoproteinen	8
1.4 Embryonalentwicklung der Maus	14
1.5 Fragestellung	19
<b>2. Material</b>	<b>20</b>
2.1 Allgemeine Chemikalien	20
2.2 Verwendete Kits	20
2.3 Enzyme	21
2.4 Material für die Histologie/Immunhistochemie/In-Situ-Hybridisierung	21
2.5 Radioaktive Isotope	22
2.6 Antikörper für die Immunhistochemie/In-Situ-Hybridisierung	22
2.7 Plasmide für die In-Situ-Hybridisierung	22
2.8 Verwendete Desoxy-Oligonukleotide	23
<b>3. Methoden</b>	<b>24</b>
3.1 Zucht der Mausstämme	24
3.1.1 Tierhaltung und Hygienestatus	24
3.1.2 Verwendete Mausstämme	25
3.2 Genotypisierung der Mausstämme	28
3.3 Präparation der Embryonen	30
3.4 Histologie	31
3.4.1 Anfertigen von Paraffinschnitten	31
3.4.2 Hämatoxylin/Eosin-Färbung	32
3.5 Immunhistochemie	32
3.6 In-Situ-Hybridisierung	33
3.6.1 Herstellung der RNA-Sonden	34
3.6.2 <i>whole mount</i> In-Situ-Hybridisierung	35
3.6.3 Radioaktive In-Situ-Hybridisierung	37

3.7 Semiquantitative RT-PCR	39
3.8 Sonstige Methoden	41
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>42</b>
4.1 Etablierung von PHGPx Knock-out-Mäusen	42
4.2 Phänotyp der PHGPx Knock-out-Embryonen	46
4.3 Histologische Analysen der PHGPx Knock-out-Embryonen	47
4.4 Immunhistochemische Analyse der PHGPx Knock-out-Embryonen	55
4.5 Untersuchung der Expression früher Neurulationsmarker	57
4.6 Zucht und Analyse endothelspezifischer PHGPx Knock-out-Mäuse	59
4.7 Embryonales Expressionsmuster der PHGPx	62
4.8 Semiquantitative RT-PCR-Analyse	67
<b>5. Diskussion</b>	<b>69</b>
5.1 Phänotypisierung von PHGPx-defizienten Mäusen	69
5.2 Embryonales Expressionsmuster der PHGPx	76
<b>Zusammenfassung</b>	<b>79</b>
<b>Summary</b>	<b>81</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>82</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>97</b>
<b>Publikationen</b>	<b>98</b>
<b>Danksagungen</b>	<b>99</b>

# **1. Einleitung**

## **1.1 Selen und Selenoproteine**

Obwohl das Element Selen bereits 1817 von Jons Jacob Berzelius entdeckt wurde, konnte erst 1957 seine Bedeutung als essenzielles Spurenelement und damit als unverzichtbarer Bestandteil der Nahrung von Säugetieren nachgewiesen werden. Lange Zeit war nur die toxische Wirkung auf den tierischen Organismus bekannt. Selenvergiftungen verursachten in Gegenden mit selenreichen Böden erhebliche Verluste in der Nutztierhaltung (Dürre und Andreesen, 1986). Bereits eine tägliche Aufnahme von 0,8 mg Selen führt auch beim Menschen zu chronischen Vergiftungserscheinungen (Yang et al., 1989). Der Wirkmechanismus dieser Selen-Toxizität ist nicht genau bekannt, könnte aber mit der chemischen Ähnlichkeit von Selen zu Schwefel und damit mit einer ungewollten Inkorporation von Selenocystein (Sec) anstelle von Schwefel in Proteinen des Zellstoffwechsels in Zusammenhang stehen (Ganther, 1999).

Die essenzielle Bedeutung von Selen für den menschlichen und tierischen Organismus zeigten Arbeiten von Schwarz und Folz (Schwarz, 1957), indem sie bei Ratten, die mit einer selenarmen Diät ernährt wurden, eine tödlich verlaufende Lebernekrose induzieren konnten. Nur der Zusatz von Selen in Form von Selenit oder Selenocystin konnte die Ausbildung dieser Leberschäden verhindern. Selenmangelernährung führt in Abhängigkeit der Tierart zu unterschiedlichsten Funktionsstörungen. Hierbei ist zu erwähnen, dass auch synergistische Effekte zwischen Selen und anderen Spurenelementen und Vitaminen, insbesondere der antioxidativen Vitamine E und C eine wesentliche Rolle spielen. Im Allgemeinen können bei tierexperimentell erzeugtem Selenmangel folgende Schädigungen auftreten: Leber- und Pankreasnekrosen, Degeneration der Skelett- und Herzmuskulatur, Schädigung der Herzkranzgefäße und Störung der Spermatogenese. In der Veterinärmedizin sind einige Krankheiten bekannt, bei denen ein Selenmangel, meist in Kombination mit Vitamin E-Mangel, als ursächlich gilt. Eine anhaltende Selen-Unterversorgung (< 10 µg/kg Futter-Trockensubstanz) führt in der Nutztieraufzucht, insbesondere bei Ferkeln und Kälbern, zu einer Wachstumsdepression, die durch Selen-Zugabe aufgehoben werden kann. Bei Nutzgeflügel führt eine chronische Selenunterversorgung zu fibrotischen

Veränderungen des Pankreas und somit zu Symptomen einer Bauchspeicheldrüseninsuffizienz. Bei Kalb und Ferkel führt ein kombinierter Vitamin E/Selen-Mangel zu einer Muskeldystrophie, die als Weißfleischigkeit (*white muscle disease*) bekannt ist; bei Ferkeln entstehen zusätzlich Veränderungen in den Arteriolen und Kapillaren des Herzens, die sich in der so genannten Maulbeerherzkrankheit äußern. Bei Hühnerküken wurden exsudative Diathese, ausgelöst durch Kapillarschäden, und Enzephalomalazie beschrieben. Weiterhin ist bekannt, dass ein kombinierter Vitamin E/Selen/Cystein-Mangel bei Schweinen zu einer toxischen Lebernekrose/-dystrophie führt. In der Humanmedizin konnte bisher nur eine Krankheit kausal auf Selenmangel zurückgeführt werden. Die „Keshan-Krankheit“, eine tödlich verlaufende Kardiomyopathie, die hauptsächlich bei Kindern auftrat, war in einigen Regionen Ostchinas, in denen die Böden extrem selenarm sind, endemisch. Coxsackie-Viren, die schon lange als Ursache von Kardiomyopathien bekannt sind, werden unter Selenmangelbedingungen virulent und führen so zu den für die Keshan-Krankheit typischen multifokalen Nekrosen und Fibrosen des Myokards (Beck et al., 2003; Sung, 1980). Durch eine vorbeugende Supplementierung der Nahrung mit Selenit konnte das Auftreten dieser Krankheit erheblich reduziert werden (Yang et al., 1989). Ein Zusammenhang zwischen Selenmangel und einer in der Inneren Mongolei endemischen Form von Osteoarthritis, der so genannten „Kashin-Beck-Krankheit“, konnte ebenfalls festgestellt werden. Diese Krankheit bewirkt schwerwiegende Wachstumsstörungen bei Kindern und wird vermutlich durch die niedrige Umgebungstemperatur in diesen Gegenden und eine chronische Unterversorgung der Bevölkerung mit Phosphatidylcholin begünstigt (Li et al., 1990).

Einen ersten Hinweis auf die biologische Funktion des Selens erhielt man durch Experimente, anhand derer gezeigt wurde, dass die Synthese der bakteriellen Formiat-Dehydrogenase unter anderem von der Anwesenheit von Selenit abhängt (Pinsent, 1954). Erst 20 Jahre später konnten mehrere Arbeitsgruppen Selen als integralen Bestandteil der bakteriellen Glycin-Reduktase (Turner und Stadtman, 1973) und Formiat-Dehydrogenase (Andreesen und Ljungdahl, 1973) sowie der Säugetier-Glutathion-Peroxidase nachweisen, welche für lange Zeit das einzige Selenoprotein bei Säugetieren mit bekannter Funktion war (Flohe et al., 1973; Rotruck et al., 1973). Letztere katalysiert den Abbau von Peroxiden und ist dadurch ein wichtiger Bestandteil des antioxidativen Schutzsystems bei Säugetieren. In

weiterführenden Untersuchungen des bakteriellen Selenoenzyms Glycin-Reduktase konnte 1976 erstmals gezeigt werden, dass Selen in Form von Selenocystein (Sec) in Proteine eingebaut ist (Cone et al., 1976).

Bei Säugetieren wird die Anzahl der im Körper vorkommenden Sec-enthaltenden Proteine nach [<sup>75</sup>Se]-Markierungen auf 30 bis 50 geschätzt (Behne et al., 1996), allerdings konnte bisweilen nur für einen Bruchteil davon die biologische Funktion ermittelt werden (siehe Tab. 1). Mittels Sequenzanalysen konnten die Gene für 24 Selenoproteine im Mausgenom und für 25 im humanen Genom identifiziert werden (Kryukov et al., 2003). Hinsichtlich ihrer biologischen Funktion werden Selenoproteine vor allem in Zusammenhang mit Redoxprozessen gebracht. Sec ist aufgrund seiner leichten Ionisierbarkeit bei physiologischem pH-Wert Teil des reaktiven Zentrums von Selenoproteinen und in den meisten Fällen hängt die biologische Funktion der Selenoproteine von der Existenz des Sec-Restes im aktiven Zentrum ab. Dies konnte in gezielten Mutagenese-Experimenten durch den Austausch von Sec durch Cystein oder andere Aminosäuren gezeigt werden (Maiorino et al., 1995; Zhong et al., 2000).

Einige der bisher bei Säugetieren charakterisierten Selenoproteine können der Glutathion-Peroxidase-, der Thioredoxin-Reduktase- oder der Dejodinase-Familie zugeordnet werden. Die Mitglieder der Glutathion-Peroxidase-Familie spielen in der Abwehr von reaktiven Sauerstoffspezies eine Rolle, übernehmen teilweise aber auch Funktionen im Entzündungsgeschehen und in der Spermatogenese. Die Hauptfunktion der Thioredoxin-Reduktasen ist die Bereitstellung von reduziertem Thioredoxin, welches bei einer Vielzahl von zellulären Prozessen involviert ist. Die Dejodinasen sind für die Aktivierung bzw. Inaktivierung des Schilddrüsenhormons Thyroxin bzw. Trijodthyronin verantwortlich.

**Tabelle 1: Übersicht von Selenoproteinen bei Säugetieren und ihre möglichen Funktionen**

(modifiziert nach (Schweizer et al., 2004))

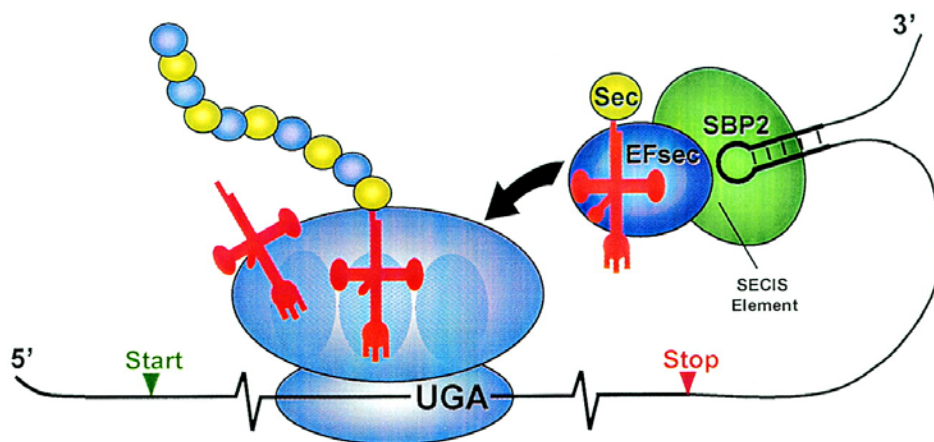
<b>Selenoprotein</b>	<b>Gewebeexpression/ zelluläre Lokalisation</b>	<b>Funktion</b>	<b>Literatur</b>
Zytosolische oder klassische Glutathion-Peroxidase (GPx1)	ubiquitär	Detoxifikation von Wasserstoffperoxid und Alkylhydroperoxiden	(Flohe et al., 1973; Lindenau et al., 1998; Rotruck et al., 1973)
Gastronintestinale Glutathion-Peroxidase (GPx2)	im Gastrointestinaltrakt	Funktion wie GPx1	(Chu et al., 1993)
Plasma-Glutathion-Peroxidase (GPx3)	im Plasma und in der Niere	Funktion wie GPx1	(Takahashi et al., 1987)
Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase (GPx4, PHGPx)	ubiquitär; 3 Formen: zytosolisch, mitochondrial, spermienkernspezifisch	Detoxifikation von (Phospho-) Lipidhydroperoxiden Funktionen in der Spermatogenese	(Borchert et al., 2003) (Pfeifer et al., 2001)
Humane Glutathion-Peroxidase 6 (GPx6)	im olfaktorischen Epithel und in der Bowman'sche Drüse	mögliche Funktion als Antioxidans	(Kryukov et al., 2002)
Thioredoxin-Reduktase 1 (Txnrd1, TrxR1)	ubiquitär, vorwiegend im Zytosol	intrazelluläres Redoxenzym	(Sun et al., 1999; Tamura und Stadtman, 1996; Zhong und Holmgren, 2000)
Thioredoxin-Reduktase 2 (Txnrd2, TrxR2)	ubiquitär, in den Mitochondrien	mitochondriales Redoxenzym	(Gasdaska et al., 1999; Lee et al., 1999; Miranda-Vizuete et al., 1999; Watabe et al., 1999)
Thioredoxin-Reduktase 3 (Txnrd3, TrxR3)	vorwiegend im Hodengewebe	Thioredoxin-GSH-Reduktase-Aktivität	(Watabe et al., 1999)
Thyroidhormon Dejodinase 1 (Dio1)	hauptsächlich in der Schilddrüse, der Leber, der Niere und der Hypophyse	Deiodination (Aktivierung) von T4 zu T3	(Arthur et al., 1990; Bates et al., 1999; Behne et al., 1990)
Thyroidhormon Dejodinase 2 (Dio2)	im Gehirn, im braunem Fettgewebe, in der Hypophyse und der Plazenta	lokale Deiodination von T4 zu T3	(Bates et al., 1999; Croteau et al., 1996; Davey et al., 1995; Salvatore et al., 1996)
Thyroidhormon Dejodinase 3 (Dio3)	in der Plazenta und der Haut	Inaktivierung von aktivem T3 zu T2	(Bates et al., 1999; Croteau et al., 1996)



<b>Selenoprotein</b>	<b>Gewebeexpression/ zelluläre Lokalisation</b>	<b>Funktion</b>	<b>Literatur</b>
Selenophosphat-Synthetase 2 (Sephs2)	hauptsächlich in der Leber und im Hodengewebe	katalysiert die Synthese von Selenophosphat aus Selenit und AMP	(Guimaraes et al., 1996)
15-kDa Selenoprotein (Sep15)	hauptsächlich im Gehirn	noch unbekannt	(Gladyshev et al., 1998; Kalcklosch et al., 1995)
18-kDa Selenoprotein (Sel18)	in verschiedenen Geweben	noch unbekannt	(Kyriakopoulos und Behne, 2002)
Selenoprotein M (Sepm, SelM)	in verschiedenen Geweben	noch unbekannt	(Korotkov et al., 2002)
Selenoprotein N (Sepn1, SelN)	in der Skelettmuskulatur und der Leber, im Gehirn, im Herzen und im Magen	weitgehend unbekannt; wird mit kongenitaler muskulärer Dystrophie in Zusammenhang gebracht	(Ferreiro et al., 2002; Lescure et al., 2002; Petit et al., 2003)
Selenoprotein P (Sepp1, SelP)	im Plasma und in der Leber	Selentransport antioxidative Eigenschaften	(Hill et al., 1991; Motsenbocker und Tappel, 1982)
Selenoprotein R (Sepx1, SelR, SelX)	in verschiedenen Geweben Untereinheit der R-Methionin-Sulfoxid-Reduktase	reduziert Methioninreste in Proteinen	(Kryukov et al., 2002)
Selenoprotein W (Sepw1, SelW)	hauptsächlich im Gehirn, in der Milz, im Hodengewebe, in der Skelettmuskulatur, und der Herzmuskulatur	mögliche Funktion als Antioxidans, bindet Glutathion	(Vendeland et al., 1993; Watabe et al., 1999)
Selenoprotein H	in verschiedenen Geweben	noch unbekannt	(Kryukov et al., 2003)
Selenoprotein O	in verschiedenen Geweben	noch unbekannt	(Kryukov et al., 2003)
Selenoprotein I	in verschiedenen Geweben	noch unbekannt	(Kryukov et al., 2003)
Selenoprotein K	in verschiedenen Geweben	noch unbekannt	(Kryukov et al., 2003)
Selenoprotein S	in verschiedenen Geweben	noch unbekannt	(Kryukov et al., 2003)
Selenoprotein V	nur im Hodengewebe	noch unbekannt	(Kryukov et al., 2003)

## 1.2 Biosynthese von Selenoproteinen

Nukleotidsequenzanalysen ergaben, dass das Basentriplett UGA, welches lange Zeit nur als Stopkodon bekannt war, sowohl bei bakteriellen als auch bei eukaryontischen Genen als Kodon für die 21. Aminosäure Selenocystein (Sec) fungiert (Chambers et al., 1986; Zinoni et al., 1986). Der Mechanismus der kotranslationalen Inkorporation von Sec konnte zunächst bei der bakteriellen Formiat-Dehydrogenase aufgeklärt werden (Bock et al., 1991a; Bock et al., 1991b). Damit während der Translation UGA nicht als Stopkodon, sondern als Kodon für Sec erkannt wird, bedarf es bei Prokaryonten vier spezifischer Genprodukte (SelA, SelB, SelC, SelD). Berry und Kollegen zeigten anschließend, dass dieser konservierte Selenocystein-Insertionsmechanismus auch in Eukaryonten vorhanden ist (Low und Berry, 1996). Für den kotranslationalen Sec-Einbau am UGA-Kodon sind mehrere Faktoren erforderlich, inklusive einer speziellen haarnadelähnlichen RNA-Sekundärstruktur, des so genannten SECIS (Sec-Insertions-Sequenz)-Elements, das bei Prokaryonten direkt hinter dem UGA-Kodon und bei Eukaryonten immer im 3'-untranslatierten Bereich der mRNA zu finden ist (Abb.1, (Hatfield und Gladyshev, 2002)). Neben dem SECIS-Element werden auch bei Eukaryonten weitere Faktoren benötigt. Das SECIS-bindende Protein (SBP2) (Hubert et al., 1996; Low et al., 2000) bindet an das SECIS-Element und dirigiert es bei gleichzeitiger Interaktion mit dem Sec-spezifischen Translationsfaktor EF-Sec an die Ribosomen (Fagegaltier et al., 2000; Tujebajeva et al., 2000).



**Abbildung 1: Sec-Insertionsmechanismus bei Eukaryonten**

(modifiziert nach (Hatfield und Gladyshev, 2002))

EF-Sec bindet anschließend an die Sec-spezifische tRNA (tRNA<sup>ser[sec]</sup>) (Lee et al., 1989), die initial mit Serin beladen ist, welches durch die Selenocystein-Synthase zu Sec konvertiert und in die Polypeptidkette eingebaut wird.

Dieser besondere Aminosäure-Insertionsmechanismus des Sec stellt einen von Prokaryonten bis zu Säugetieren hoch konservierten Mechanismus dar, der sich allerdings als relativ aufwendig und im Vergleich zum herkömmlichen Einbau anderer Aminosäuren als sehr ineffizient darstellt. Die Effizienz des Sec-Insertionsmechanismus liegt, verglichen mit dem Einbau von Cystein, je nach SECIS-Element etwa bei 1-7% (Suppmann et al., 1999).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist das Vorhandensein einer gewissen Hierarchie innerhalb der einzelnen Selenoproteine bezüglich ihrer Expression, was vor allem durch Tierexperimente gezeigt wurde (Burk und Hill, 1993). Unter Selen-Depletion beobachtet man eine Umverteilung des im Körper vorhandenen Selens. Je nach Gewebe findet eine unterschiedliche Reduktion der Expression und der enzymatischen Aktivität verschiedener Selenoproteine statt, wobei Selenoproteine, die hoch in der Hierarchie stehen, möglichst lange in den entsprechenden Geweben exprimiert werden. Bei Selen-Supplementation werden umgekehrt diese potenziell wichtigen Selenoproteine bevorzugt synthetisiert. Eine wesentliche Rolle des SECIS-Elements bei der Regulation der Translation von Selenoproteinen in Abhängigkeit von der Selenverfügbarkeit wird diskutiert (Muller et al., 2003). Diese Hierarchieordnung lässt vermuten, dass diejenigen Selenoproteine, die hoch in der Hierarchie stehen, für den Organismus eine wichtigere Funktion übernehmen als diejenigen, die niedriger stehen. Erste bestätigende Hinweise hierzu erhielt man inzwischen von Knock-out-Mausmodellen einzelner Selenoproteine.

### **1.3 Knock-out-Mausmodelle zur Untersuchung von Selenoproteinen**

#### Knock-out-Mausmodelle zur Untersuchung der tRNA<sup>ser[sec]</sup>

Bösl und Mitarbeiter (Bosl et al., 1997) gelang es, das Gen Trsp, welches für die tRNA<sup>[ser]sec</sup> kodiert und somit für die Biosynthese von Selenoproteinen essenziell ist, gezielt in Mäusen zu inaktivieren. Hemizygoter Trsp-Knock-out-Mäuse sind lebensfähig und fertil, und zeigen keine offensichtlichen Auffälligkeiten in der Physiologie und im Verhalten. Zwar konnte eine Reduktion des tRNA<sup>[ser]sec</sup>-Levels auf 50-80% im Vergleich zu Wildtyp-Tieren beobachtet werden, allerdings hatte dies, gemessen an der zytosolischen Glutathion-Peroxidase, keine Auswirkung auf die mRNA-Levels und die Enzymaktivität. Homozygoter Trsp-Knock-out-Mäuse dagegen sind embryonal letal im frühen Postimplantationsstadium (um Tag 6,5). Durch die *in vitro*-Kultivierung von homozygoten Trsp-Knock-out-Blastozysten zeigte sich, dass sowohl das Trophektoderm, als auch die so genannte Innere Zellmasse zunächst normal proliferieren, was darauf hinweist, dass die fehlende Funktion des Trsp-Gens erst dann zum Tragen kommt, wenn die Zellteilungsrate des Embryos stark zunimmt. Mittels konditionalem Knock-out in Mäusen gelang es, das Trsp-Gen spezifisch im Epithel der Brustdrüse (Kumaraswamy et al., 2003) und spezifisch in der Leber (Carlson et al., 2004) zu deletieren. Mäuse, denen das Gen Trsp spezifisch im Brustdrüsenepithel fehlte, zeigten eine normal verlaufende Entwicklung der Brustdrüse und eine unveränderte Funktion während der Laktation, wobei die Proteinlevels der Glutathion-Peroxidasen 1 und 4, sowie des Selenoproteins 15 in diesem Gewebe reduziert waren.

Homozygoter leberspezifischer Trsp-Knock-out-Mäuse sterben im Alter von 1 bis 3 Monaten aufgrund einer schwerwiegenden hepatozellulären Degeneration und Nekrose, begleitet von einer peritonealen und retroperitonealen Fettgewebsnekrose. Der Selengehalt in der Leber zeigte sich als massiv reduziert, und eine Selenoprotein-Expression konnte nicht mehr nachgewiesen werden. Zusätzlich war die Konzentration von Selenoprotein P (Sepp1) im Plasma um etwa 75% reduziert, was dafür spricht, dass Sepp1 hauptsächlich in der Leber synthetisiert und von dort in andere Gewebe transportiert wird. Außerdem wurde bei diesen Mäusen eine Erhöhung der Enzymaktivität der Glutathion-S-Transferase in der Leber festgestellt, was einen wichtigen Hinweis auf einen möglichen kompensatorischen Mechanismus bei fehlender Funktion der Selenoproteine in der Leber lieferte.

### Selenoprotein P (Sepp1)-Knock-out-Modell

Die physiologische Funktion von Selenoprotein P ist nach wie vor kontrovers und noch nicht endgültig geklärt. Sepp1 wird in der Leber gebildet, dort sezerniert und kann nahezu in allen Geweben nachgewiesen werden. Es stellt etwa 60 % des Plasma-Selengehalts bei Ratten und enthält bis zu zehn Selenocysteine, weswegen Sepp1 die Rolle eines Transport- und/oder Speicherproteins zu geschrieben wird. Sepp1-Knock-out Mäuse wurden von zwei unabhängigen Gruppen (Hill et al., 2003; Schomburg et al., 2003) publiziert. Homozygote Sepp1-Knock-out-Mäuse sind lebensfähig, weisen aber ab der dritten Lebenswoche ein deutliches Wachstumsdefizit im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern auf und zeigen Ataxien und Gleichgewichtsstörungen. Die Sepp1-Knock-out-Mäuse wurden gründlich auf mögliche Veränderungen im Selengehalt und im Expressionsmuster einzelner Selenoproteine in unterschiedlichen Geweben und im Plasma untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Selengehalt in Plasma, Niere, Gehirn und Hoden in Knock-out-Tieren reduziert, in der Leber aber erhöht war. Eine Reduktion von Enzymaktivitäten entsprechend der Hierarchie der einzelnen Selenoproteine konnte ebenfalls beobachtet werden. Diese Umverteilung zeigte sich auch in den von Hill und Mitarbeitern durchgeführten Fütterungsversuchen (Hill et al., 2003), wobei homozygote Sepp1-Knock-out-Tiere und Kontrolltiere spezielle Diäten unterschiedlichen Selengehalts erhielten. Zusätzlich konnten sie eine geringfügig verringerte Fertilität bei Männchen beobachten.

### Knock-out-Mausmodell zur Untersuchung der zellulären Glutathion-Peroxidase

Die zelluläre Glutathion-Peroxidase (GPx1) wurde 1957 erstmals beschrieben als ein Enzym, das Erythrozyten vor oxidativer Hämolyse schützt (Mills, 1957). Erst Jahre später wurde ihre Selenabhängigkeit gezeigt (Flohe et al., 1973; Rotruck et al., 1973) und sie blieb lange Zeit das einzige Selenoprotein mit bekannter biologischer Funktion bei Säugetieren. GPx1 ist ubiquitär exprimiert und das Selenoprotein, das in der Hierarchie am niedrigsten steht. Unter Selenmangel wird die Expression der GPx1 als Erstes herunterreguliert und umgekehrt unter selenadäquaten Bedingungen als Letztes hochreguliert, weswegen ihr auch eine Funktion als Selenpeicher zugesprochen wurde (Burk, 1991). Homozygote GPx1-Knock-out-Mäuse (Cheng et al., 1997) sind lebensfähig, besitzen eine normale

Lebenserwartung und haben keine klinischen oder patho-histologischen Auffälligkeiten. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine fehlende GPx1-Funktion sowohl unter selendepletierten als auch unter selenadäquaten Bedingungen keinen Einfluss auf die Expression der Glutathion-Peroxidasen 2, 3 und 4, sowie anderer antioxidativer Enzyme, hier insbesondere der selenunabhängigen Glutathion-S-Transferase hat. Einzig der totale Selengehalt der Leber war um 60% reduziert im Vergleich zu den Kontrolltieren. In folgenden Arbeiten von Cheng und Mitarbeitern (Cheng et al., 1999; Cheng et al., 1998a; Cheng et al., 1998b) konnte die antioxidative Funktion von GPx1 *in vivo* nach Induktion von oxidativen Stress infolge von Paraquat-Injektionen gezeigt werden. Insbesondere wurden mögliche Effekte bezüglich mit Selen adäquat bzw. defizient ernährten GPx1-Knock-out-Mäusen in Kombination mit unterschiedlichen Vitamin E-Konzentrationen herausgearbeitet.

#### Glutathion-Peroxidase 1 und 2 Doppel-Knock-out-Mausmodell

Die Glutathion-Peroxidase 2 (GPx2) ist hauptsächlich in Epithelien und hier vor allem im Epithel des Gastrointestinaltrakts (GIT) exprimiert. Da GPx2-Knock-out-Mäuse keinerlei klinische Auffälligkeiten zeigten und GPx1 ebenfalls hoch im GIT-Epithel exprimiert ist, wurden Doppel-Knock-out-Mäuse (GPx1 und GPx2) etabliert (Esworthy et al., 2001). Diese Tiere zeigten eine massive Wachstumsretardation, beginnend nach dem Absetzen, Kachexie, Diarrhö, perianale Ulzera und Hypothermie, sowie Symptome der „Inflammatory Bowel Disease“. Die entzündlichen Infiltrate waren auf die Mukosa von Ileum und Kolon beschränkt, die Schleimhäute von Magen und Jejunum waren nicht betroffen. Eine manifeste Kolitis war im Alter von 15 Tagen und eine Ileitis im Alter von 20 Tagen zu beobachten. Eine erhöhte Lipidperoxidation, sowie erhöhte Myeloperoxidaseaktivität konnten in der Mukosa des Kolons nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass GPx1 und 2 gemeinsam eine wichtige Rolle in der Redoxbalance des GITs übernehmen. Außerdem stellen beide Peroxidasen somit ein redundantes System in diesem Gewebe dar.

### Thioredoxin-Reduktase 1 und 2-Knock-out-Mäuse

Das Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase-System trägt ebenfalls zur Aufrechterhaltung des Redoxstatus der Zelle bei. Thioredoxine als Hauptsubstrate der Thioredoxin-Reduktasen sind bei verschiedensten Zellaktivitäten, wie beispielsweise Redoxmetabolismus, Proliferation oder Apoptoseregulation beteiligt. Die Thioredoxin-Reduktase 1 (Txnrd1) ist hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert, die Thioredoxin-Reduktase 2 (Txnrd2) dagegen in den Mitochondrien. Um die Funktion der Thioredoxin-Reduktase 1 untersuchen zu können, wurden konditionale Txnrd1-Knock-out-Mäuse etabliert (Jakupoglu et al., 2005). Homozygote Txnrd1-Knock-out-Mäuse sterben etwa am Tag 9,5 der Embryonalentwicklung und sind stark entwicklungsretardiert. Txnrd1-defiziente Embryonen zeigten hochgradige Störungen in der Organogenese und erreichten höchstens ein mit Embryonaltag 8,5 normal entwickelter Mausembryonen vergleichbares Entwicklungsstadium. Die für Nagerembryonen typische embryonale Drehung wurde nicht vollzogen, es erfolgte kein vollständiger Schluss des Neuralrohrs und Kopfstrukturen waren kaum entwickelt. Hingegen verlief die Entwicklung des Herzens normal und war von der Entwicklungsretardation nicht betroffen. Des Weiteren wurde die Txnrd1 spezifisch im Herzen deletiert, da in einer parallelen Studie gezeigt wurde ((Conrad et al., 2004); siehe nachfolgend), dass die Txnrd2 in diesem Organ eine essenzielle Rolle spielt und sich deshalb die Frage nach einer möglichen funktionellen Redundanz stellte. Herzspezifische Txnrd1-Knock-out-Mäuse sind lebensfähig, haben eine normale Lebenserwartung und zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp.

Um die Bedeutung des Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase-Systems in ihrer Gesamtheit in der Maus studieren zu können, wurde für die Txnrd2 ebenfalls ein konditionales Knock-out-Mausmodell etabliert (Conrad et al., 2004). Homozygote Txnrd2-Knock-out-Mäuse sind ebenfalls nicht lebensfähig und sterben im Vergleich zu den Txnrd1-Knock-out-Embryonen später, nämlich um Tag 13 der Embryonalentwicklung. Txnrd2-defiziente Embryonen zeigten verglichen mit Wildtypen-Embryonen ebenfalls eine Entwicklungsretardation, waren kleiner, anämisch und zeigten vermehrte Apoptose in der Leber. Außerdem konnte eine reduzierte Proliferationsrate von *ex vivo* kultivierten, embryonalen hämatopoetischen Stammzellen beobachtet werden. Daneben konnte eine geringere Proliferationsrate von Kardiomyozyten beobachtet werden, was zu einer Verdünnung des Myokards führte. Anhand herzspezifischer Txnrd2-Knock-out-Mäuse sollte geklärt werden, ob

die beobachteten Entwicklungsstörungen im Herzen durch den Funktionsverlust der *Txnrd2* in diesem Organ oder sekundär als Begleiterscheinung des hämatopoetischen Phänotyps auftraten. Herzspezifische *Txnrd2*-Knock-out-Mäuse sterben perinatal infolge einer beidseitigen dilatativen Kardiomyopathie. Neben der massiven Dilatation beider Atrien und Ventrikel, konnten bei den neugeborenen herzspezifischen Knock-out-Mäusen teilweise auch Ödeme und eine Muskatlüber beobachtet werden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Kardiomyozyten zeigten geschwollene, deformierte Mitochondrien und einen partiellen Verlust von *Christae*. Daraus konnte geschlossen werden, dass der Funktionsverlust der *Txnrd2* sowohl zu Störungen in der embryonalen Hämatopoese als auch zu Entwicklungsstörungen im Herzen führt.

#### Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase-Knock-out-Mausmodelle

Die Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase (PHGPx), die auch als Glutathion-Peroxidase 4 (GPx4) bezeichnet wird, gehört zur Familie der Selen-abhängigen Glutathion-Peroxidasen (Brigelius-Flohe, 1999; Ursini et al., 1995). Sie unterscheidet sich von den anderen Glutathion-Peroxidasen aber in ihrer monomeren Struktur und einer niedrigeren Substratspezifität (Ursini et al., 1995). Neben Hydroperoxiden und Lipidhydroperoxiden, reduziert die PHGPx zusätzlich Phospholipidhydroperoxide. Neben ihrem eigentlichen Kofaktor Glutathion kann die PHGPx auch andere Thiolgruppen als Reduktionsäquivalent akzeptieren, insbesondere dann, wenn die Glutathionlevels sehr niedrig sind, was physiologischerweise vor allem in Spermien auftritt (Mauri et al., 2003; Roveri et al., 2001; Ursini et al., 1997). Für die PHGPx konnten bei Säugetieren drei unterschiedliche Formen nachgewiesen werden, die zytosolische, die mitochondriale (Arai et al., 1996; Pushpa-Rekha et al., 1995) und die spermienkern-spezifische Form (Pfeifer et al., 2001). Neben ihrer Funktion als Antioxidans wurden der PHGPx auch antiapoptotische Eigenschaften (Arai et al., 1999; Brielmeier et al., 2001; Brigelius-Flohe et al., 2000; Yagi et al., 1998) und antiinflammatorische Eigenschaften zugesprochen, da gezeigt werden konnte, dass die PHGPx an der Modulation der Enzymaktivität von Lipoxygenasen und Cyclooxygenasen im Arachidonsäure-Metabolismus beteiligt ist (Weitzel und Wendel, 1993). Diese Hypothese wurde durch Überexpression von PHGPx *in vitro* verifiziert (Imai et al.,



1998). Durch konstitutiven Gen-Knock-out der PHGPx in der Maus konnten zwei unabhängige Arbeitsgruppen dann 2003 zeigen (Imai et al., 2003; Yant et al., 2003), dass homozygote PHGPx-Knock-out-Mäuse früh embryonal sterben und zwar bereits während der Gastrulation am Embryonaltag 7,5. Die Ursache dieser frühen embryonalen Letalität konnte in diesen Arbeiten aber nicht geklärt werden.

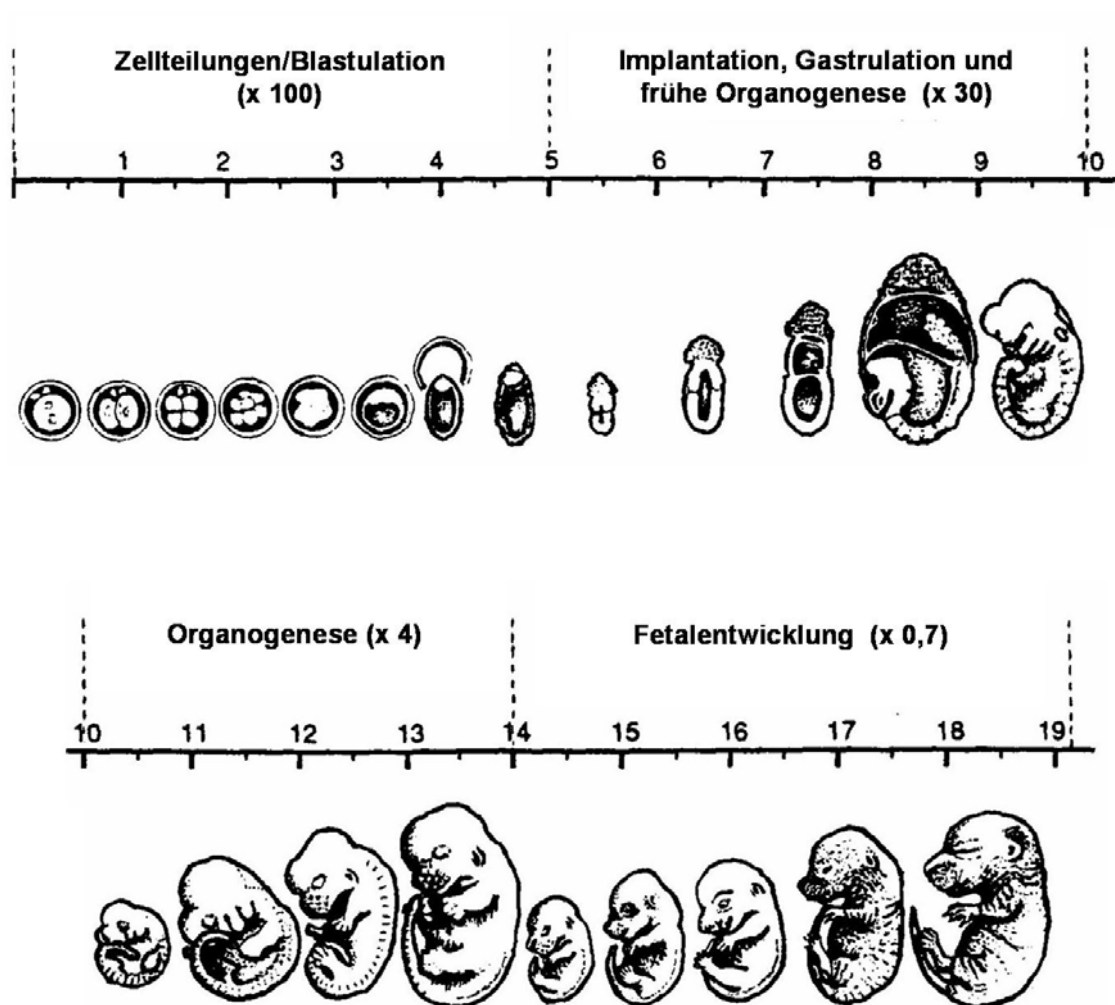
Mäuse, bei denen lediglich die spermienkern-spezifische Form der PHGPx homozygot inaktiviert wurde, sind lebensfähig und überraschenderweise fertil (Conrad et al., 2005). Morphologische Untersuchungen des Hodens und Nebenhodens, sowie Untersuchungen verschiedener Spermienparameter ergaben keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Jedoch konnten bei aus dem Nebenhodenkopf entnommenen Spermien Störungen in der Chromatin-Kondensation beobachtet werden. Weiterführende Experimente konnten schließlich beweisen, dass die PHGPx auch *in vivo* eine Thiol-peroxidierende Funktion hat und bei der Protaminquervernetzung und somit bei der Stabilisierung des haploiden männlichen Genoms eine zentrale Rolle spielt.

## **1.4 Embryonalentwicklung der Maus**

Zur Untersuchung der Funktion der Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase im Säugetierorganismus wurde die Maus (*Mus musculus*) als Modelltier gewählt.

Für das Verständnis der in dieser Arbeit enthaltenen Ergebnisse soll hier die Embryonalentwicklung der Maus im Überblick und anschließend die Gastrulation detaillierter geschildert werden.

Die Gestationszeit der Maus beträgt je nach Stamm 19 bis 21 Tage. Um Mausembryonen unterschiedlicher Gestationsstadien untersuchen zu können, werden Tiere gezielt miteinander verpaart und an den darauf folgenden Tagen wird jeweils morgens die so genannte Vaginalpfropf-Kontrolle (*plug check*) durchgeführt. Hierbei wird das weibliche Tier auf einen Vaginalpfropf untersucht, welcher aus dem Sekret der männlichen akzessorischen Geschlechtsdrüsen besteht und nach erfolgter Kopulation die Vaginalöffnung des Weibchens verschließt. Dieser Vaginalpfropf ist deutlich erkennbar und bleibt in etwa 12 Stunden bestehen. Wird ein Vaginalpfropf vorgefunden, wird dieser Zeitpunkt als Embryonaltag (E) 0,5 der Gestation definiert, denn man geht davon aus, dass unter standardisierten Haltungsbedingungen mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von jeweils 12 Stunden sowohl die Ovulation als auch die Konzeption in der Mitte der Dunkelphase stattfindet und am Morgen des Folgetages die Embryonalentwicklung bereits 12 Stunden fortgeschritten ist (Kaufman, 1992). Diese Definition ist allerdings nur als Richtlinie zu sehen, da das tatsächliche embryonale Entwicklungsstadium sowohl bei der Untersuchung unterschiedlicher Würfe zum gleichen Zeitpunkt als auch einzelner Embryonen innerhalb eines Wurfes um bis zu 12 Stunden variieren kann. Um das tatsächliche Entwicklungsstadium des Mausembryos als solches oder im histologischen Schnitt bestimmen zu können, sind verschiedene Einteilungsschemata erarbeitet worden. Zur Beurteilung des Entwicklungsstadiums ist das Einteilungsschema nach Theiler am gebräuchlichsten (Theiler, 1989), das auf der Klassifizierung humaner Embryonen nach Streeter basiert und sich auf definierte morphologische Kriterien zum jeweiligen Entwicklungsstadium stützt (Streeter, 1942).



**Abbildung 2: Embryonalentwicklung der Maus im Überblick**

(modifiziert nach (Sambrook et al., 1989))

Im Folgenden sollen hier die prinzipiellen Schritte der Gastrulation bei der Maus kurz geschildert werden. Aufgrund tierartlicher Besonderheiten im Ablauf der Gastrulation ist eine allgemeingültige Definition kaum möglich. Während der Gastrulation entsteht nach erfolgter Implantation aus der einschichtigen Blastula eine mehrschichtige Gastrula, eine in ihrer Entwicklung determinierte und in Keimblätter aufgeteilte Keimanlage (Rüsse, 1991). Durch die räumliche Neuordnung des Anlagenmaterials wird die Körpergrundgestalt festgelegt.

**Tabelle 2: Einteilung der Embryonalentwicklung bei der Maus nach Embryonaltag bzw. nach Theiler (modifiziert nach (Theiler, 1989))**

Embryonaltag (E)	Stadium nach Theiler (TS)	morphologische Kriterien
0 – 0,9	1	Zygote (Einzell-Stadium)
1	2	Zellteilungen
2	3	Morula
3	4	Blastozyste, der Embryonalknoten („Innere Zellmasse“) wird sichtbar
4	5	Blastozyste ohne Zona pellucida
4,5	6	Bildung des Hypoblasten (Endoderm) durch Delamination
5	7	Implantation und Formation des Eizylinders
6	8	Differenzierung des Eizylinders
6,5	9	Vor-Primitivstreifen und Frühes-Primitivstreifen-Stadium, die Gastrulation beginnt und die ersten mesodermalen Zellen werden sichtbar
7	10	Mittleres- bis Spätes-Primitivstreifen-Stadium, die Amnionfalten bilden sich, die Allantoisanlage und der Primitivknoten werden sichtbar
7,5	11	Neuralplatten-Stadium und Neurulation Amnion ist vollständig ausgebildet, die Allantois wächst aus, die Neuralwülste bilden sich, Invagination des Vorderdarms
8	12	1 – 7 Somiten, erster Kiemenbogen bildet sich, Herzformierung beginnt, vordere Darmbucht sichtbar
8,5	13	Drehung des Embryos, erster Kiemenbogen mit maxillaren und mandibularen Anteil, zweiter Kiemenbogen sichtbar
9	14	Formierung und Schluss des Neuroporus anterior, Ohrbläschen und dritter Kiemenbogen sichtbar
9,5	15	Formierung des Neuroporus posterior, vordere Extremitätenknospe erkennbar und Gehirn im Zweibläschen-Stadium
10	16	Neuroporus posterior geschlossen, hintere Extremitätenknospe und Schwanzanlage erkennbar, Linsenplakode, Rathkesche Tasche und Nasenplakode sichtbar
10,5	17	Linsenbläschen beginnt sich zu formen, Gehirn im Dreibläschen-Stadium, Schwanz verlängert und verdünnt sich, die Umbilikalhernie bildet sich
11	18	Schluss des Linsenbläschen, Bildung der Nasensäckchen, zervikale Somiten nicht mehr erkennbar
11,5	19	Linsenbläschen vollständig von Oberflächenektoderm abgeschnürt, Handplatte erkennbar, erste Gehörknöchelchen sichtbar
12	20	erste Anzeichen von Fingern, Fußplatte erkennbar, Retinapigmentation erkennbar, Zunge gut definiert, Gehirn im Fünfbälchen-Stadium
13	21	Ellbogen und Nacken klar definiert, 5 Reihen von Sinneshärchen, Umbilikalhernie klar erkennbar
14	22	einzelne Zehen erkennbar, lange Röhrenknochen erkennbar, Haarfollikel in der hinteren Körperregion sichtbar
15	23	Finger und Zehen vollständig abgeteilt, Haarfollikel in der vorderen Körperregion erkennbar, Augenlider offen
16	24	Reposition der Umbilikalhernie, Augenlider schließen sich, Finger parallel, Nägelanlagen an den Zehen erkennbar
17	25	Augenlider vollständig geschlossen, Haut gefältelt, Umbilikalhernie vollständig zurückgebildet
18	26	lange Sinneshärchen, Augen wenig sichtbar unter den geschlossenen Augenlidern, äußeres Ohr vollständig
19	27	Neugeborenes
	28	postnatale Entwicklung

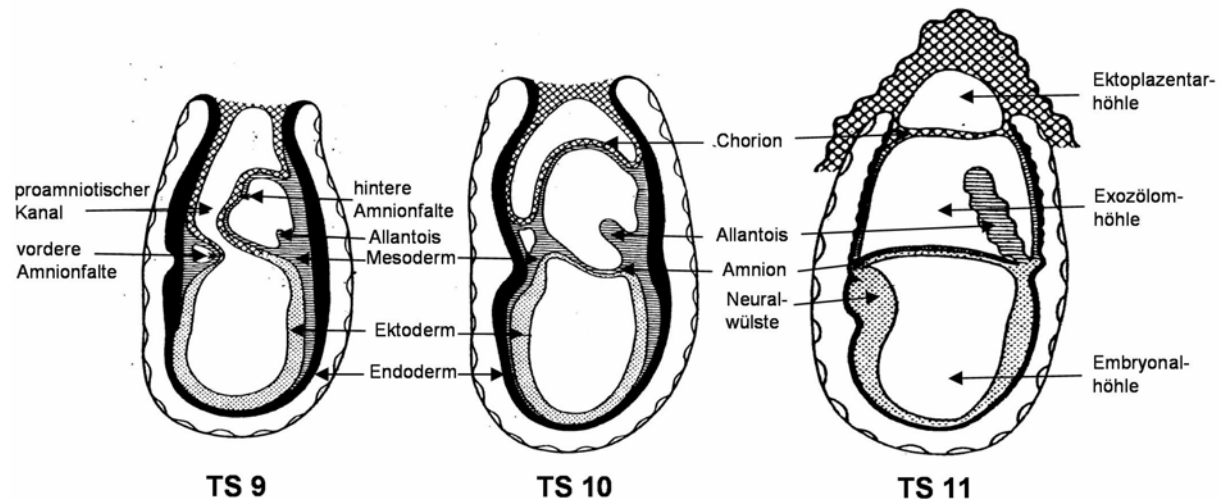
Bei der Maus beginnt die Gastrulation am Tag 6,75 der Embryonalentwicklung, kurze Zeit nach der Implantation des Konzeptus. Die Gastrulation erstreckt sich auf die folgenden 48 Stunden, wobei sich die drei Keimblätter, Ekto-, Endo- und Mesoderm, differenzieren und endet mit der Ausbildung der ersten embryonalen Organanlagen infolge der nun stattfindenden Interaktionen der einzelnen Keimblätter (Downs und Davies, 1993). Die Gastrulation bei Mausembryonen wird nach Theiler (Theiler, 1989) in drei Stadien unterteilt (TS 9 bis 11; siehe auch Tab. 2 und Abb. 3). Downs und Davies unterteilten diese noch weiter (siehe Tab. 3).

**Tabelle 3: Weitere Unterteilung der Theiler-Stadien nach Downs und Davies**

(modifiziert nach (Kaufman, 1992))

Stadium nach Theiler (TS)	weitere Unterteilung nach Downs und Davies	Embryonaltag (E)
TS 9	Vor-Primitivstreifen-Stadium (PS)	E6,75 – 7,25
	Frühes-Primitivstreifen-Stadium (FS)	E6,75 – 7,25
TS 10	Mittleres-Primitivstreifen-Stadium (MS)	E7,0 – 7,75
	Spätes-Primitivstreifen-Stadium ohne Allantoisstiel (LSOB)	E7,25 – 7,75
	Spätes-Primitivstreifen-Stadium mit Allantoisstiel (LSEB)	E7,25 – 7,75
TS 11	Neuralplatten-Stadium (NP)	E7,5 – 8,0
	Spätes-Neuralplatten-Stadium (LNP)	E7,5 – 8,0
	Frühes-Neuralwülste-Stadium (EHF)	E7,5 – 8,0
	Spätes-Neuralwülste-Stadium (LHF)	E8,0

Im Vor-Primitivstreifen-Stadium (TS 9) ist die embryonale Anlage deutlich in embryonale und nichtembryonale (extraembryonale) Anteile differenzierbar und es sind noch keine mesodermalen Anteile ausgebildet. Um etwa den Zeitpunkt E7,0 beginnt mit der Differenzierung der ersten mesodermalen Zellen im kaudalen Bereich des Embryos die Ausbildung des Primitivstreifen, wodurch die embryonale Körperachse festgelegt wird.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung von Mausembryonen TS 9 bis TS 11**  
 (modifiziert nach (Kaufman, 1992))

Im Folgenden (Primitivstreifen-Stadium, TS 10) zieht der Primitivstreifen bis zum distalen Pol der Fruchtanlage und kondensiert dort zum so genannten Primitivknoten. Im nichtembryonalen Bereich bilden sich zunächst die größere hintere Amnionfalte und anschließend die kleinere vordere Amnionfalte. Diese verschmelzen gegen Ende des Primitivstreifen-Stadiums im kranialen nichtembryonalen Bereich miteinander, wodurch die Fruchtanlage in drei Kompartimente (Embryonalhöhle, Exozölohmöhle und Ektoplazentanhöhle) unterteilt wird. Im kaudalen Bereich, wo embryonale und nichtembryonale Komponenten aufeinander treffen, entwickelt sich die Allantoisanlage aus mesodermalen Anteilen. Im nun anschließenden Neuralplatten-Stadium (TS 11) ist der vordere Anteil des Primitivstreifens durch Zellformationen als Neuralplatte und später als Neuralrinne erkennbar, während der kaudale Teil des Primitivstreifens zunächst noch undefiniert bleibt. Vom Primitivknoten ausgehend beginnt sich die Neuralplatte nach kranial auszudehnen, womit die Formation der Neuralwülste eingeleitet wird. Mit Beginn der Neurulation endet die Gastrulation und die Phase der frühen Organogenese beginnt.

## **1.5 Fragestellung**

Im Vordergrund dieser Arbeit steht das Ziel, den Phänotyp der durch Marcus Conrad am Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik etablierten konditionalen PHGPx-Knock-out-Mäuse zu analysieren. Hierzu sollten diese zunächst mit Deleter-Cre-transgenen Mäusen verpaart werden, um ubiquitär homozygote PHGPx-defiziente Mäuse analysieren zu können. Zusätzlich sollte mit Tie2-Cre-transgenen Mäusen verpaart werden, um Tiere zu erhalten, die spezifisch in den Endothelien und im hämatopoetischen System PHGPx-defizient sind und anschließend die Phänotypisierung dieser gewebespezifischen Knock-out-Mäuse durchgeführt werden. Nachdem sich im Laufe dieser Arbeit herausstellte, dass die ubiquitär PHGPx-defizienten Mäuse eine frühe Letalität während der Embryonalentwicklung aufweisen, sollte eine embryonale Expressionsstudie der PHGPx erarbeitet werden, um einen Hinweis auf die Funktion der PHGPx in den einzelnen Organsystemen zu erhalten. Außerdem sollte geklärt werden, welche der drei Formen der PHGPx während der Embryonalentwicklung essenziell und somit für den frühen letalen Phänotyp verantwortlich sind.

## **2. Material**

### **2.1 Allgemeine Chemikalien**

Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Ampuwa	Fresenius AG, Bad Homburg v.d.H.
Chloroform	Merck KgaA, Darmstadt
Desoxyribonukleotidtriphosphate	MBI FERMENTAS, ST. Leon-Rot
DNA-Größenstandard, 100 bp	MBI FERMENTAS, ST. Leon-Rot
DNA-Ladepuffer, 6x	MBI FERMENTAS, ST. Leon-Rot
DEPC	CarlRoth GmbH + Co, Karlsruhe
Essigsäureanhydrid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethanol p.a.	Merck KgaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Formaldehyd, ≥ 37%	CarlRoth GmbH + Co, Karlsruhe
Formamid	CarlRoth GmbH + Co, Karlsruhe
Formamid, deionisiert	CarlRoth GmbH + Co, Karlsruhe
Isopropanol p.a.	Merck KgaA, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	CarlRoth GmbH + Co, Karlsruhe
Methanol p.a.	Merck KgaA, Darmstadt
PBS (ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> )	GiboBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
RotiPhenol/Chloroform/Isoamylalkohol	CarlRoth GmbH + Co, Karlsruhe
Triethanolamin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trinatriumacetat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Xylol	Merck KgaA, Darmstadt

In der Arbeit genannte und hier nicht aufgeführte Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen bezogen.

### **2.2 Verwendete Kits**

peqGOLDTriFast	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Reverse Transcription System	Promega Corporation, Madison, USA



**2.3 Enzyme**

DNase I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Proteinase K	CarlRoth GmbH + Co, Karlsruhe
Restriktionsendonukleasen	MBI FERMENTAS, ST. Leon-Rot
RNA-Polymerasen	MBI FERMENTAS, ST. Leon-Rot
RNase-Inhibitor	MBI FERMENTAS, ST. Leon-Rot
Taq-Polymerase	Invitrogen GmbH, Berlin

**2.4 Material für die Histologie/Immunhistochemie/In-Situ-Hybridisierung**

Blocking-Solution	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
BM-Purple AP Substrate	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Bovines Serum Albumin, Fraktion V	MP Biomedicals GmbH, Eschwege
Carrier-DNA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DAB Substrate Kit	Vector Laboratories, Linaris, Wertheim
DakoPen	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Dextransulfat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DTT	Merck KgaA, Darmstadt
Einbettkassetten	CarlRoth GmbH + Co, Karlsruhe
Eosin	CarlRoth GmbH + Co, Karlsruhe
Ficoll 400	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Hämatoxylin	CarlRoth GmbH + Co, Karlsruhe
Heparin	CarlRoth GmbH + Co, Karlsruhe
Levamisol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NP40	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Objektträger "Super Frost"	Menzel-Gläser, Braunschweig
Objektträger "Super Frost Plus"	Menzel-Gläser, Braunschweig
Paraffin	Merck KgaA, Darmstadt
Paraformaldehyd	CarlRoth GmbH + Co, Karlsruhe
PVP40	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RotiHistokitt II	CarlRoth GmbH + Co, Karlsruhe
Tween20	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
tRNA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid, 30%	MP Biomedicals GmbH, Eschwege
Vector M.O.M. Kit	Vector Laboratories, Linaris, Wertheim
Vectastain <i>Elite</i> ABC Kit	Vector Laboratories, Linaris, Wertheim

## 2.5 Radioaktive Isotope

[<sup>35</sup>S]UTPaS (40 mCi/ml)

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

## 2.6 Antikörper für die Immunhistochemie/In-Situ-Hybridisierung

### Primäre Antikörper

anti-PCNA, Maus, Clone PC10

Dako Diagnostika GmbH, Hamburg

### Sekundäre Antikörper

anti-Maus-Biotin konjugiert

Vector Laboratories, Linaris, Wertheim

anti-DIG/AP

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

## 2.7 Plasmide für die In-Situ-Hybridisierung

**Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Plasmide und den dazu verwendete Restriktionsendonukleasen, sowie RNA-Polymerasen**

Probe	verwendetes Restriktionsenzym	verwendete RNA-Polymerase	Quelle
PHGPx 4.2 <i>antisense</i>	<i>HindIII</i>	T7	M.Conrad
PHGPx 4.2 <i>sense</i>	<i>BamHI</i>	Sp6	M.Conrad
PHGPx GPx2 <i>antisense</i>	<i>BamHI</i>	Sp6	A. Seiler
PHGPx GPx2 <i>sense</i>	<i>HindIII</i>	T7	A. Seiler
<i>gbx2 antisense</i>	<i>BamHI</i>	T7	D. Vogt-Weisenhorn
<i>hesx1 antisense</i>	<i>HindIII</i>	T7	D. Vogt-Weisenhorn
<i>lefty2 antisense</i>	<i>XbaI</i>	T7	G. Przemeck
<i>lim1 antisense</i>	<i>BamHI</i>	T7	D. Vogt-Weisenhorn
<i>otx2 antisense</i>	<i>EcoRI</i>	Sp6	D. Vogt-Weisenhorn

## 2.8 Verwendete Desoxy-Oligonukleotide

**Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Primer**

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion, Martinsried b. München, synthetisiert.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Verwendung</b>
OligoCreA	5'-GATGCAACGAGTGATGAGGTTTCGC-3'	Genotypisierung
OligoCreB	5'-ACCCTGATCCTGGCAATTTTCGGC-3'	Genotypisierung
OligoCreD	5'-CACGACCAAGTGACAGCAATGCTG-3'	Genotypisierung
OligoCreE	5'-CAGGTAGTTATTCGGATCATCAGC-3'	Genotypisierung
OligoFlpforw1	5'-TAGCATTATGTGCTGCTGAACTAACC-3'	Genotypisierung
OligoFlprev1	5'-TCCCGATGATTCGAACTGTAATTGC-3'	Genotypisierung
OligoGAPDH1	5'-CTACTCAAGATTGTCAGCAATG-3'	RT-PCR
OligoGAPDH2	5'-GAGGGAGATGCTCAGTGTTGG-3'	RT-PCR
OligoNeopromrev1	5'-ACGTGCTACTTCCATTTGTCACGTCCTGC-3'	Genotypisierung
OligoPFfor1	5'-ACTCCCCGTGGAAGTGTGAGCTTTGTGC-3'	Genotypisierung
OligoPFrev1	5'-GGATCTAAGGATCACAGAGCTGAGGCTGC-3'	Genotypisierung
OligoPFDfor1	5'-TGGGAATTGGAGTTAACAAGCTAGC-3'	Genotypisierung
OligoPGKpromrev1	5'-GGGCTGCTAAAGCGCATGCTCCAGACTGC-3'	Genotypisierung
OligoPHGPxE1forw1	5'-CTGCGCCTGGTCTGGCAGGC-3'	RT-PCR
OligoPHGPxE1forw2	5'-GCAAGCCATACTCGGCCTCGCGCCTCC-3'	RT-PCR
OligoPHGPxEaforw1	5'-CTGCGCCTGGTCTGGCAGGC-3'	RT-PCR
OligoPHGPxE2rev1	5'-CCAGGCAGACCATGTGCCCGTCGATGTCC-3'	RT-PCR
OligoPHGPxI5forw1	5'-GTGTACCACGTAGGTACAGTGTCTGC-3'	Genotypisierung
OligoPHGPxflox4	5'-TGGTTAGAGGAATGCACTGCTCTTC-3'	Genotypisierung
OligoPHGPxloxPrev3	5'-TGGTGGTTAGAGGAATGCAATAACTTCG-3'	Genotypisierung
OligoNeoFlpforw1	5'-TTAACTAGAGCGGCCGCATAACTTCG-3'	Genotypisierung
OligoNeoFlprev1	5'-AGCCTAGGATACTTAGCCCATAGTCC-3'	Genotypisierung

### **3. Methoden**

#### **3.1 Zucht der Mausstämme**

##### **3.1.1 Tierhaltung und Hygienestatus**

Die Tierräume befinden sich im Biologikum der GSF, Neuherberg. Die Mäuse wurden in Gruppen von bis zu 5 Tieren pro Käfig (Typ II Polycarbonat, Uno) auf hochwertiger Labortiereinstreu (Lignocel 3-4, Rettenmaier, Rosenberg) gehalten. Die Einstreu wurde einmal wöchentlich gewechselt. Die Haltung der Tiere erfolgte unter standardisierten, klimatischen Bedingungen.

**Tabelle 6: Übersicht über die Haltungsbedingungen der Versuchstiere**

Raumtemperatur	21 (+/- 1) °C
rel. Luftfeuchtigkeit	55 (+/- 5) %
Luftwechselrate	15 – 20 pro Stunde
Hell-Dunkel-Rhythmus	12 Stunden / 12 Stunden
Futter	Standarddiät Altromin1314 (ad libitum)
Tränke	Wasser teilentmineralisiert, filtriert (ad libitum)

Diese Werte wurden konstant überwacht und aufgezeichnet.

Die Versuchstiere wurden unter SPF-Bedingungen gehalten und das Hygienemonitoring erfolgte über Sentineltiere, die im dreimonatigen Rhythmus nach den aktuellen Richtlinien der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* („FELASA“) untersucht wurden (Nicklas and Baneux, 2002).

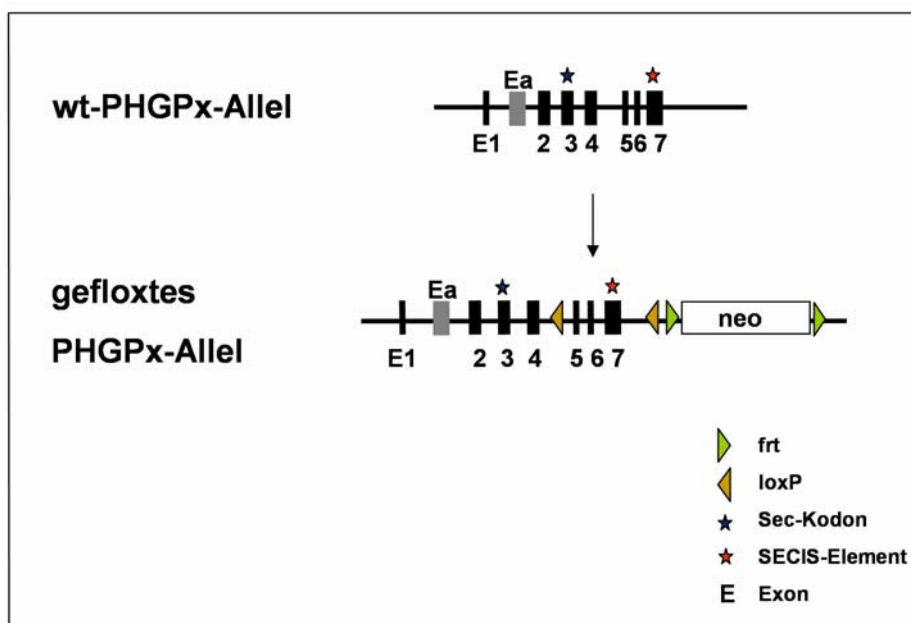
Die hygienische Einheit, in der die Mäuse gehalten wurden, war während der hier beschriebenen Untersuchungen frei von allen in der FELASA-Richtlinie gelisteten Mauspathogenen.

### 3.1.2 Verwendete Mausstämme

#### Konditionale PHGPx-Knock-out-Mäuse

Die in dieser Arbeit zu analysierenden, konditionalen PHGPx-Knock-out-Mäuse wurden von Marcus Conrad (Conrad, 2001) etabliert und sollen deshalb hier nur soweit beschrieben werden, als es für das Verständnis der Arbeit nötig ist.

Das murine PHGPx-Gen wurde ursprünglich als ein aus 7 Exons bestehendes Gen beschrieben (Borchert et al., 1999), wobei sich auf Exon 1 das Startkodon sowohl für die zytoplasmatische und als auch für die mitochondriale Form der PHGPx befindet (siehe auch Abb. 4).



**Abbildung 4: PHGPx-Gen Targeting-Strategie**

Im oberen Teil der Abbildung ist das Wildtyp-PHGPx-Gen dargestellt, darunter das durch das *Gene Targeting* veränderte PHGPx-Gen.

Die PHGPx setzt sich aus 7 Exons zusammen (E1 bis E7); im Bereich des ersten Introns befindet sich das alternative Exon (Ea, grau hervorgehoben). Auf Exon 3 lokalisiert das Sec-Kodon (blauer Stern) und auf Exon 7 das SECIS-Element (roter Stern). Die letzten drei Exons (E5 bis E7) mit dem SECIS-Element sind das *Gene Targeting* von loxP-Stellen (gelbe Dreiecke) flankiert. Durch Kreuzen mit Cre-exprimierenden Mäusen kann so das für die Inkorporation von Sec essenzielle SECIS-Element entfernt werden, wodurch das Sec-Kodon als Stopkodon interpretiert wird. Um die Veränderungen im PHGPx-Lokus so gering wie möglich zu gestalten, kann die durch frt-Stellen (grüne Dreiecke) flankierte Neomycin-Kassette zusätzlich durch Flp-Rekombinase *in vitro* oder *in vivo* deletiert werden. (Abk.: frt = frt-Erkennungsstelle, loxP = loxP-Erkennungsstelle, neo = Neomycin-Phosphotransferase-Gen, Sec = Selenocystein, wt = Wildtyp)

Durch die Arbeiten von Conrad und Mitarbeitern konnte im ersten Intron des PHGPx-Gens ein alternatives Exon identifiziert werden, was für den N-Terminus der spermienkern-spezifischen (nukleären) Form kodiert. Die Kernform der PHGPx wird unabhängig von den beiden anderen Formen der PHGPx und nur in Hodengewebe exprimiert (Moreno et al., 2003; Pfeifer et al., 2001).

Zur Generierung der konditionalen PHGPx-Mauslinie wurde der zu deletierende Genabschnitt (Exon 5 bis 7) zunächst durch so genannte loxP-Erkennungsstellen (Ambremski and Gottesmann, 1981) flankiert. Dadurch sollte die Wildtyp-Genstruktur nur geringfügig verändert werden, um so einen Einfluss auf die endogene Genexpression zu verhindern oder zumindest zu minimieren. Die loxP-Erkennungsstellen sind 34 bp lange, palindromische Nukleotidsequenzen, die natürlicherweise nur in Bakteriophagen vorkommen. Das ebenfalls nur in Bakteriophagen vorkommende Rekombinationsenzym Cre erkennt loxP-Erkennungsstellen und entfernt dazwischen liegende DNA-Sequenzen, wodurch die entsprechenden Bereiche entfernt werden. Dieses Cre/loxP genannte Rekombinationssystem hat man sich auch in Säugetieren zunutze gemacht; die Deletion kann *in vivo* durch die Kreuzung mit Cre-transgenen Tieren, oder aber auch *in vitro* erfolgen. Zusätzlich enthält das konditionale loxP-flankierte Allel, im Folgenden als gefloxtes Allel bezeichnet, im 3'-nicht-transkribierten Bereich des PHGPx-Gens den positiven Selektionsmarker Neomycin-Phosphotransferase (auch als Selektions-Kassette bezeichnet), der für die Selektion homolog rekombinierter ES-Zellklone notwendig war. Diese Selektions-Kassette ist von so genannten *frt*-Stellen umgeben. Das aus Hefen stammende *Flp/frt*-System (Andrews et al., 1985) funktioniert ähnlich wie das Cre/loxP-Rekombinasesystem, das heißt durch Expression der Flp-Rekombinase kann die *frt*-flankierte Selektions-Kassette sowohl *in vitro* als auch *in vivo* entfernt werden. Durch die Entfernung des Selektionsmarkers sollte die Wahrscheinlichkeit einer möglichen Interferenz mit der Expression des PHGPx-Gens minimiert werden.

Als hemizygot Tiere werden in dieser Arbeit solche Mäuse bezeichnet, die ein deletiertes und ein funktionelles (gefloxt oder Wildtyp) PHGPx-Allel tragen. Als homozygot werden solche Tiere bezeichnet, die entweder zwei deletierte, zwei gefloxt oder zwei Wildtyp-Allele tragen. Tragen Mäuse gleichzeitig ein gefloxtes und ein Wildtyp-Allel, so werden sie als heterozygot bezeichnet.

### Flp-transgene Mäuse

Durch das Kreuzen von Tieren mit konditionalen Allelen für PHGPx mit Flp-transgenen Mäusen wurde der Selektionsmarker Neomycin-Phosphotransferase eliminiert (Dymecki, 1996). Der konstitutiv exprimierte Selektionsmarker könnte mit der endogenen Expression der PHGPx interferieren und so einen Einfluss auf Funktion der PHGPx haben. Dies könnte möglicherweise einen Phänotyp verursachen, der nicht nur auf den Funktionsverlust der PHGPx zurückzuführen ist.

### Deleter-Cre-transgene Mauslinie

Deleter-Cre-transgene Tiere exprimieren die Cre-Rekombinase unter dem minimalen humanen CMV-Promotor bereits sehr früh in der Embryonalentwicklung und in allen Geweben (Schwenk et al., 1995). Durch Verpaarung von heterozygoten, konditionalen PHGPx-Knock-out-Mäusen mit Deleter-Cre-transgenen Tieren wurden die letzten drei durch loxP-Erkennungsstellen flankierten Exons ubiquitär deletiert und somit konnten die Folgen eines vollständigen Funktionsverlusts der PHGPx *in vivo* untersucht werden.

### Tie2-Cre-exprimierende Mauslinie

Zur Untersuchung der Funktion der PHGPx spezifisch im Endothel und im hämatopoetischen System wurden heterozygote PHGPx-Knock-out-Mäuse mit Tie2-Cre-transgenen Mäusen verpaart. Bei den Tie2-Cre-transgenen Tieren erfolgt die Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Tie2-Promotors und führt so zu einer nahezu 100%-igen Deletion in allen Endothelzellen und zu einer hohen Deletionsrate (80-90%) in hämatopoetischen Zellen (Constien et al., 2001).

### **3.2 Genotypisierung der Mausstämme**

Die Genotypisierung der einzelnen Tiere respektive der Embryonen erfolgte mittels PCR (*Polymerase Chain Reaction*), wobei die zu untersuchenden Gensequenzen vervielfältigt und anschließend zur Auswertung gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden.

#### **DNA-Isolation aus Mausschwanzspitzen**

Zur Genotypisierung der Mäuse wurden etwa 0,2 bis 0,3 cm lange Schwanzspitzenproben entnommen, die direkt im Anschluss in 500 µl Lyse-Puffer für mindestens 6 h bei 55°C unter Schütteln inkubiert wurden. Nach vollständiger Lyse des Gewebes wurden 500 µl Phenol-Chloroform zugefügt, intensiv gemischt und 7 min bei 15 000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurden 200 µl der oberen, wässrigen Phase zur Fällung der DNA in 2,5-faches Volumen (hier 500 µl) eines bereits vorbereiteten Ethanol/Kochsalz-Gemisches (15 µl einer 5 M Natriumchlorid-Stammlösung pro 1 ml 100% Ethanol p.a.) überführt und gemischt. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 12 000 x g und 4°C wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet zweimal mit 70% Ethanol p.a. gewaschen, luftgetrocknet, in 75 ml TE-Puffer gelöst und bei 4°C aufbewahrt.

#### **DNA-Isolation aus Embryonen**

Für die Genotypisierung von Embryonen wurden Teile des Dottersacks, oder im Falle von Embryonen jünger als Tag 8,5 der Embryonalentwicklung, der gesamte Embryo zur DNA-Gewinnung mit 100 µl Lyse-Puffer für mindestens 4 h bei 55°C geschüttelt, anschließend intensiv mit 100 µl Phenol-Chloroform gemischt und für 7 min zentrifugiert. Die DNA wurde, wie oben beschrieben, im 2,5-fachen Volumen Ethanol/Kochsalz-Gemisch gefällt, zentrifugiert, das DNA-Pellet zweimal mit 70% Ethanol p.a. gewaschen, kurz luftgetrocknet und in 50 ml TE-Puffer gelöst und bei 4°C aufbewahrt.



### DNA-Isolation aus Paraffinschnitten

Um Embryonen auf histologischen Präparaten zu genotypisieren, wurden Schnitte der jeweiligen Embryonen von 6 bis 8 Objektträgern vorsichtig unter dem Mikroskop mithilfe einer feinen Kanüle abgekratzt, ohne dabei mütterliche Gewebeanteile zu berühren und in 50 µl Xylol verbracht. Nach kurzer Inkubation in Xylol zur Auflösung des Paraffins wurden die Gewebeteilchen durch Zentrifugation abgetrennt und in 50 µl Lyse-Puffer zur Lyse bei 55°C über Nacht inkubiert. Tags darauf erfolgte die Aufreinigung mit Phenol-Chloroform und die Fällung der DNA wie oben beschrieben. Nach zweimaligem Waschen mit 70%-igen Ethanol p.a. wurde die DNA schließlich in 20 µl TE-Puffer aufgenommen und gelöst.

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

**TE-Puffer:** 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA

### Standard-PCR-Bedingung

Die Genotypisierung der Tiere erfolgte routinemäßig mittels PCR. Es wurde dazu jeweils 1 µl isolierte DNA pro 25 µl Standard-Reaktionsansatz verwendet. Die Konzentrationen der für die PCR notwendigen Komponenten wurden für den Standard-Reaktionsansatz gemäß Herstellerangaben (Taq-Polymerase, Invitrogen, Berlin) eingestellt:

Aqua dest.	13 µl
dNTP-Mix (1 mM)	5 µl
Forward-Primer (5 µM)	1,5 µl
Reverse-Primer (5 µM)	1,5 µl
10x PCR-Puffer (ohne MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl

Die PCR wurde in einem Thermocycler (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) nach folgendem Schema durchgeführt:

Nach einem initialen Denaturierungsschritt von 5 min bei 95°C folgten 35 Zyklen bestehend aus Denaturierung für 20 sec bei 95°C, Primer-Annealing für 20 sec bei

Primer-entsprechender Temperatur (59°C bis 68°C, je nach Schmelztemperatur des eingesetzten Primerpaars), 10 sec Elongation pro 100 bp Länge des Amplifikationsproduktes bei 72°C. Nach einem finalen Elongationsschritt von 7 min bei 72°C, wurde die Reaktion auf 4°C abgekühlt.

### Gel-Elektrophorese

Für die Auswertung wurden je 12,5 µl des Amplifikats zunächst mit 2,5 µl 6x DNA-Ladepuffer vermischt und auf ein frisch hergestelltes 1%-iges Agarose-Gel (w/v, in 1x TAE, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) aufgetragen; für Banden kleiner als 300 bp wurde ein 2%-iges Gel (w/v) verwendet. Zum Größenvergleich der einzelnen Banden wurden zusätzlich 3 µl eines 100 bp DNA-Größenstandards geladen. Die Auftrennung der Banden erfolgte in 1x TAE-Puffer bei einer Spannung von 110 V. Die Gele wurden nach Abschluss der Elektrophorese mithilfe eines Geldokumentationssystems (peqlab, Erlangen) aufgenommen, ausgedruckt und ausgewertet.

**50x TAE-Puffer:** 242 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 18,6 g EDTA, ad 1000 ml Aqua dest.

### 3.3 Präparation der Embryonen

Für die Erzeugung von homozygoten PHGPx-Knock-out-Embryonen, wurden hemizygoten PHGPx-Knock-out-Mäuse verpaart. An den auf das Zusammensetzen folgenden Tagen wurde immer morgens eine Vaginal-Pfropf-Kontrolle (*plug check*) durchgeführt, um eine stattgefundene Kopulation zu verifizieren und das Gestationsstadium möglichst genau zu bestimmen.

Für die PHGPx-Expressionsstudie wurden Tiere der C57BL/6J-Inzuchtlinie verwendet. Es wurden ebenfalls Vaginal-Pfropf-Kontrollen durchgeführt.

Die Muttertiere wurden am gewünschten Gestationstag euthanasiert, der Uterus entnommen und in sterilem PBS gewaschen. Der Uterus wurde vorsichtig zwischen den Plazentomen durchtrennt und die einzelnen Plazentome nacheinander aus der Uteruswand disseziert, ohne dabei das Plazentom oder die Embryonalhüllen zu verletzen. Danach wurden die vom Dottersack umgebenen Embryonen aus den

Decidua isoliert, der Dottersack vorsichtig geöffnet, und die Embryonen schließlich vollständig von den Embryonalhüllen getrennt.

Für die *whole mount*-In-Situ-Hybridisierung wurden die Embryonen zunächst über Nacht in 4% PFA in PBS bei 4°C fixiert und am nächsten Tag in einer aufsteigenden Methanol-Reihe (25%, 50%, 75% in PBS) entwässert und in 100% Methanol p.a. bei -20°C gelagert.

Die für die Paraffinschnitte verwendeten Embryonen wurden, wie oben beschrieben, präpariert, wobei Embryonen ab Embryonaltag 10 p.c. ebenfalls vollständig aus Deciduum und Dottersack isoliert und über Nacht in 4% PFA in PBS oder Bouinscher Lösung fixiert wurden. Embryonen jünger als Tag 10 p.c. wurden im Deciduum belassen und in 4% PFA in PBS oder Bouinscher Lösung über Nacht bei 4°C fixiert. Nach der Fixierung wurden die Embryonen in 70% Ethanol gewaschen und bis zur Paraffineinbettung darin aufbewahrt.

**Bouinsche Lösung:** 75 ml gesättigte Pikrinsäure, 20 ml 37%-iges Formalaldehyd, 5 ml Eisessig

### 3.4 Histologie

#### 3.4.1 Anfertigen von Paraffinschnitten

Die in 70%-igem Ethanol gelagerten Embryonen wurden zunächst in Einbettkassetten überführt, nach folgendem Schema entwässert und in Paraffin eingebettet:

80% Ethanol 60 min	95% Ethanol 60 min	100% Ethanol 90 min	Xylol 120 min	Paraffin, 65°C über Nacht
-----------------------	-----------------------	------------------------	------------------	------------------------------

Am nächsten Tag wurden die Embryonen mithilfe einer Paraffinausgießstation (Vogel, Giessen) in Blöckchen gegossen und ausgehärtet. Mit einem Rotationsmikrotom (Vogel, Giessen) wurden 5 bis 8 µm dünne Serienschnitte hergestellt. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und über Nacht im Thermoschrank bei 50°C getrocknet, um eine möglichst gute Haftung der Schnitte auf dem Objektträger zu erhalten.

### 3.4.2 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Die Paraffinschnitte wurden zunächst für 10 min in Xylol entparaffinisiert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe gewässert (100% Ethanol 10 min, 95% Ethanol 5 min, 80% Ethanol 5 min, 70% Ethanol 5 min, Aqua dest. 5 min).

Nach 5-minütiger Inkubation in Hämatoxylin wurden die Schnitte für 15 min unter kaltem, fließendem Leitungswasser nachgebläut. Nach einer 3-minütigen Behandlung mit Eosin, wurden die Schnitte kurz in 70% Ethanol entfärbt und über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert (80% Ethanol 20 sec, 95% Ethanol 20 sec, 100% Ethanol 10 min, Xylol 15 min) und mit RotiHistokitt II unter Deckgläsern eingedeckelt.

### 3.5 Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie wurden Paraffinschnitte verwendet. Soweit nicht anders angegeben, wurden die einzelnen Schritte bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Die Schnitte wurden zunächst für 10 min in Xylol inkubiert, um das Paraffin zu lösen, und anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe (100% Ethanol 10 min, 95% Ethanol 5 min, 80% Ethanol 5 min, 70% Ethanol 5 min, PBS 5 min) rehydriert. Je nach Herstellerangaben des verwendeten Antikörpers erfolgte zur Demaskierung des Antigens ein Proteinase K-Verdau für 15 bis 30 min (20 µg/ml Proteinase K in 10 mM Tris pH 7,4) oder alternativ ein Erhitzen der Schnitte mithilfe einer Mikrowelle (in 0,01 M Natriumcitratpuffer pH 6) für mehrere Minuten und im Anschluss ein langsames Abkühlen der Schnitte auf RT. Die folgende Behandlung mit Wasserstoffperoxid (0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol p.a., 15 min) war notwendig, um endogene Peroxidasen zu inaktivieren. Danach wurde das Gewebe für eine halbe Stunde mit einer Blockierungslösung präinkubiert (5% Bovines Serum Albumin, Fraktion V, in PBS für polyklonale Antikörper; M.O.M.-Kit Blocking-Solution (Vector Laboratories, Wertheim) für monoklonale Maus-anti-Maus Antikörper) um mögliche unspezifische Bindungen weitest möglich zu reduzieren. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte, je nach Antikörper, für 1 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C

in einer feuchten Kammer. Die Antikörper wurden hierfür gemäß den Angaben des Herstellers in Blockierungslösung verdünnt. Die Schnitte wurden dann zweimal für 5 min in PBS gewaschen, für 5 min in Blockierungslösung präinkubiert und nachfolgend mit dem Biotin-gekoppelten, sekundären Antikörper (entsprechend dem Primärantikörper) in einer feuchten Kammer inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde dazu ebenfalls in Blockierungslösung verdünnt; Verdünnungsgrad, sowie Inkubationszeit und -temperatur wurden laut Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte wiederum dreimal für 5 min in PBS gewaschen und zur Detektion des sekundären Antikörpers mit der so genannten ABC-Lösung (ABC-Kit, Vector Laboratories, Wertheim) für 30 min bei RT inkubiert. Die ABC-Lösung bildet einen Komplex aus Avidin und Meerrettich-Peroxidase, der das an den Sekundärantikörper gekoppelte Biotin irreversibel binden kann. Nach weiteren Waschschritten (2x PBS 5 min, Aqua dest. 5 min) erfolgte die Färbereaktion, bei der lösliches Diaminobenzidin durch die Peroxidase enzymatisch in einen braunen, unlöslichen Farbstoff überführt wird. Nach ausreichender Färbung (1 bis 5 min) wurden die Schnitte kurz in Aqua dest. gewaschen, zur Gegenfärbung für 3 sec in Hämatoxylin getaucht, unter Leitungswasser gebläut, entwässert und eingedeckelt (siehe unter 3.4).

### **3.6 In-Situ-Hybridisierung**

Die In-Situ-Hybridisierung erfolgte mit markierten RNA-*antisense*-Sonden, die an die im Gewebe enthaltenen, komplementären mRNA-Moleküle binden können. Die Sonden wurden zum einen radioaktiv oder alternativ mit Digoxigenin (DIG) markiert. Der Nachweis erfolgte dann entweder autoradiographisch (radioaktiv markierte Sonde) oder histochemisch über eine Antikörperreaktion (DIG-markierte Sonde).

Alle Arbeiten mit RNA wurden mit RNase-freien Geräten und Reagenzien durchgeführt. Wässrige Lösungen wurden mit Wasser angesetzt, welches über Nacht mit Diethylpyrocarbonat (DEPC 0,01% (v/v)) inkubiert und anschließend zweimal autoklaviert wurde.

### 3.6.1 Herstellung der RNA-Sonden

Um RNA-Sonden generieren zu können, mussten die gewünschten Bereiche als cDNA zunächst in Plasmid-Vektoren kloniert werden, die Schnittstellen für Restriktionsenzyme und Promotorstellen für zwei RNA-Polymerasen (T3, T7 oder Sp6) enthalten.

Zur Linearisierung wurden 10 µg plasmidale DNA mit dem entsprechenden Restriktionsenzym (Tab. 4) gemäß Herstellerangaben (MBI Fermentas, ST. Leon-Rot) bei 37°C über Nacht verdaut. Danach wurde die linearisierte DNA mithilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und die DNA-Konzentration bestimmt.

Für die *in vitro*-Transkription der RNA-Sonde wurden 1,5 µg des aufgereinigten DNA-Templates eingesetzt. Die Markierung der RNA-Sonde erfolgte durch den Einbau von markierten Uridintriphosphat, hier <sup>35</sup>S-thio-rUTP oder DIG-11-rUTP.

Der standardisierte *in vitro*-Transkriptionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

linearisiertes Plasmid-DNA-Template	1,5 µg
10x Transkriptionspuffer	3 µl
NTP-Mix (rATP/rGTP/rCTP, jeweils 10 mM)	3 µl
RNase-Inhibitor (40 U/µl)	1 µl
<sup>35</sup> S-thio-rUTP (40 mCi/ml; Amersham, Freiburg)	3 µl
oder	
Digoxigenin-11-rUTP (10x conc.; Roche, Mannheim)	3 µl
T3-, T7- oder Sp6-RNA-Polymerase (20 U/µl)	1 µl
RNase-freies Wasser	ad 30 µl

Für radioaktive RNA-Sonden wurde dem Reaktionsansatz zusätzlich noch 2,5 µl 1 M DTT zugefügt.

Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig gemischt, kurz abzentrifugiert und anschließend für 3 h bei 37°C inkubiert, wobei nach Ablauf der ersten Stunde noch einmal 0,5 µl der entsprechenden RNA-Polymerase zugefügt wurde. Um die DNA-Matrize zu zerstören, wurde im Anschluss nach Zugabe von 2 µl RNase-freier

DNase I (10 U/μl; Roche, Mannheim) weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die markierte RNA-Sonde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend dem Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die DIG-markierte Sonde wurde in 50 μl Ampuwa aufgenommen und die Qualität der RNA-Sonde in einem 1%-igen Agarose-Gel überprüft. Die <sup>35</sup>S-markierte Sonde wurde hingegen in 100 μl Ampuwa aufgenommen, 2 μl davon für die Aktivitätsbestimmung in 2 ml Szintillationsflüssigkeit überführt und im Szintillationsmeßgerät (Beckman, Krefeld) gemessen.

### 3.6.2 whole mount-In-Situ-Hybridisierung

#### Vorbehandlung der Embryonen

Die in 100% Methanol bei -20°C gelagerten Embryonen wurden zur Rehydrierung auf Eis durch eine absteigende Methanolreihe (75% Methanol in PBS, 50% Methanol in PBS, 25% Methanol in PBS, jeweils 10 min) geführt und zweimal mit PBT (0,1% Tween20 in PBS) auf Eis gewaschen. Embryonen mit einem Gestationsstadium E10,5 und älter wurden zur Permeabilisierung des Gewebes mit Proteinase K (10 μg/ml in Proteinase K-Puffer) 3 bis 5 min bei 37°C behandelt (E10,5 3 min, E11,5 4 min, E12,5 und E13,5 5 min). Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die Embryonen zunächst zweimal für 5 min mit Glycin in PBT (2 mg/ml, frisch angesetzt, auf Eis) und anschließend zweimal 5 min in PBT (auf Eis) gewaschen. Um das Gewebe für die Probe besser zugänglich zu machen, wurden die Embryonen für 20 min in RIPA-Puffer auf Eis inkubiert, zweimal 5 min in PBT (auf Eis) gewaschen und in frischem 4% PFA/0,2% Glutaraldehyd in PBT auf Eis refixiert. Abschließend wurden die Embryonen zweimal in PBT bei RT gewaschen.

**Proteinase K-Puffer:** 50 mM Tris/HCl pH 7,6, 5 mM EDTA pH 8,0

**RIPA-Puffer:** 5 mM 10% SDS, 150 mM NaCl, 10 mM NP40, 50 mM 10% Deoxycholat, 1 mM EDTA pH 8,0, 50 mM Tris/HCl pH 8,0

#### Hybridisierung

Zur Vorbereitung auf die Prähybridisierung wurden die Embryonen in Hybridisierungs-Puffer/PBT (Verhältnis 1:1) für 10 min bei RT inkubiert und

anschließend in Hybridisierungs-Puffer für 3 h bei 68°C prähybridisiert. Die DIG-markierte RNA-Sonde wurde für 3 min bei 90°C denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt, im Verhältnis 1:100 (entspricht in etwa 0,25 µg/ml) mit Hybridisierungs-Puffer verdünnt und die Embryonen darin über Nacht bei 68°C inkubiert.

Am darauf folgenden Tag wurde die Probe abgenommen, die Embryonen zweimal mit Hybridisierungs-Puffer für 30 min bei 65°C gewaschen und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Vor dem RNase-Verdau wurden die Embryonen zunächst in Hybridisierungs-Puffer/RNase-Puffer (Verhältnis 1:1) und in RNase-Puffer jeweils für 5 min gewaschen. Danach erfolgte die Behandlung mit RNase A (100 µg/ml in RNase-Puffer) für 1 h bei 37°C. Anschließend wurde mit RNase-Puffer/(SSC/FA/Tween20) (Verhältnis 1:1) für 5 min bei RT gewaschen und in SSC/FA/Tween20 auf 65°C erwärmt. Es folgten mehrere Waschschrte mit SSC/FA/Tween20 bei 65°C (2x 5min, 3x 10 min, 5x 30 min) bevor die Embryonen in SSC/FATween20 wieder auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend in (SSC/FA/Tween20)/TBST (Verhältnis 1:1) für 5 min gewaschen wurden. Nachdem die Embryonen zweimal in TBST und zweimal in MABT, jeweils für 10 min, gewaschen wurden, wurden diese für 1 h in 10% Blocking-Solution (Roche, Mannheim) in MABT für 1 h bei RT inkubiert. Zeitgleich wurde der Anti-DIG-Antikörper in einem Verhältnis von 1:5000 mit 1% Blocking-Solution (Roche, Mannheim) in MABT verdünnt und 1 h bei 4°C präinkubiert. In dieser Antikörper-Lösung wurden die Embryonen über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der nicht gebundene Antikörper entfernt und die Embryonen zunächst dreimal für 5 min und anschließend stringent mindestens zehnmal alle 60 min mit TBST gewaschen.

Vor der Entwicklung wurden die Embryonen mit Alkalische-Phosphatase-Puffer (frisch angesetzt) zweimal für 5 min gewaschen und in BM-Purple-Färbelösung lichtgeschützt bei 4°C über Nacht oder bei Bedarf länger inkubiert. Abschließend wurden die Embryonen in PBT gewaschen und in 4% PFA in PBS lichtgeschützt bis zur Dokumentation gelagert.

**Hybridisierungs-Puffer:** 50% deionisiertes Formamid, 50 µg/ml Heparin, 5x SSC, 0,1% Tween20, 100 µg/ml tRNA

**RNase-Puffer:** 500 mom NaCl, 10 mom Tris/HCl pH 8, 0,5 mom EDTA pH 8,0

**SSC/FA/Tween20:** 2x SSC/50% Formamid/0,1% Tween20

**TBST:** 25 mom Tris/HCl pH 7,5, 8g NaCl, 0,2 g KCl, 0,1% Tween20



**MABT:** 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, 0,1% Tween20

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

**Alkalische-Phosphatase-Puffer:** 500 mM NaCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris/HCl pH 9,5, 0,1% Tween20, 2 mM Levamisol

**BM-Purple-Färbelösung:** BM-Purple AP Substrate (Roche, Mannheim), 0,1% Tween20, 2 mM Levamisol

### 3.6.3 Radioaktive In-Situ-Hybridisierung

#### Vorbereitung der Paraffinschnitte

Die Paraffinschnitte wurden zunächst zweimal für 15 min in Xylol entparaffinisiert und anschließend rehydriert (70% Ethanol 5 min, Aqua dest. 3 min, 0,1 M PBS 3 min). Danach wurden die Schnitte für 20 min in 4% PFA in PBS bei 4°C nachfixiert, zweimal für 5 min in 0,1 M PBS gewaschen und für 7 min mit Proteinase K (20 µg/ml in Proteinase K-Puffer) bei Raumtemperatur verdaut. Nach einmaligem Waschen mit 0,1 M PBS wurden die Schnitte noch einmal für 20 min in 4% PFA in PBS bei 4°C postfixiert und mit 0,1 M PBS gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger in 0,1 M Triethanolamin-HCl (pH 8,0) für exakt 10 min unter dem Abzug inkubiert, wobei 600 µl Essigsäureanhydrid tropfenweise unter zügigem Rühren zugegeben wurden. Nach zweimaligen Waschen in 2x SSC wurden die Schnitte dehydriert (60% Ethanol, 70 % Ethanol, 95 % Ethanol, 100 % Ethanol, jeweils 1 min), für etwa 30 min in staubfreier Umgebung luftgetrocknet und anschließend für die Hybridisierung verwendet.

**Proteinase K-Puffer:** 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 5 mM EDTA pH 8,0

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

#### Hybridisierung

Die vorbehandelten und getrockneten Schnitte wurden zunächst eine Stunde lang in Hybridisierungs-Puffer bei 56°C in feuchter Atmosphäre prähybridisiert. Hierzu wurden pro Objektträger 90-100 µl Hybridisierungs-Puffer verteilt, mit einem Deckglas blasenfrei bedeckt und in einer lichtgeschützten Hybridisierungskammer gelagert, deren Boden ausreichend mit einer so genannter *Chamberfluid* bedeckt ist. Nach der Prähybridisierung wurden die aufgelegten Deckgläser vorsichtig entfernt.

Für die Hybridisierung wurden die RNA-Sonden auf eine Aktivität von 35000-70000 cpm/ $\mu$ l mit Hybridisierungs-Puffer verdünnt, wobei wiederum 90-100  $\mu$ l Hybridisierungs-Puffer pro Objektträger verwendet wurden. Die verdünnten Proben wurden für 2 min bei 90°C denaturiert, kurz auf Eis gestellt, wie oben beschrieben auf die Objektträger aufgetragen und über Nacht bei 56°C in der Hybridisierungskammer inkubiert.

Tags darauf wurden die Deckgläser vorsichtig entfernt und die Schnitte viermal für je 5 min in 4x SSC bei RT gewaschen. Anschließend erfolgte eine RNase-Behandlung (10 mg/ml in NTE-Puffer) für 20 min bei 37°C. Die Schnitte wurden dann in einer absteigenden SSC-Verdünnungsreihe bei RT gewaschen (1 mM DTT in 2x SSC zweimal für 5 min, 1 mM DTT in 1x SSC für 10 min, 1 mM DTT in 0,5x SSC für 10 min) und schließlich zweimal für 30 min in 1 mM DTT in 0,1x SSC bei 64°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in 0,1x SSC für jeweils 10 min wurden die Schnitte dehydriert (300 mM Ammoniumacetat in 30% Ethanol, 300 mM Ammoniumacetat in 50% Ethanol, 300 mM Ammoniumacetat in 70% Ethanol, 95% Ethanol, 100% Ethanol, jeweils 1 min) und unter staubfreien Bedingungen luftgetrocknet.

**Hybridisierung-Puffer:** 50% deionisiertes Formamid, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8,0, 10% Dextransulfat, 0,02% Ficoll 400, 0,02% PVP40, 0,02% BSA, 0,5 mg/ml tRNA, 0,2 mg/ml Carrier-DNA, 200 mM DTT

**Chamberfluid:** 50% Formamid, 2x SSC

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

**NTE-Puffer:** 500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM EDTA pH 8,0

### Detektion

Um einen ersten Eindruck über die Qualität der durchgeführten Hybridisierung zu erhalten, wurden die Objektträger in eine Filmkassette mit beidseitiger Verstärkerfolie gebracht, ein <sup>35</sup>S-sensitiver, einseitig beschichteter Film (Kodak BioMax MR, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) aufgelegt, dieser für mindestens 48 Stunden bei Raumtemperatur exponiert und anschließend entwickelt. Anhand des so erhaltenen Signals auf dem Film konnte die anschließend benötigte Expositionszeit grob abgeschätzt werden. Bei dem so genannten *Dippen* wurden die Objektträger in eine Fotoemulsion (Kodak NTB2 Emulsion, Integra Biosciences, Fernwald) eingetaucht

wobei diese mit Silberkörnchen beschichtet wurden. Die Fotoemulsion wurde vor Verwendung für mindestens eine Stunde bei 42°C im Wasserbad geschmolzen und anschließend vorsichtig mit einem Glasstab durchmischt. Die Objektträger wurden für einige Sekunden in die Emulsion eingetaucht und über Nacht vollständig lichtgeschützt bei Raumtemperatur getrocknet. Tags darauf wurden die Objektträger in lichtundurchlässige Kammern gebracht und für vier bis zehn Wochen bei 4°C exponiert.

Zur Entwicklung wurden die Schnitte zunächst für mindestens zwei Stunden langsam auf Raumtemperatur gebracht, für 3 min in Entwicklerlösung (Kodak D 19, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) inkubiert, 30 sec in Leitungswasser gewaschen und für 7 min mit Fixierlösung (Kodak Fixer, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) fixiert. Nachdem die Schnitte für 25 min unter fließendem Leitungswasser gewässert wurden, wurde die noch auf der Rückseite der Objektträger anhaftende Fotoemulsion mit einer Rasierklinge entfernt. Als Gegenfärbung wurde entweder Kresylviolett oder Hämatoxylin verwendet. Abschließend wurden die Schnitte wie oben beschrieben dehydriert und eingedeckelt (siehe unter 3.4).

### **3.7 Semiquantitative RT-RCR**

#### Isolation gesamtzellulärer RNA

Mausgewebe oder Embryonen wurden sofort nach der Präparation in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Das tiefgefrorene Gewebe wurde zunächst in 1 ml saurer Phenol-Guanidiniumthiocyanat-Lösung (peqGOLDTriFast; peqlab, Erlangen) mithilfe eines elektrischen Homogenisators zerkleinert, anschließend zur Phasentrennung in 200 µl Chloroform überführt, gründlich durchmischt und 7 min bei 15000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden 600 µl der oberen wässrigen Phase vorsichtig abgenommen und in 500 µl Isopropanol überführt, vorsichtig gemischt, wenige Minuten auf – 80°C inkubiert und für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit 70%-igem Ethanol p.a. wurde das RNA-Pellet luftgetrocknet und in 200 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Um ein vollständiges Lösen der RNA zu erleichtern, wurde der Ansatz für etwa 10 min bei 37°C geschüttelt. Im Anschluss wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Für den DNase-Verdau wurden je Probe

90 µl gelöste RNA mit 10 µl Puffer (NEB3, New England Biolabs, Frankfurt/Main) und 3 µl RNase-freier DNase I (Roche, Mannheim) versetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zur Aufreinigung der RNA wurde nochmals eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt (siehe oben), die RNA in Isopropanol gefällt, mit 70%-igem Ethanol p.a. gewaschen, luftgetrocknet und in 50-100 µl RNase-freiem Wasser vollständig gelöst. Anschließend wurde für jede Probe die RNA-Konzentration bestimmt.

### Herstellung der cDNA

Für die cDNA-Synthese aus RNA wurde das *Reverse Transcription System* (Promega, Mannheim) verwendet. Dieses System enthält neben dem Enzym „AMV Reverse Transkriptase“ auch alle erforderlichen Komponenten wie Primer und Puffer. Der Reaktionsansatz wurde gemäß Herstellerangaben wie folgt hergestellt:

MgCl <sub>2</sub> , 25 mom	4 µl
Reverse Transkriptions-Puffer 10x	4 µl
dNTP-Mix, 10 mom	2 µl
RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl
AMV Reverse Transkriptase (24 U/µl)	15 U
Random Primer (500 µg/µl)	1 µl
RNA-Template	x µl (1 µg)
RNase-freies H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Die Ansätze wurden zunächst bei Raumtemperatur für 10 min und dann für 15 min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde die reverse Transkriptase für 5 min bei 95°C inaktiviert und der Ansatz für 5 min auf Eis abgekühlt. Die cDNA-Transkripte wurden auf ein Volumen von 100 µl mit Wasser aufgefüllt und anschließend bei -20°C gelagert.

### PCR-Ansatz für die RT-PCR

Für die semiquantitative PCR wurden je 2 µl cDNA pro Probe eingesetzt:

Aqua dest.	28 µl
dNTP-Mix (1 mM)	10 µl
Forward-Primer (5 µM)	3 µl
Reverse-Primer (5 µM)	3 µl
10x PCR-Puffer (ohne MgCl <sub>2</sub> )	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	3 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl

Nach einem initialen Denaturierungsschritt von 5 min bei 95°C folgten 30, 35 oder 40 Zyklen bestehend aus Denaturierung für 20 sec bei 95°C, Primer-Annealing für 20 sec bei Primer-entsprechender Temperatur (59-68°, je nach Schmelztemperatur des eingesetzten Primerpaars), 10 sec Elongation pro 100 bp Länge des Amplifikationsproduktes bei 72°C. Nach einem finalen Elongationsschritt von 7 min bei 72°C, wurde die Reaktion auf 4°C abgekühlt. Um ein optimales Ergebnis zu erzielen, wurden pro Primerpaar unterschiedliche Ansätze bei einer Zyklenzahl von 30, 35 und 40 getestet.

Das PCR-Produkt wurde, wie oben beschrieben, zur Auswertung auf ein Agarose-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und dokumentiert.

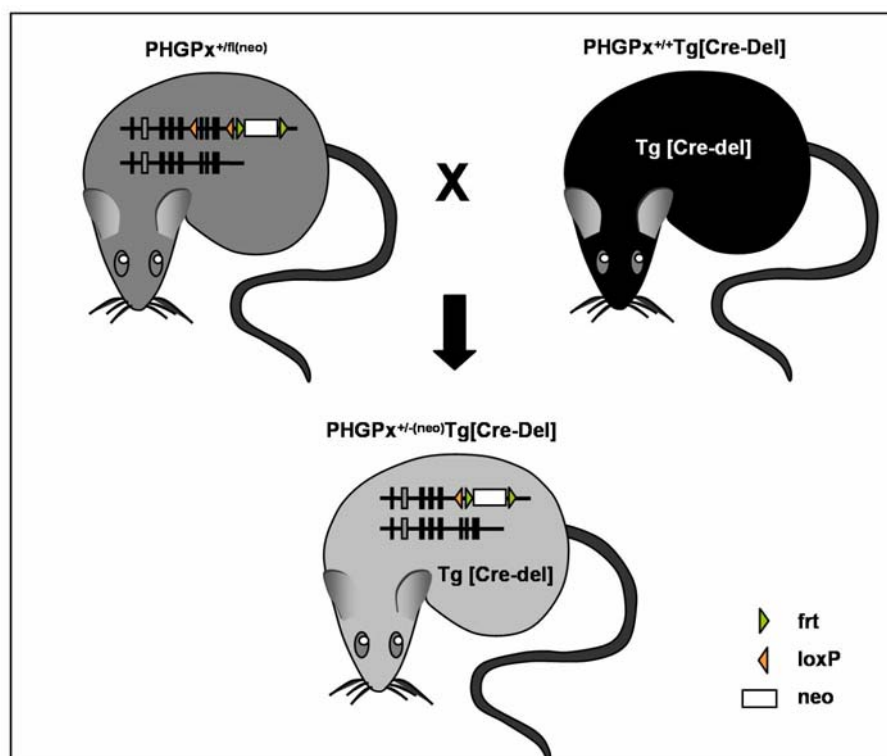
### **3.8 Sonstige Methoden**

Sofern nicht im Detail beschrieben, wurden die gängigen Methoden, wie beispielsweise Bakterien-Transformation und Präparation von Plasmid-DNA, nach Sambrook et al. (Sambrook et al., 1989) oder entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Etablierung von PHGPx-Knock-out-Mäusen

Nachdem es gelungen war, Keimbahntransmission des geflochtenen PHGPx-Allels zu erhalten, sollte das geflochte Allel mithilfe der Cre-Deleter-Mäuse (Schwenk et al., 1995) zunächst in allen Geweben inklusive der Keimbahn inaktiviert werden (Abb. 5).



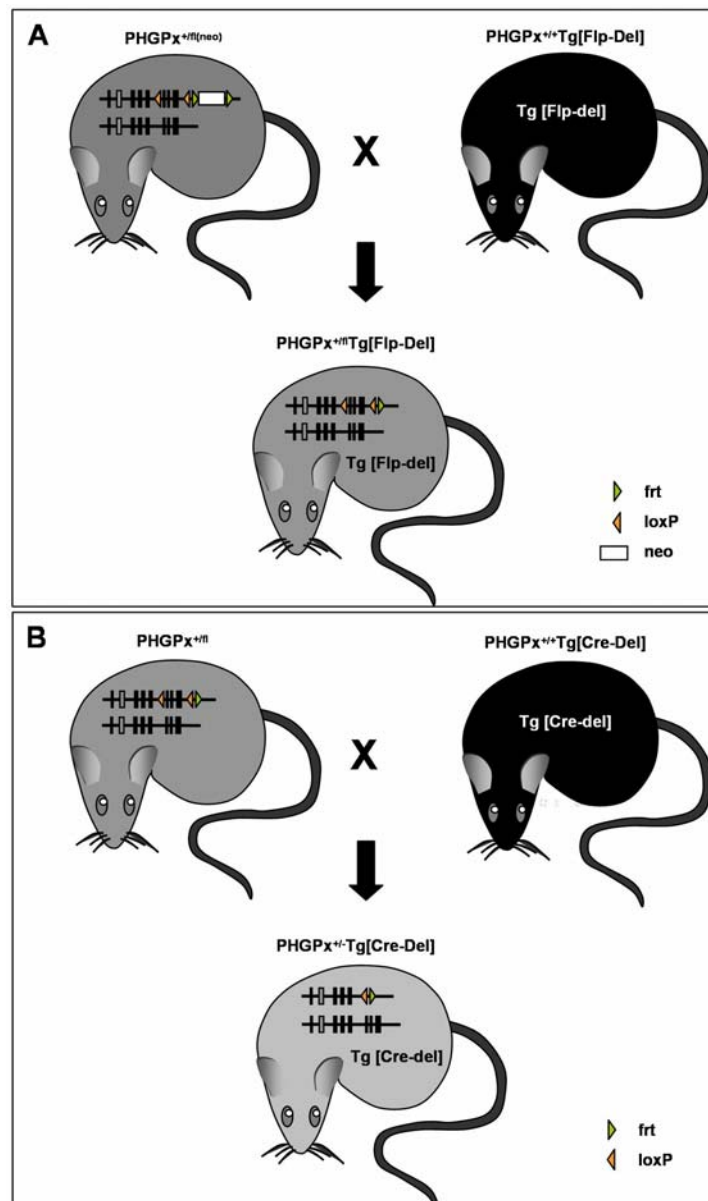
**Abbildung 5: Zucht der hemizygoten PHGPx-Knock-out-Mäuse**

Heterozygote geflochte PHGPx-Knock-out-Tiere ( $\text{PHGPx}^{+/\text{fl}(\text{neo})}$ , oben links) werden zunächst mit Deleter-Cre-transgenen Mäusen ( $\text{PHGPx}^{+/+}\text{Tg}[\text{Cre-Del}]$ , oben rechts) verpaart. Bei hemizygoten, doppelt transgenen Nachkommen ( $\text{PHGPx}^{+/-(\text{neo})}\text{Tg}[\text{Cre-Del}]$ , unten) wird durch die ubiquitär exprimierte Cre-Rekombinase der von den loxP-Stellen (gelbe Dreiecke) flankierte Bereich des PHGPx-Gens ausgeschnitten, dies geschieht auch in der Keimbahn. Unter den Nachkommen dieser Tiere sind hemizygoten Tiere, die über mehrere Generationen auf den C57BL/6J-Hintergrund rückgekreuzt werden, um einen reinen kongenen Stamm zu erhalten. Hierfür werden nur solche Tiere weiterverpaart, die hemizygot für PHGPx, aber negativ für das Deleter-Cre-Transgen sind, um Interferenzen bei späterer Verpaarung mit gewebespezifischen Cre-Rekombinase-transgenen Linien zu vermeiden

Abk.: frt = frt-Erkennungsstelle, loxP = loxP-Erkennungsstelle, neo = Neomycin-Phosphotransferase-Gen, Tg[Cre-del] = Deleter-Cre-Rekombinase-transgen

Cre-Deleter-Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase bereits sehr früh und ubiquitär in der Embryonalentwicklung, wodurch mit hoher Effektivität loxP-flankierte DNA-Sequenzen in allen Zelltypen inklusiver der Keimzellen deletiert werden können. Doppelt transgene Mäuse mit rekombiniertem geflochten PHGPx-Allel geben dieses nun mit hoher Effizienz an die Nachkommen weiter, die dann hemizygot am PHGPx-Lokus sind, das heißt sie enthalten ein inaktiviertes PHGPx-Allel. Solche hemizygoten Tiere wurden zum einen auf den genetischen Hintergrund C57BL/6J zurückgekreuzt, mit dem Ziel, kongene Tiere zu erhalten. Zum anderen wurden sie zur Erzeugung homozygoter Knock-out-Tiere miteinander verpaart. Hemizygot PHGPx-Knock-out-Tiere zeigten keinerlei klinische Auffälligkeiten und besitzen eine normale Lebenserwartung (Daten nicht gezeigt). Somit scheint ein Verlust eines funktionellen PHGPx-Allels, zumindest unter Standard-Haltungsbedingungen, keinen offensichtlichen Einfluss auf die Physiologie dieser Mäuse zu haben.

Parallel zur Zucht der hemizygoten PHGPx-Knock-out-Mäuse wurden geflochte PHGPx-Mäuse mit Flp-Rekombinase-transgenen Mäusen (Dymecki, 1996) gekreuzt, um die noch auf dem konditionalen Allel befindliche Neomycin-Kassette, die notwendig war für die homologe Rekombination in ES Zellen, zu entfernen (Abb. 6A). Dazu wurden fünf geflochte PHGPx-Mäuse mit Flp-Deleter Mäusen gekreuzt, die Nachkommen auf Deletion der Neomycin-Kassette mittels PCR getestet und drei positiv getestete Männchen mit je 10 C57BL/6J-Weibchen verpaart. Diese relativ hohe Tierzahl war notwendig, da der Flp-Deleter im Gegensatz zum Cre-Deleter nur partiell (in etwa 30%) deletiert und man deshalb zunächst nur ein Mosaiktier erhält. Man muss davon ausgehen, dass nur ein Teil der Keimzellen ein Neo-deletiertes Allel tragen und muss deswegen mehr Nachkommen erzeugen, um solche zu finden, die die Neomycin-Kassette deletiert haben. Schließlich wurden diese Mäuse wiederum, wie oben geschildert, mit Cre-Deleter-Tieren verpaart um hemizygot PHGPx-Mäuse ohne Neo-Kassette zu erhalten (Abb. 6B). Auf diese Weise wurden Mäuse gezüchtet, die nur noch wenige künstlich eingebrachte DNA-Sequenzen enthielten, um so mögliche, unerwünschte, artifizielle Nebeneffekte einer Neo-Kassette auf die endogene Expression des PHGPx-Gens zu minimieren bzw. sogar zu vermeiden.



**Abbildung 6: Zucht der hemizygoten PHGPx-Knock-out-Mäuse mit vorausgehender Deletion der Neomycin-Kassette**

(A) Heterozygote geflochte PHGPx-Mäuse ( $\text{PHGPx}^{+/fl(\text{neo})}$ , oben links) werden mit Flp-Rekombinase exprimierenden Mäusen ( $\text{PHGPx}^{+/+}\text{Tg}[\text{Flp-Del}]$ , oben rechts) verpaart, um zunächst die zwischen den frt-Stellen (grüne Dreiecke) liegende Neomycin-Resistenz-Kassette zu deletieren. Auch diese Tiere ( $\text{PHGPx}^{+/fl}\text{Tg}[\text{Flp-Del}]$ , unten) werden auf den C57BL/6J-Hintergrund rückgekreuzt, wobei wiederum nur solche Tiere weiterverpaart werden, die ein gefloxtes PHGPx-Allel haben, aber nicht das Flp-Transgen tragen.

(B) Geflochte, nicht Flp-transgene Mäuse ( $\text{PHGPx}^{+/fl}$ , oben links) werden ebenfalls im Anschluss, wie in Abb. 5 bereits dargestellt, mit Deleter-Cre-transgenen Mäusen ( $\text{PHGPx}^{+/+}\text{Tg}[\text{Cre-Del}]$ , oben rechts) weiterverpaart, um hemizygot PHGPx-Knock-out-Tiere zu erhalten ( $\text{PHGPx}^{+/fl}\text{Tg}[\text{Cre-Del}]$ , unten)

Abk.: frt = frt-Erkennungsstelle, loxP = loxP-Erkennungsstelle, neo = Neomycin-Phosphotransferase-Gen,  $\text{Tg}[\text{Cre-del}]$  = Deleter-Cre-Rekombinase-transgen,  $\text{Tg}[\text{Flp-del}]$  = Deleter-Flp-Rekombinase-transgen



Um homozygote PHGPx-defiziente Tiere zu erhalten, wurden Geschwisterverpaarungen von hemizygoten PHGPx-Knock-out-Mäusen durchgeführt. Bei der Verpaarung von hemizygoten PHGPx-Knock-out-Elterntieren sollten 25 % der Nachkommen gemäß der Mendelschen Vererbungslehre homozygot PHGPx-Knock-out oder Wildtyp und 50% hemizygot sein.

**Tabelle 7: Übersicht über die Verteilung der Genotypen der Nachkommen aus Verpaarungen von hemizygoten PHGPx-Knock-out-Tieren (PHGPx<sup>+/-</sup> x PHGPx<sup>+/-</sup>)**

Wurfgröße	Genotyp +/+	Genotyp +/-	Genotyp -/-
7	4	3	0
8	0	8	0
8	4	4	0
11	7	4	0
6	2	4	0
12	3	9	0
4	1	3	0
7	2	5	0
6	2	4	0
5	3	2	0
13	6	7	0
4	1	3	0
9	2	7	0
9	5	4	0
6	5	1	0
3	1	2	0
5	1	4	0
<b>ges. 123</b>	<b>ges. 49</b>	<b>ges. 74</b>	<b>ges. 0</b>
<b>100%</b>	<b>39,8%</b>	<b>60,2%</b>	<b>0%</b>

Wie aus Tabelle 7 ersichtlich, wurde allerdings kein einziges homozygotes PHGPx-Knock-out-Tier geboren. Bei einer Gesamtzahl von 123 Nachkommen aus hemizygoten Verpaarungen waren 39,8% homozygot Wildtyp und 60,2% hemizygot für PHGPx. Die Verschiebung der prozentualen Verteilung der einzelnen Genotypen (39,8% : 60,2% : 0%) deutete auf eine embryonale Letalität der homozygoten PHGPx-Knock-out-Tiere hin. Es konnte daraus geschlossen werden, dass der Verlust der beiden PHGPx-Allele nicht mit der Entwicklung bis zur Geburt vereinbar

ist, und somit der homozygote PHGPx-Knock-out zu einem embryonal bzw. perinatal letalen Phänotyp führt.

#### **4.2 Phänotyp der PHGPx-Knock-out-Embryonen**

Nachdem feststand, dass lebensfähige homozygote PHGPx-Knock-out-Mäuse nicht geboren wurden, stellte sich die Frage, zu welchem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung die PHGPx-Knock-out-Embryonen absterben. Hierzu wurden wiederum hemizygoten Tiere verpaart und täglich eine Vaginalpfropf-Kontrolle (*plug check*) durchgeführt. Der Tag, an dem ein Vaginalpfropf zu erkennen war, wurde dann als Tag 0,5 p.c. der Embryonalentwicklung festgelegt.

Zu verschiedenen Gestationstagen wurden Muttertiere euthanasiert und der Uterus inklusive der Embryonen entnommen. Die einzelnen Embryonen wurden unter dem Stereomikroskop disseziert und auf morphologisch auffällige Abnormalitäten wie Missbildungen oder Entwicklungsretardation analysiert. Untersucht wurden zunächst Embryonen der Stadien E18,5, E13,5, E12,5 und E11,5. Zwischen Tag 18,5 und Tag 11,5 der Embryonalentwicklung konnten keine Auffälligkeiten bezüglich des äußeren Erscheinungsbilds und des Entwicklungsstadiums festgestellt werden. Als einzige Besonderheit konnte eine eher kleine bis mittlere Anzahl von Embryonen pro Wurf beobachtet werden, was darauf hindeutete, dass homozygote PHGPx-Knock-out-Embryonen bereits abgestorben und vollständig resorbiert waren. Die präparierten Embryonen wurden mittels PCR genotypisiert, wodurch sich zeigte, dass tatsächlich keine PHGPx-Knock-out-Tiere zwischen Tag 18,5 bis 11,5 der Embryonalentwicklung nachzuweisen waren (Daten nicht gezeigt). Bei der Isolierung von Uteri mit Embryonen am Tag 9,5 der Embryonalentwicklung konnten bereits bei äußerlicher Betrachtung deutlich kleinere, sich in Resorption befindende Plazentome beobachtet werden. Da sich die Resorptionen schon in einem weit fortgeschrittenen Stadium befanden, konnten keine für die Genotypisierung verwendbaren embryonalen Anteile mehr isoliert werden. Die übrigen Embryonen wurden genotypisiert, es waren allerdings keine homozygoten PHGPx-Knock-out-Embryonen darunter.

Bei Präparationen von Embryonen im Gestationsstadium E8,5 war der makroskopische Unterschied bezüglich der Größe der einzelnen Plazentome nicht mehr so deutlich ausgeprägt. Nach dem Öffnen der Uteruswand und des Deciduums fiel allerdings sofort auf, dass sich auch hier pro Uterus durchschnittlich zwei bis drei Embryonen bereits in Resorption befanden. Im Gegensatz zum späteren Entwicklungsstadium E9,5 konnten hier aus einigen dieser Resorptionen noch einige embryonale Gewebestücke isoliert und daraus intakte DNA präpariert werden. Bei der Genotypisierung zeigte sich schließlich, dass es sich bei diesen Resorptionen tatsächlich um homozygote PHGPx-Knock-out-Embryonen handelte (Tab. 8). Auch bei der Analyse von Embryonen im Entwicklungsstadium E7,5 konnten homozygote PHGPx-Knock-out-Embryonen genotypisiert werden.

**Tabelle 8: Übersicht über die mittels PCR ermittelten Genotypen von Embryonen hemizygoter Elterntiere im Embryonalstadium E7,5 bis E9,5**

Embryonaltag p.c.	Anzahl der Decidua	Genotyp +/+	Genotyp +/-	Genotyp -/-	Anzahl der Resorptionen
7,5	9	2	5	2	0
7,5	11	4	5	1	1
8,5	11	1	6	4	0
8,5	8	2	5	0	1
8,5	9	2	1	4	2
8,5	12	2	8	0	2
8,5	9	1	5	0	3
9,5	6	1	1	0	4
9,5	4	1	1	0	2

### **4.3 Histologische Analysen der PHGPx-Knock-out-Embryonen**

Aufgrund der Tatsache, dass PHGPx-Knock-out-Embryonen ab Tag 8,5 resorbiert werden, konzentrierte sich die weitere Analyse auf Embryonen in den Entwicklungsstadien E6,0 bis E8,5. Es war schwierig, ganze Embryonen in diesen frühen Gestationsstadien zu präparieren, und die pathologisch veränderten Embryonen waren zudem sehr fragil. Die Embryonen wurden deshalb im

histologischen Schnitt analysiert. Hierzu wurden Uteri der Stadien E6,5 bis E8,5 p.c. komplett entnommen, die einzelnen Decidua aus den Uteri isoliert und die Decidua inklusive der Embryonen im Ganzen fixiert. Die einzelnen Decidua wurden in sagittaler Orientierung in Paraffin ausgegossen und in Serie geschnitten. Es wurde darauf geachtet, dass alle Embryonen histologisch vollständig erfasst wurden. Jeder fünfte Serienschnitt wurde anschließend zur Übersicht mit HE gefärbt und die Embryonen individuell lichtmikroskopisch evaluiert. Es wurden sowohl Würfe analysiert, die aus hemizygoten Verpaarungen entstanden, deren Elterntiere noch PHGPx-Allele mit Neo-Kassette enthielten (Embryonen im Folgenden als „PDa“ bezeichnet), als auch Würfe, deren Elterntiere bereits ein Neo-deletiertes Allel trugen (Embryonen im Folgenden als „PFDa“ bezeichnet).

**Tabelle 9: Übersicht über die histologisch untersuchten Würfe aus hemizygoten Verpaarungen**

	Embryonal- tag p.c.	Anzahl der Decidua	Anzahl morphologisch unauffälliger Embryonen	Anzahl morphologisch auffälliger Embryonen	Anzahl der Resorptionen
PDa182-191	8,5	10	8	0	2
PFDa1-7	8,5	7	5	0	2
PFDa8-17	8,5	8	4	0	4
PDa328-337	8,0	10	6	2	2
PDa196-206	7,5	11	7	2	2
PDa207-215	7,5	9	5	2	2
PDa318-327	7,5	10	7	3	0
PDa338-347	7,5	10	7	3	0
PDa348-357	7,5	10	7	3	0
PDa358-366	7,5	9	6	3	0
PDa367-373	7,5	7	5	1	1
PDa374-383	7,5	10	6	2	2
PFDa4-12	7,5	9	6	2	1
PFDa13-20	7,5	8	6	1	1
PFDa21-30	7,5	10	8	2	0
PFDa31-39	7,5	9	7	1	1
PDa308-317	7,0	10	8	0	2
PDa238-245	6,5	8	7	0	1
PDa246-254	6,5	9	8	0	1

Bei Würfen bis Tag 7,0 der Embryonalentwicklung zeigten die Embryonen histologisch keine morphologischen Auffälligkeiten; in den Stadien E7,5 und E8,5 waren pro Wurf 1 bis 3 Embryonen mit Entwicklungsstörungen vorhanden (Tab. 9). Nachdem bei Würfen nach Tag 8,5 keine missgebildeten Embryonen mehr erkennbar waren, jedoch eine erhöhte Anzahl an Resorptionen, wurde vermutet, dass es sich bei den entwicklungsgestörten Embryonen am Tag 7,5 um PHGPx-Knock-out-Embryonen handelte, die sich zu späteren Zeitpunkten bereits in Resorption befanden.

Bei der genaueren Betrachtung der PHGPx-Knock-out-Embryonen war zunächst offensichtlich, dass alle drei Keimblätter immer ausgebildet waren. Somit war die Gastrulation inklusive der Differenzierung zu mesodermalen Zellen durch die fehlende PHGPx nicht beeinträchtigt. Ebenso war die für die Gastrulation typische Unterteilung der Fruchtanlage in drei Kompartimente (Embryonal-, Exozölon- und Ektoplazentarhöhle) durch Amnion und Chorion bei den Knock-out-Embryonen größtenteils erkennbar. Dottersack, Reichertsche Membran und Allantoisanlage waren ebenfalls vorhanden. Die im Wildtyp-Embryo zu beobachtende Ausbildung der Neuralwülste, die im Anschluss an die Gastrulation durch sehr rasche Proliferation von Zellen im kranialen Bereich des Embryos erfolgt, war bei keinem der untersuchten PHGPx-Knock-out-Embryonen zu erkennen. An Stelle der Entwicklung der Neuralwülste waren bei diesen Embryonen unterschiedlich stark ausgeprägte Missbildungen des Ektoderms und des Mesoderms sowohl im embryonalen als auch im extraembryonalen Bereich der Fruchtanlage zu beobachten. Beispiele hierfür sind exemplarisch anhand der beiden Uteri mit den Embryonen PDa196 bis PDa206 und PFDa4 bis PFDa12 dargestellt (Abb. 7 und Abb. 8).

Bei einem Knock-out-Embryo war die typische Kompartimentierung durch Amnion und Chorion gut ausgebildet, die extraembryonalen Anteile zeigten keine Auffälligkeiten. Dagegen entsprang aus dem kranialen Bereich des Embryos eine kompakte Zellmasse ektodermalen Ursprungs, die nahezu die gesamte Embryonalhöhle ausfüllte (Abb. 7C und 7D (PDa200)).

Bei einem weiteren Knock-out-Embryo des gleichen Wurfes war die Missbildung noch wesentlich ausgeprägter (Abb. 7E und 7F (PDa204)). Wiederum war die Unterteilung in embryonale und extraembryonale Anteile ausgebildet, Amnion und Chorion waren dagegen kaum noch zu erkennen. Die Embryonalhöhle war durch massiv vermehrte ektodermale und mesodermale Anteile wiederum fast vollständig

ausgefüllt. Extraembryonal waren vor allem die mesodermalen Anteile so stark vermehrt, dass diese weit in die Exozölmhöhle hineinreichten und die Ektoplazentarröhle sogar nahezu ausfüllten. Aufgrund dieser ausgeprägten Missbildungen war bei diesem Embryo eine Unterscheidung von anterior und posterior nicht möglich. Als Zeichen beginnender Resorption waren die sich in der Embryonal- und Ektoplazentarröhle befindenden Ansammlungen von kernlosen Erythrozyten zu interpretieren. Dabei handelte es sich um mütterliche Blutzellen, da Embryonen dieses Entwicklungsstadiums lediglich wenige, kernhaltige Erythrozyten im Bereich der Allantois ausgebildet haben.

Um zu verifizieren, ob es sich bei diesen Embryonen tatsächlich um PHGPx-Knock-out-Embryonen und nicht um natürlich auftretende Resorptionen handelte, wurde deren Genotyp bestimmt. Hierzu wurden von mehreren histologischen Schnitten eines Embryos Gewebestücke entnommen und gepoolt, DNA isoliert und mittels PCR der jeweilige Genotyp ermittelt. Dabei konnte gezeigt werden, dass es sich bei den oben beschriebenen Embryonen tatsächlich um PHGPx-defiziente Embryonen handelt (Daten nicht gezeigt).

Bei der Untersuchung der Wurfgeschwister PFDa4 bis 12 (E7,5) erwiesen sich drei Embryonen als morphologisch stark auffällig (Abb. 8). Der Embryo PFDa4 zeigte eine wiederum massive ektodermale Zellmasse am kranialen Pol des Embryos, die sich in die Embryonalhöhle vorwölbte (Abb. 8A,B). Zusätzlich waren die mesodermalen Anteile im extraembryonalen Bereich, hier vor allem des Chorions, wiederum extrem vermehrt und durchzogen sowohl die Exozölmhöhle als auch die Ektoplazentarröhle. Zwei weitere Embryonen (PFDa7 und 11) befanden sich bereits in einem fortgeschrittenen Stadium der Resorption (Abb. 8C-F). Diese Embryonen besaßen eine kompakte Gestalt, die einzelnen Kompartimente waren kollabiert und die Differenzierung in embryonal und extraembryonal war kaum mehr möglich.

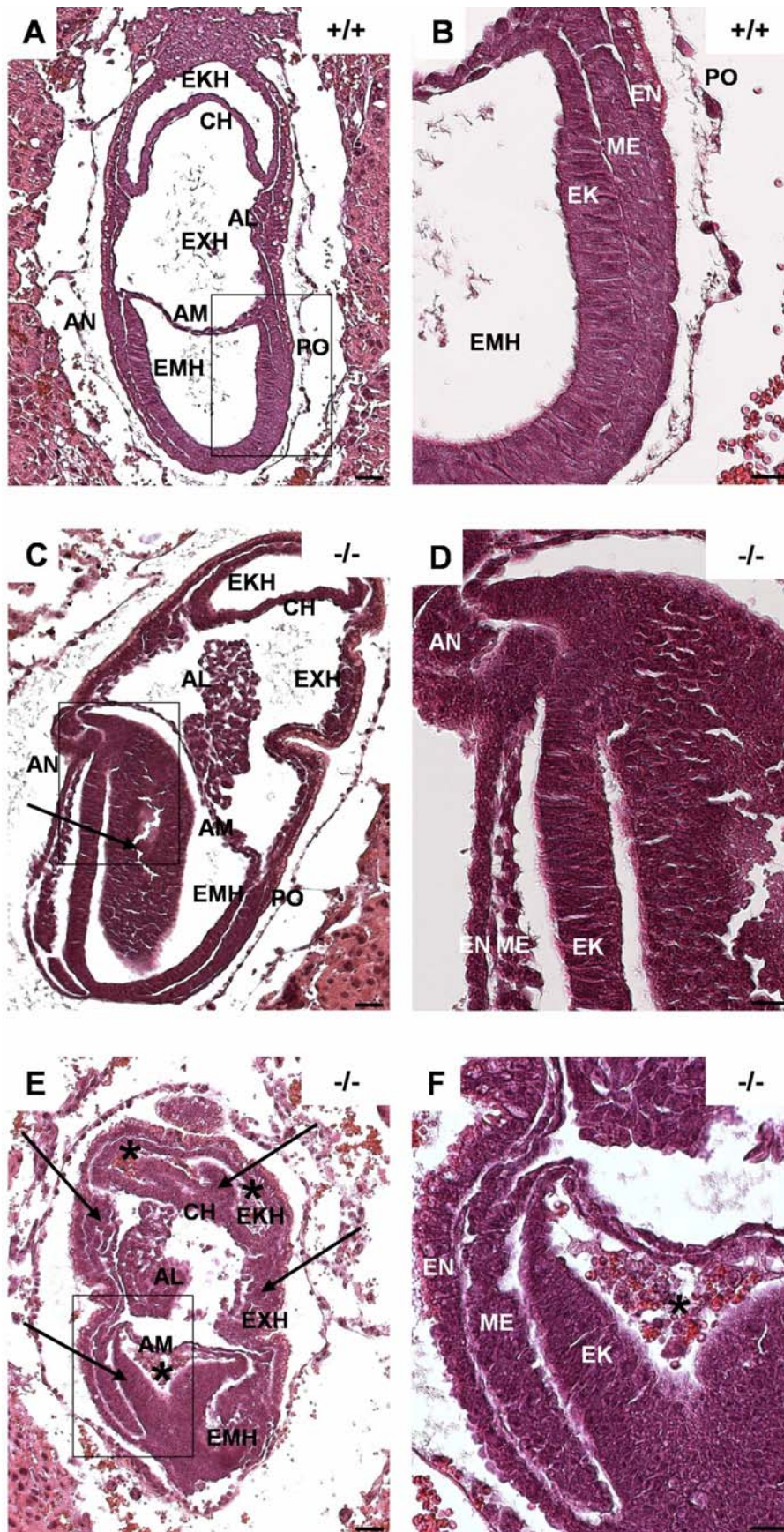


Abbildung 7: Histologie der Embryonen PDa198, PDa200 und PDa204 im Entwicklungsstadium E7,5 (HE-Färbung) (Beschreibung siehe Folgeseite)

**Abbildung 7: Histologie der Embryonen PDa198, PDa200 und PDa204 im Entwicklungsstadium E7,5 (HE-Färbung)**

In (A) ist ein normal entwickelter Wildtyp-Embryo im Stadium E7,5 dargestellt (PDa198).

Die Fruchtanlage ist durch Amnion und Chorion in drei Kompartimente (Ekto-plazentarhöhle, Exozölo-mhöhle und Embryonalhöhle) unterteilt. Durch die Ausbildung des Allantoisstiels, die immer von posterior erfolgt, kann die Ausrichtung des Embryos festgelegt werden.

(B) Bei stärkerer Vergrößerung des in (A) durch das Rechteck gekennzeichneten Bereichs sind die drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Endoderm) gut zu erkennen.

(C) Bei diesem Knock-out-Embryo (PDa200) ist deutlich die massive Zellmasse am anterioren Pol des Embryos zu erkennen, die weit in die Embryonalhöhle hinreicht (siehe Pfeil).

(D) In der höheren Vergrößerung des anterioren Pols (in (C) durch das Rechteck gekennzeichnet) ist zu sehen, dass die drei unterschiedlichen Zellschichten nicht mehr so eng aneinander liegen im Vergleich zum Wildtyp. Die Zellmasse, die sich in die Embryonalhöhle vorwölbt, ist vermutlich ektodermalen Ursprungs, da sie mit dem Ektoderm in direkter Verbindung steht.

(E) Bei diesem Knock-out-Embryo (PDa204) ist die anterior-posteriore Achse nicht mehr erkennbar. Hier sind sowohl Ektoderm als auch Mesoderm im embryonalen und extraembryonalen Teil stark vermehrt, so dass die Zellmassen weit in die Embryonal-, Exozölo-m-, und Ekto-plazentarhöhle hinreichen (durch Pfeile hervorgehoben). Erkennbar sind zudem kernlose (maternale) Erythrozyten in der Embryonal- und Ekto-plazentarhöhle (durch Sternchen markiert) als Zeichen beginnender Resorption.

(F) Höhere Vergrößerung des in (E) durch das Rechteck gekennzeichneten Bereichs der Embryonalhöhle. Deutlich zu erkennen sind die in die Embryonalhöhle hineinreichenden Zellmassen und die in der Embryonalhöhle vorhandenen Erythrozyten (durch das Sternchen hervorgehoben).

Abk.: AL = Allantois, AM = Amnion, AN = anterior, CH = Chorion, EK = Ektoderm, EKH = Ekto-plazentarhöhle, EMH = Embryonalhöhle, EN = Endoderm, EXH = Exozölo-mhöhle, ME = Mesoderm, PO = posterior

Längenbalken: 7A,C,E 200 µm; 7B,D,F 50 µm



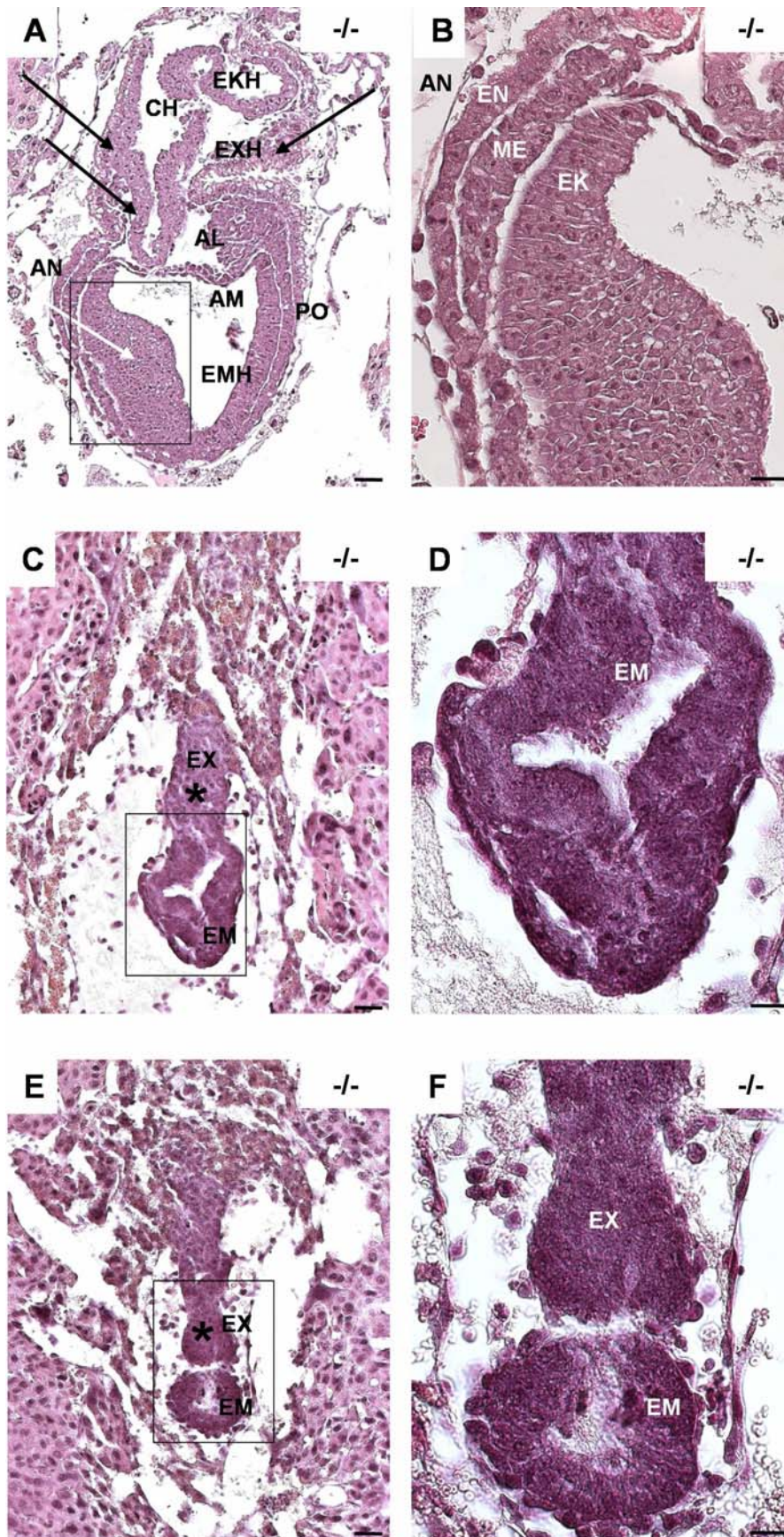


Abbildung 8: Histologie der Embryonen PFDa4, PFDa7 und PFDa11 im Entwicklungsstadium E7,5 (HE-Färbung) (Beschreibung siehe Folgeseite)

**Abbildung 8: Histologie der Embryonen PFDa4, PFDa7 und PFDa11 (HE-Färbung)**

(A) Bei diesem Knock-out-Embryo (PFDa4) ist eine Proliferation im kranialen Bereich des Embryos zu erkennen, die weit in die Embryonalhöhle hineinreicht und auch hier dem Ektoderm zuzuordnen ist (weißer Pfeil). Im extraembryonalen Bereich sind zudem mesodermale und ektodermale Anteile stark vergrößert, die in die Exozölon- und Ektoplazentarhöhle sowohl von anterior als auch von posterior hineinreichen (schwarze Pfeile).

(B) Höhere Vergrößerung des stark vergrößerten Ektoderms im vorderen Bereich des Embryos (Bereich in (A) durch das Rechteck markiert).

(C) und (E) Diese Knock-out-Embryonen (PFDa7 und PFDa11) sind bereits stärker missgebildet. Die Dreiteilung der Fruchtanlage ist nahezu vollständig verloren, die einzelnen Kompartimente sind kollabiert und die Zellen können keinem Keimblatt zugeordnet werden. Eine Unterteilung in embryonal und extraembryonal ist nur noch ansatzweise möglich. Der kollabierte extraembryonale Bereich ist durch das Sternchen hervorgehoben.

(D) Höhere Vergrößerung des kollabierten embryonalen Bereichs des Embryos PFDa7 (in (C) durch das Rechteck gekennzeichnet).

(F) Höhere Vergrößerung des kollabierten embryonalen und extraembryonalen Bereichs des Embryos PFDa11 (in (E) durch das Rechteck hervorgehoben).

Abk.: AL = Allantois, AM = Amnion, AN = anterior, CH = Chorion, EK = Ektoderm, EKH = Ektoplazentarhöhle, EM = embryonaler Bereich, EMH = Embryonalhöhle, EN = Endoderm, EX = extraembryonaler Bereich, EXH = Exozölonhöhle, ME = Mesoderm, PO = posterior

Längenskalen: 7A,C,E 200 µm; 7B,D,F 50 µm

In allen untersuchten Uteri am Tag 7,5 der Embryonalentwicklung konnten Embryonen gefunden werden, die den oben beschriebenen Embryonen glichen.

Zusammenfassend zeigten die histologischen Befunde der PHGPx-Knock-out-Embryonen, dass die Entwicklung des Mausembryos ohne PHGPx bis zur Ausbildung des dritten Keimblatts in der Gastrulation normal verläuft, es anschließend aber durch Proliferations- und/oder Differenzierungsstörungen ektodermalen und mesodermalen Gewebes, jeweils unterschiedlicher starker Ausprägung, kommt, was letztendlich zum Absterben dieser Embryonen mit anschließender Resorption führt.

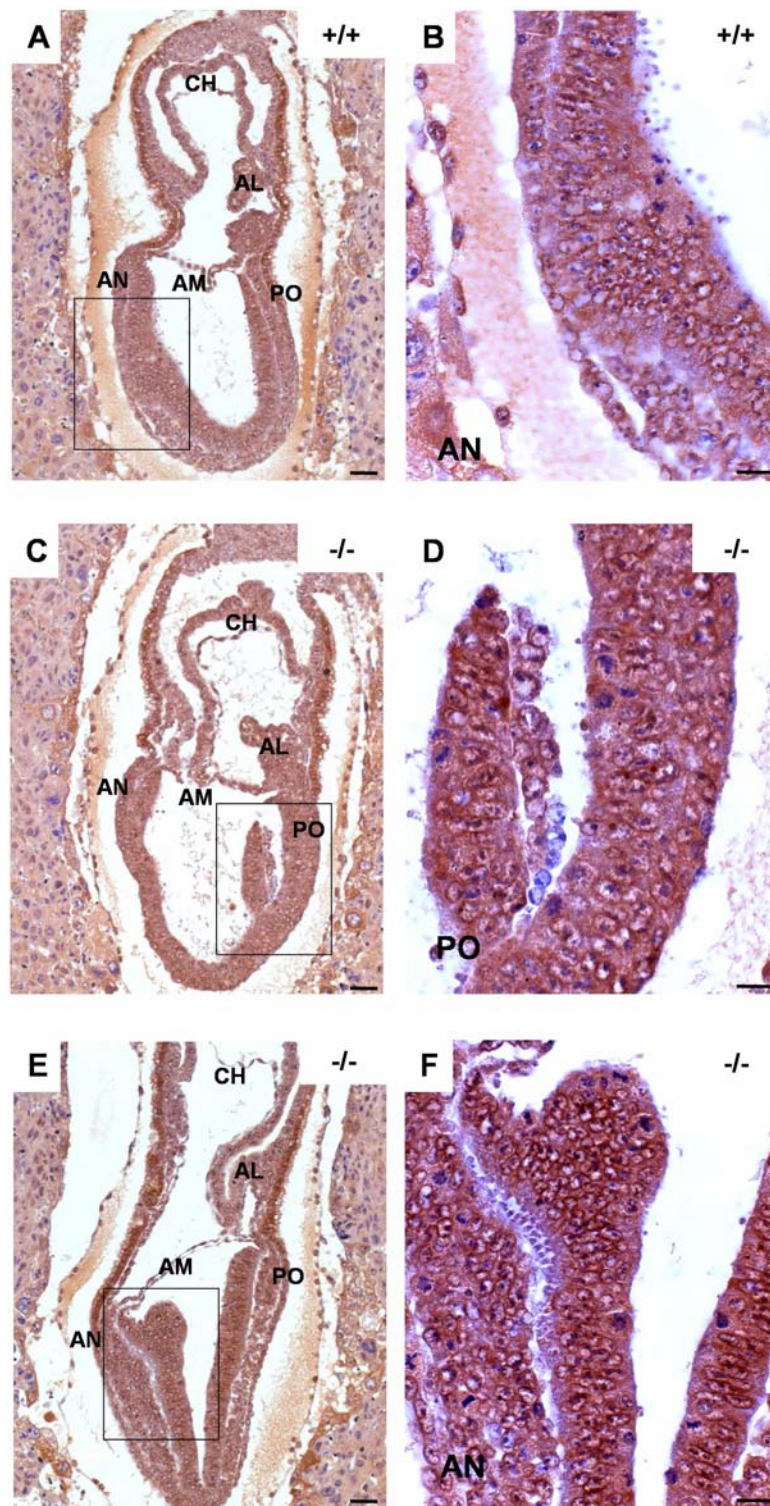
#### **4.4 Immunhistochemische Untersuchung der PHGPx-Knock-out-Embryonen**

Um zu untersuchen, ob eine veränderte Proliferation zu dem in der HE-Färbung beobachteten Phänotyp führte, wurden immunhistochemische Analysen für den Marker PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) durchgeführt.

PCNA ist eine Komponente der DNA-Replikationsmaschinerie und fungiert als Hilfsprotein der DNA-Polymerase  $\delta$  (Kelman, 1997). Abhängig von dem Zellzyklusstadium ist PCNA in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten lokalisiert. Zellen in der G0-Phase zeigen keine Expression. In der G1-Phase und S-Phase ist PCNA im Zellkern, in der G2-Phase im Zellkern und Zytoplasma und in der M-Phase im Zytoplasma lokalisiert (Foley et al., 1993). Somit kann dieser Marker dazu benutzt werden, um festzustellen, in welchem Zellzyklus-Stadium sich die Zellen befinden.

Bei der Analyse der immunhistochemischen Darstellung von PCNA zeigten Wildtyp- (Abb. 9A,B) und PHGPx-Knock-out-Embryonen (Abb. 9C-F) im Vergleich eine nahezu identische subzelluläre Verteilung von PCNA. Daraus kann geschlossen werden, dass sich die Proliferationsrate zwischen Wildtyp- und Knock-out-Embryonen nicht signifikant unterschied. Weiterführende Analysen mittels Proliferationsmarkern wie beispielsweise Anti-Phosphohiston H3, Ki67 oder BrdU-Inkorporation sind erforderlich, um detaillierte Aussagen hinsichtlich der Proliferation treffen zu können.





**Abbildung 9: Immunhistochemische Darstellung des Proliferationsmarkers PCNA**

Es konnten keine gravierenden Unterschiede in der subzellulären Verteilung von PCNA (braune Färbung) zwischen den Wildtyp- (9A,B) und den PHGPx-Knock-out-Embryonen (9C-F) festgestellt werden. Die links durch die Rechtecke hervorgehobenen Bereiche sind rechts jeweils vergrößert dargestellt. Gegenfärbung: Hämatoxylin

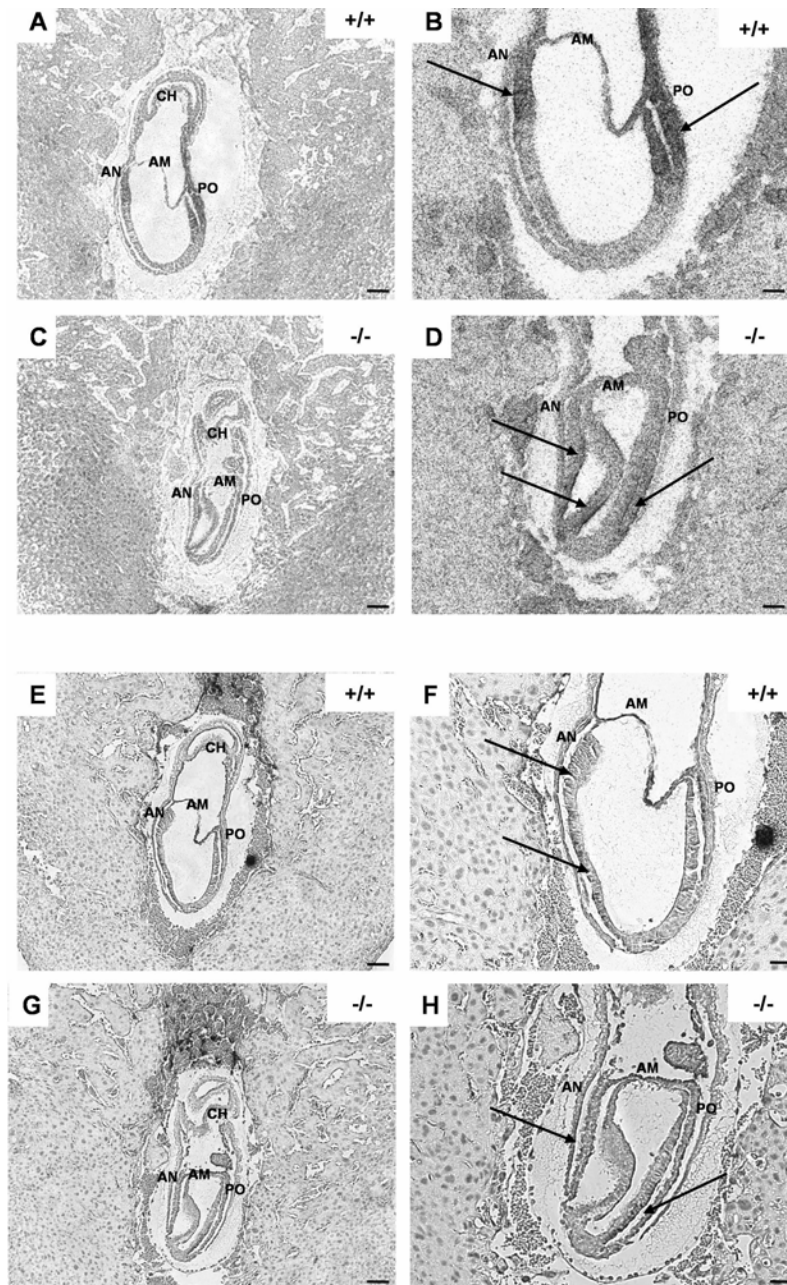
Abk.: AL = Allantois, AM = Amnion, AN = anterior, CH = Chorion, EN = Endoderm, PO = posterior  
Längenbalken: 7A,C,E 200 µm; 7B,D,F 50 µm

#### **4.5 Untersuchung der Expression früher Neurulationsmarker**

Die beobachteten Missbildungen im anterioren Bereich der PHGPx-Knock-out-Embryonen weisen möglicherweise auf eine gestörte Neurulation hin. Deshalb wurde mittels In-Situ-Hybridisierung das Expressionsmuster einiger für die Neurulation essenzieller Gene in den PHGPx-Knock-out-Embryonen analysiert. Untersucht wurden *Lim1*, *Otx2*, *Gbx2*, *Hesx1* und *Lefty2*, die ab dem Stadium der Gastrulation (E7,5) in den ektodermalen Strukturen sowie im anterioren viszeralem Endoderm im vorderen Bereich des Mausembryos exprimiert sind und die Proliferation und Zelldifferenzierung zu Beginn der Neurulation regulieren. Eine Expression dieser Gene konnte in den PHGPx-Knock-out-Embryonen zwar nachgewiesen werden, allerdings zeigten sich deutliche Unterschiede im Expressionsmuster zwischen Wildtyp- und Knock-out-Embryonen. Auffällig war, dass diese Neurulationsmarker, die in Wildtyp-Embryonen in diesem Stadium normalerweise nicht, bzw. nicht mehr, im Primitivstreifen exprimiert sind, in Knock-out-Embryonen dort noch vorhanden waren (Abb. 10). Somit konnte eine klare Verschiebung in der zeitlichen Abfolge der Expression, sichtbar an einer Verlagerung der Genexpression von anterior nach posterior, nachgewiesen werden.

In Abbildung 10 ist exemplarisch die Expression für *Lefty2* und *Otx2* dargestellt; die Daten für *Gbx2*, *Lim1* und *Hesx1* sind nicht gezeigt.

Die Befunde der In-Situ-Hybridisierung zeigten folglich, dass die Expression für die Neurulation essenzieller Gene sich in den PHGPx-Embryonen von der in Wildtypen wesentlich unterscheidet. Die Ergebnisse lassen allerdings keinen Schluss darüber zu, ob die beobachteten Unterschiede primär durch den Funktionsverlust der PHGPx bedingt sind oder einen Sekundäreffekt der gravierenden Missbildungen im Kopfbereich von Knock-out-Embryonen darstellen.



**Abbildung 10: Expression der Neurulationsmarker Lefty2 (A-D) und Otx2 (E-H) in Wildtyp- (A,B,E,F) und PHGPx-Knock-out- Embryonen (C,D,G,H)**

Eine Expression stellt sich bei der In-Situ-Hybridisierung im Hellfeld in Form von schwarzen Punkten dar und ist durch Pfeile hervorgehoben. Links ist jeweils der Konzeptus in der Übersicht und rechts die jeweilige Vergrößerung des embryonalen Bereichs dargestellt.

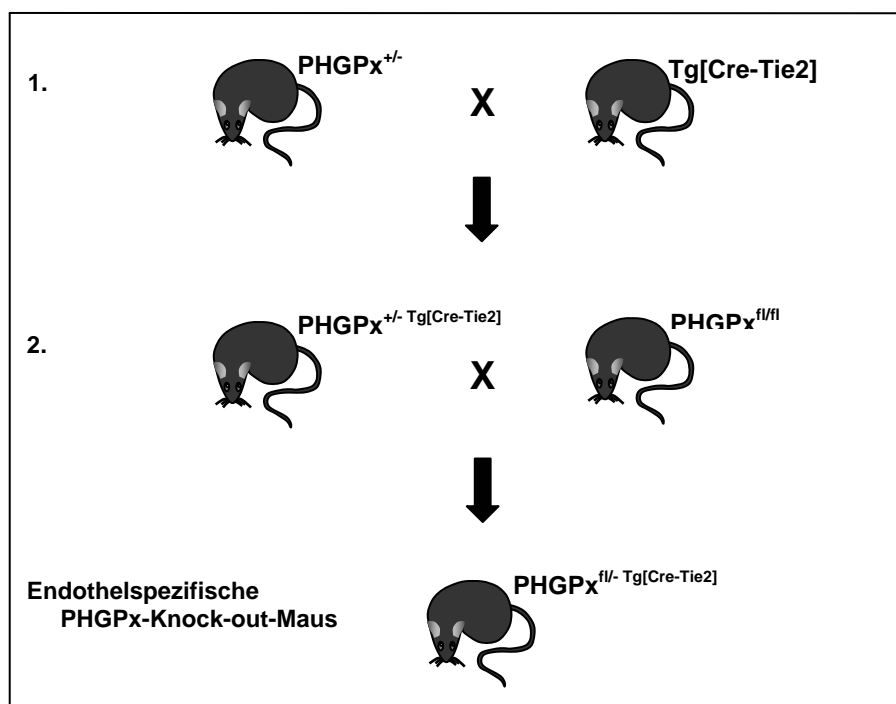
(A-D) Der Wildtyp-Embryo (A,B) zeigt eine deutliche Expression für Lefty2 sowohl im vorderen Bereich als auch hinteren Bereich des Embryos, aber keine zusätzliche Expression im Primitivstreifen selbst, wie sie im PHGPx-Knock-out-Embryo (C,D) zu sehen ist.

(E-H) Auch für Otx2 zeigt der Wildtyp-Embryo (E,F) eine charakteristische Expression im Kopfbereich. Beim Knock-out-Embryo (G,H) ist neben der Otx2-Expression im vorderen Bereich eine zusätzliche Expression im Primitivstreifen zu erkennen.

Längsbalken: A,C,E,G 400 µm; B,D,F,H 200 µm

#### 4.6 Zucht und Analyse endothelspezifischer PHGPx-Knock-out-Mäuse

Die PHGPx ist in der Lage, effizient HDL- und LDL- (High- bzw. Low Density Lipoprotein) assoziierte Phospholipidhydroperoxide zu detoxifizieren (Sattler et al., 1994). Diese spielen möglicherweise bei der Initiation von atherosklerotischen Läsionen eine bedeutende Rolle (Steinberg, 1997). Zudem konnte *in vitro* gezeigt werden, dass endotheliale Zellen, die PHGPx überexprimieren, weniger anfällig gegenüber oxidativem Stress sind (Brigelius-Flohe et al., 1997). Es ist aber nicht bekannt, ob die PHGPx auch *in vivo* eine Schutzfunktion des Endothels übernimmt. Um dies zu untersuchen, sollte die PHGPx spezifisch im Endothel deletiert werden, was durch Verpaaren von konditionalen PHGPx-Knock-out-Mäusen mit Tie2-Cre-exprimierenden Mäusen erreicht werden sollte (Abb. 11).



**Abbildung 11: Zuchtschema für endothelspezifische PHGPx-Knock-out-Mäuse**

Für die Zucht von gewebespezifischen Knock-out-Mäusen sind zwei Generationen erforderlich. In der ersten Generation werden hemizygoter PHGPx-Knock-out-Tiere ( $PHGPx^{+/-}$ ) mit Tie2-Cre-transgenen Mäusen [ $Tg-Tie2-Cre$ ] verpaart. Dadurch erhält man zunächst Tiere, die hemizygot für PHGPx und zusätzlich Tie2-Cre-transgen ( $PHGPx^{+/-[Tg-Tie2-Cre]}$ ) sind. In der zweiten Generation werden diese Tiere mit homozygot geflochtenen PHGPx-Mäusen ( $PHGPx^{fl/fl}$ ) verpaart, wodurch statistisch 25% der Nachkommen den gewünschten Genotyp  $PHGPx^{fl/-[Tg-Tie2-Cre]}$  aufweisen sollten. Diese Mäuse sind hemizygot für PHGPx und weisen zusätzlich in den Endothelien und den hämatopoetischen Zellen einen homozygoten PHGPx-Knock-out auf.





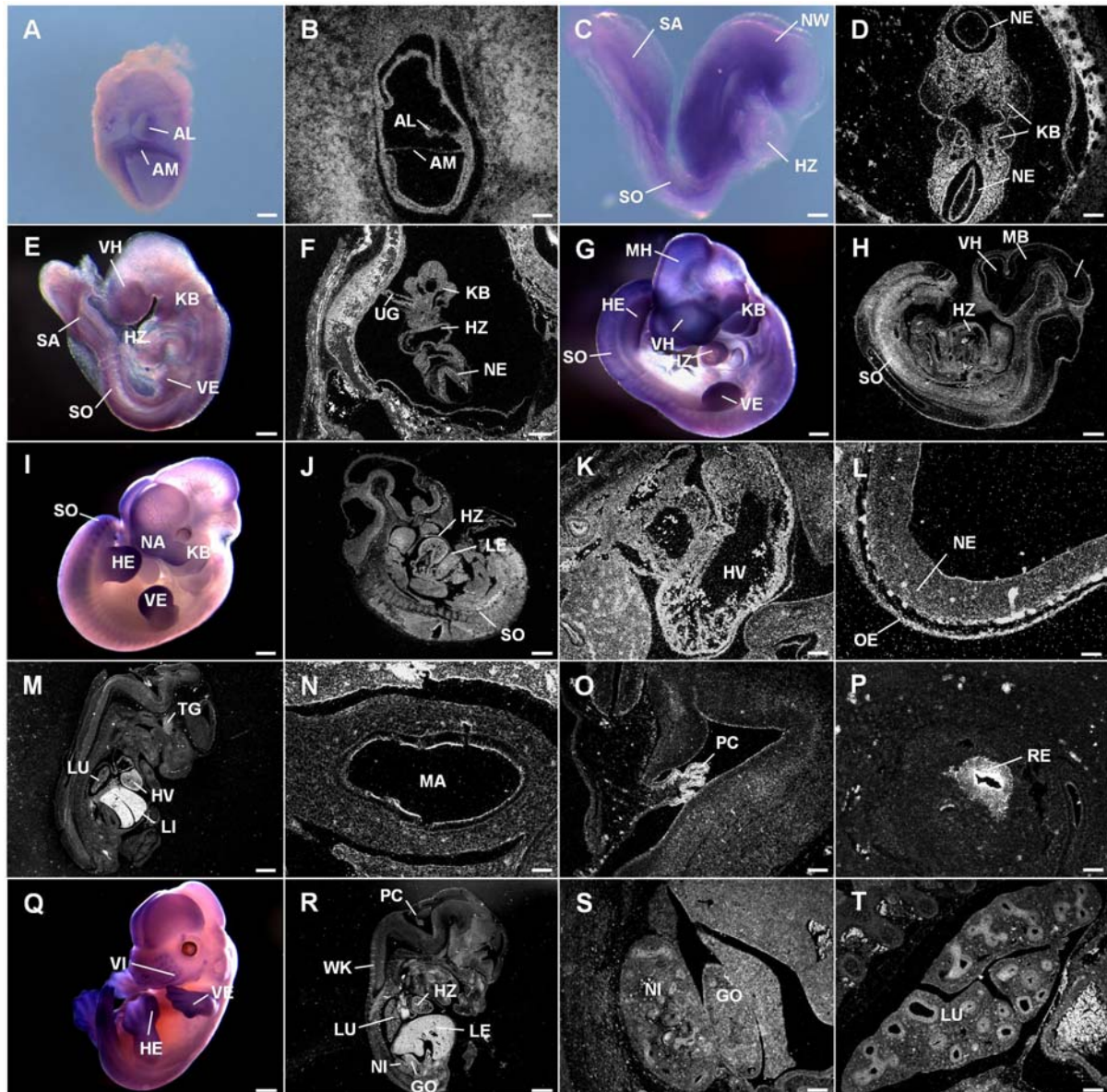
Auch wenn die Wurfgröße mit durchschnittlich 3 bis 4 Tieren pro Wurf deutlich unter dem für die C57BL/6J-Inzuchtlinie üblichen Wert (8-10 Tiere pro Wurf) lag, war die Verteilung der möglichen Genotypen in deren Häufigkeit (12,3% bis 17,0%) relativ ausgeglichen, mit der Ausnahme, dass auch hier keine PHGPx endothelspezifischen Knock-out-Mäuse geboren wurden. Die geringe Verschiebung in der Häufigkeit der einzelnen Genotypen wies wiederum auf embryonale Letalität der endothelspezifischen PHGPx-Knock-out-Tiere hin. Auch hier stellte sich wiederum die Frage, zu welchem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung diese Knock-out-Tiere sterben. Die ersten endothelialen und hämatopoetischen Vorläuferzellen bilden sich zum Zeitpunkt der Gastrulation (E7,5) im extraembryonalen Mesoderm. Im weiteren Verlauf entwickeln sich erste Gefäße und der primitive Herzschlauch aus und ein geschlossenes Blutkreislaufsystem ist um Tag 9,0 der Embryonalentwicklung vorhanden. Deswegen wurde dieser Zeitraum für eine weitere Analyse endothelspezifischer PHGPx-Knock-out-Mäuse gewählt. Hierfür wurden für PHGPx hemizygot, Tie2-Cre-transgene Mäuse (PHGPx<sup>+/-[Tg-Tie2-Cre]</sup>) mit PHGPx-gefloxten Mäusen (PHGPx<sup>fl/fl</sup>) gezielt verpaart und die Embryonen zu verschiedenen Zeitpunkten (E8,5 bis E9,5) präpariert. Insgesamt wurden 37 Embryonen aus 5 unterschiedlichen Würfen untersucht. Bei der Präparation der Embryonen fiel besonders auf, dass das Entwicklungsstadium einzelner Embryonen innerhalb eines Wurfes stark variierte. Das heißt, innerhalb eines Wurfes zum Zeitpunkt 9.0 Tage p.c. konnten Embryonen gefunden werden, die sich beispielsweise erst in einem E8,0 oder gar E7,75 entsprechenden Entwicklungsstadium befanden. Eine Varianz von 12 Stunden in der Entwicklung einzelner Embryonen innerhalb eines Wurfes wird als physiologisch angegeben (Kaufman, 1992). Ebenso war auffällig, dass die Zahl der Resorptionen (3 bis 4 pro Wurf) erhöht war. Die dissezierten Embryonen wurden anschließend genotypisiert, wobei sich überraschenderweise zeigte, dass die beobachtete Entwicklungsretardation unabhängig vom jeweiligen Genotyp des Embryos war. Infolge dieser Beobachtungen wurde entschieden, die Zucht und weitere Analyse abubrechen. Denn aufgrund dieser Variation der Embryonen in ihrer Entwicklung innerhalb eines Wurfes erschien es unmöglich, den eigentlichen Phänotyp der endothelspezifischen und hämatopoesespezifischen PHGPx-Knock-out-Embryonen zu analysieren.

#### **4.7 Embryonales Expressionsmuster der PHGPx**

Die frühe Letalität der PHGPx-Knock-out-Embryonen zeigte, dass die PHGPx eine essenzielle Funktion bereits zu Beginn der Embryonalentwicklung übernimmt. Aufgrund dieses Befunds sollte die Erstellung eines embryonalen Expressionsprofils Aufschluss darüber geben, in welchen Geweben die PHGPx exprimiert wird und bei welchen Organen bzw. Organsystemen sie in der weiteren Embryonalentwicklung beteiligt ist.

Das Expressionsmuster wurde durch In-Situ-Hybridisierungen mit PHGPx RNA-*antisense*-Sonden zum einem mit ganzen Embryonen (*whole mount*) in den Entwicklungsstadien E7,5 bis E13,5 (Abb. 12A,C,E,G,I,P) und zum anderem auf Paraffinschnitten von Embryonen in den Stadien von E7,5 bis E18,5 (Abb. 12B,D,F,H,J-O,Q-S) analysiert. Es wurden zwei verschiedene PHGPx-Sonden verwendet: eine Sonde, die der Gesamtlänge der PHGPx mRNA entspricht und eine zweite, die den 5' Bereich der PHGPx mRNA abdeckt. Als Positivkontrolle für die PHGPx-Expression wurden Paraffinschnitte von Hodengewebe, in dem die PHGPx bekanntermaßen sehr hoch exprimiert ist, benutzt. Als Negativkontrolle wurden für beide Proben die komplementären PHGPx RNA-*sense*-Sonden zur Hybridisierung verwendet, die in den Geweben kein Signal ergeben dürfen.

Als frühestes Stadium wurde E7,5 ausgewählt, der Zeitpunkt, an dem die PHGPx-Knock-out-Embryonen absterben. Hier war von besonderem Interesse, in welchem der drei Keimblätter die PHGPx exprimiert war. Sowohl die *whole mount*-In-Situ-Hybridisierung (Abb. 12A) als auch die Hybridisierung auf Schnitten (Abb. 12B) zeigte, dass die PHGPx ubiquitär in allen embryonalen und extraembryonalen Anteilen, ekto-, meso-, und endodermaler Herkunft, exprimiert war. Ebenso konnte ein starkes Signal im umgebenden Deciduum beobachtet werden, wohingegen in der Reichertschen Membran keine Expression vorlag. In den folgenden Stadien E8,5 (Abb. 12C,D) und E9,5 (Abb. 12E,F) war die PHGPx nahezu in allen Strukturen exprimiert. Eine verstärkte Expression konnte in den Neuralwülsten, im sich entwickelnden neuralen Gewebe entlang der gesamten Achse des Embryos und in den Somiten beobachtet werden. Auch die sich zu diesem Zeitpunkt entwickelnden Kiemenbögen, insbesondere der maxillare und mandibulare Anteil des ersten Kiemenbogens, sowie Ohrplakode und optisches Vesikel zeigten ein intensives Signal.



**Abbildung 12: PHGPx-Expressionsstudie der Embryonalstadien E7,5 bis E13,5 *whole mount* (A,C,E,G,I,Q) und auf sagittalen Paraffinschnitten (B,D,F,H,J-P,R-T)**

Eine Expression stellt sich in den *whole mount*-Embryonen als blauviolette Färbung und auf den Paraffinschnitten im Dunkelfeld als weiße Punkte dar.

(A,B) Zum Zeitpunkt E7,5 kann eine PHGPx-Expression in allen embryonalen und extraembryonalen Geweben nachgewiesen werden.

(C,D) Im Stadium E8,5 ist die stärkste Expression im Neuroektoderm, in den Neuralwülsten, in den Kiemenbögen, in den Somiten, in der Schwanzanlage und in den mesenchymalen Geweben zu beobachten.

(E,F) Im Stadium E9,5 zeigt sich starke PHGPx-Expression im Vorderhirn, in den Kiemenbögen, im primitiven Herzschlauch, in den vorderen Extremitätenanlagen, in den Somiten und im Neuroepithel.

(G,H) Die Embryonen zum Zeitpunkt E10,5 exprimieren PHGPx stark in Vorder- und Mittelhirn, in den Kiemenbögen, im Herzen, in den Somiten und in den vorderen und hinteren Extremitätenanlagen.

**Abbildung 12: PHGPx-Expressionsstudie der Embryonalstadien E7,5 bis E13,5 whole mount (A,C,E,G,I,Q) und auf sagittalen Paraffinschnitten (B,D,F,H,J-P,R-T) (Fortsetzung)**

(I,J) Am Tag 11,5 der Embryonalentwicklung ist die stärkste Expression in der Nasenanlage, in den Kiemenbögen, im Herzen, in der Leberanlage, in allen neuronalen Geweben, im distalen Bereich der Extremitätenanlagen und in den Somiten im kaudalen Bereich des Embryos zu beobachten.

(K,L) Höhere Vergrößerungen aus (J), dargestellt ist die starke PHGPx-Expression im kardialen Gewebe (K) und im Neuro- und Oberflächenektoderm des Kopfbereichs (L).

(M) Im Stadium E12,5 ist die PHGPx-Expression in der Leber, im Herzventrikel, in der Lunge und in den neuronalen Geweben am stärksten.

(N-P) Höhere Vergrößerungen aus (M): Magen (N), Plexus choroideus (O) und olfaktorisches Epithel (P).

(Q,R) Im Stadium E13,5 ist die stärkste Expression in den Vibrissen, in der vorderen und hinteren Extremitätenplatte, im hinteren Schwanzbereich, im Herzen, in der Leber, in der Lunge, in den Nieren und Gonaden, in den Wirbelkörpern, im Plexus choroideus und in den neuronalen Geweben zu sehen.

(S,T) Höhere Vergrößerungen aus (R): Niere und Gonade (S) und Lunge (T), wo eine starke Expression im Epithel der Bronchien zu beobachten ist.

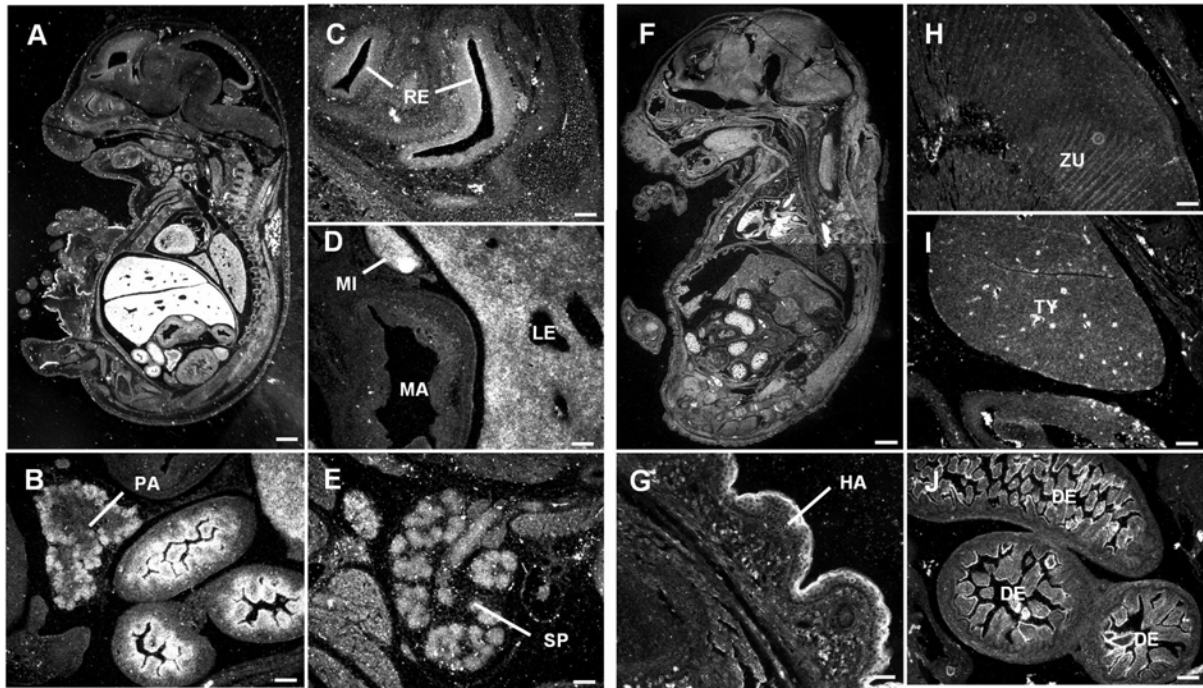
Abk.: AL = Allantois, AM = Amnion, GO = Gonade, HZ = Herz, HE = hintere Extremität, HV = Herzventrikel, KB = Kiemenbogen, LE = Leber, LU = Lunge, MA = Magen, MH = Mittelhirn, NA = Nasenanlage, NE = Neuroektoderm, NH = Nachhirn, NI = Niere, NW = Neuralwülste, OE = Oberflächenektoderm, PC = Plexus choroideus, RE = Riechepithel, SA = Schwanzanlage, SO = Somiten, TG = Trigeminalganglion, UG = Umbilikalgefäß, VE = vordere Extremität, VH = Vorderhirn, VI = Vibrissen, WK = Wirbelkörper

Längenbalken: Q,R 800 µm; M 600 µm; I,J 500 µm; H 400 µm; G,F 300 µm; E 200 µm; C 125 µm; A,B,D,K,L,N,O,P,S,T 100 µm; L 50 µm

In den mesenchymalen Strukturen und in der primitiven Herzanlage konnte ebenfalls PHGPx-Expression nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung zu den Zeitpunkten E10,5 (Abb. 12G,H) und E11,5 (Abb. 12I-L) zeigte sich in der *whole mount*-In-Situ-Hybridisierung eine starke Expression der PHGPx im Vorderhirnbereich, im sich entwickelnden Auge, in den Kiemenbögen, in den Somiten der Schwanzregion, in allen neuronalen Geweben, sowie in den Extremitätenanlagen. Auf den Schnitten konnte zusätzlich eine deutliche Expression im Herzen und in der Leberanlage beobachtet werden, wohingegen die Expression im primitiven Darm schwach war. In den Stadien E12,5 (Abb. 12M-P) und E13,5 (Abb. 12Q-T) blieb die Expression in den Geweben entsprechend den vorgenannten Stadien E10,5 bzw. E11,5 erhalten, zusätzlich war eine sehr starke PHGPx Expression im Plexus chorioideus des vierten Ventrikels und im olfaktorischen Epithel zu erkennen. Ebenso war die PHGPx bei diesen Entwicklungsstadien auch in den Epithelien des Magens und der Lungenbronchien exprimiert. Ein schwächeres Signal konnte auch in den Gonaden und den Urnieren beobachtet werden.

Bei Embryonen, die älter als E13,5 sind, ist eine *whole mount*-In-Situ-Hybridisierung aufgrund der langen Diffusionswege nicht mehr möglich. Deswegen wurden die Expressionsstudien ab diesem Stadium nur noch auf Schnitten durchgeführt. Zum Zeitpunkt E15.5 (Abb. 13A-E) war die PHGPx auch weiterhin in den neuralen Geweben exprimiert, wobei die Expression nun im Bereich des zerebralen Kortex und im Riechepithel am stärksten war. Zusätzlich war eine starke Expression in den Organen Lunge, Herz, Milz und vor allem in der Leber zu beobachten. Im Gastrointestinaltrakt war die PHGPx in der Zunge, in den submandibulären Speicheldrüsen, im Pankreas und in den Epithelien des Magens und nun auch des Darmes hoch exprimiert. Schwächere Expression zeigte sich in den Nebennieren, in den Nieren sowie in den Gonaden. Ebenso konnte eine basale PHGPx Expression in den Rippen und Wirbelkörpern, die sich zu diesem Stadien in der Ossifikation befinden, beobachtet werden.

Im Entwicklungsstadium E18,5 (Abb. 13F-J), also kurz vor der Geburt, änderte sich das Expressionsmuster der PHGPx nicht mehr wesentlich. Allerdings konnte zusätzlich ein starkes Signal im Thymus und in der sich entwickelnden Haut nachgewiesen werden. Auffällig war ebenfalls, dass die PHGPx nun in der Leber deutlich schwächer exprimiert war im Vergleich zur starken Expression in den früheren Stadien.



**Abbildung 13: PHGPx-Expression zu den Embryonalstadien E15,5 und E18,5 auf sagittalen Paraffinschnitten**

Eine Expression stellt sich auf den Paraffinschnitten im Dunkelfeld als weiße Punkte dar.

(A) Zum Zeitpunkt E15,5 ist die PHGPx am stärksten in der Leber, der Lunge, im Herzen, in der Milz, im Pankreas, im Darmepithel, in den Nieren und Nebennieren, in den Wirbelkörpern und im Sternum, im olfaktorischen Epithel, in den Speicheldrüsen und in den neuronalen Geweben exprimiert.

(B-E) Höhere Vergrößerungen aus (A) zeigen die starke Expression im Pankreas (B), im olfaktorischen Epithel (C), in Leber und Milz (D) und in den Speicheldrüsen (E).

(F) Im Stadium E18,5 ist eine starke Expression in der Lunge, im Herzen, im Thymus, im Darmepithel, in der Zunge, in den neuronalen Geweben und in der sich entwickelnden Haut zu sehen. Die PHGPx-Expression in der Leber ist zum Zeitpunkt E18,5 deutlich schwächer als in den früheren Entwicklungsstadien.

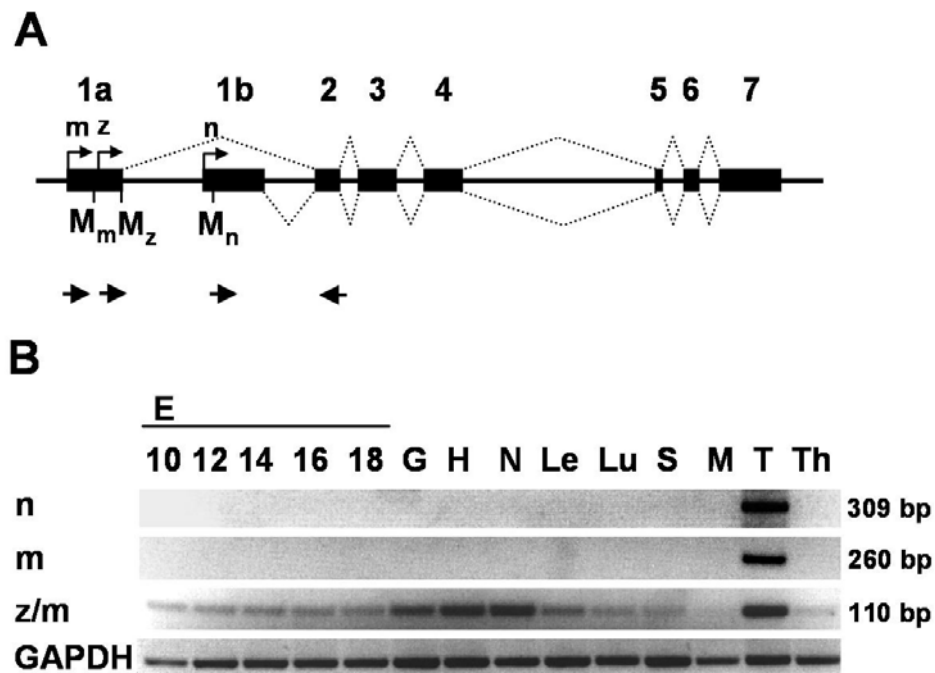
(G-J) Höhere Vergrößerungen aus (F): Haut (G), Zunge (H), Thymus (I) und Darmepithel (J).

Abk.: DE = Darmepithel, HA = Haut, LE = Leber, MA = Magen, MI = Milz, PA = Pankreas, RE = Riechepithel, SP = Speicheldrüsen, TY = Thymus, ZU = Zunge

Längsbalken: A 1000  $\mu\text{m}$ ; F 800  $\mu\text{m}$ ; C,D,E,I,J 100  $\mu\text{m}$ ; B, G 50  $\mu\text{m}$

#### **4.8 Semiquantitative RT-PCR-Analyse**

Das embryonale Expressionsmuster deutete darauf hin, dass die PHGPx höchstwahrscheinlich eine wesentliche Funktion bei der Entwicklung nahezu aller Organsysteme spielt. Deshalb war interessant aufzuklären, welche der drei unterschiedlichen Formen der PHGPx, die zytosolische, die mitochondriale oder die nukleäre Form, während der Embryonalentwicklung exprimiert wird und somit für den embryonal letalen Phänotyp verantwortlich ist. Aus den beiden in der In-Situ-Hybridisierung verwendeten Proben konnten hierauf keine Rückschlüsse gezogen werden, da diese nicht spezifisch für die einzelnen Formen waren. Deswegen sollte mittels semiquantitativer RT-PCR diese Frage geklärt werden. Hierzu wurde zunächst aus Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien und aus verschiedenen adulten Geweben von Wildtyp-Mäusen RNA gewonnen und diese dann in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Ausgehend von diesen cDNA's wurde die semiquantitative PCR-Analyse mithilfe von Primerpaaren, die spezifisch die einzelnen Formen detektieren können, durchgeführt (Abb. 14). Für die nukleäre (spermienkern-spezifische) Form wurde ein Vorwärtsprimer gewählt, der spezifisch am alternativen Exon (auch als Exon 1b bezeichnet) bindet. Die mitochondriale Form unterscheidet sich von der zytosolischen nur in einer Verlängerung im 5'-Bereich der mRNA, wodurch zwar Primer spezifisch für die mitochondriale, aber nicht für die zytosolische Form generiert werden können. Zusätzlich wurde noch ein Primerpaar verwendet, das sowohl die mitochondriale als auch die zytosolische Form der PHGPx detektiert. Untersucht wurde die Expression der unterschiedlichen Formen in Embryonen der Entwicklungsstadien E10, E12, E14, E16 und E18 p.c. sowie in den Geweben Gehirn, Herz, Niere, Leber, Lunge, Skelettmuskulatur, Milz, Hoden und Thymus aus adulten Mäusen. Die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR zeigten deutlich, dass sowohl die spermienkern-spezifische als auch die mitochondriale Form der PHGPx ausschließlich in Hodengewebe exprimiert wurden, wohingegen die zytosolische Form in allen Geweben und Embryonalstadien vorhanden war. Somit war klar, dass die zytosolische Form, diejenige ist, die eine essenzielle Funktion während der Embryonalentwicklung und vermutlich auch in vielen anderen Geweben und Organen erfüllt.



**Abbildung 14: Anordnung der in der RT-PCR-Analyse verwendeten Primerpaare relativ zum murinen PHGPx-Gen und Expressionsanalyse der einzelnen PHGPx-Formen**

(A) Die punktierten Verbindungslinien stellen das Spleißen der mitochondrialen und zytosolischen (Linien oben), sowie der nukleären (Linien unten) Form der PHGPx dar. Die Initiationsstellen für Transkription und Translation der mitochondrialen (m), der zytosolischen (z) und der nukleären Form (n) sind durch abgeknickte Pfeile respektive mit M gekennzeichnet. Die Pfeile unterhalb geben die Lage der für die semiquantitative RT-PCR verwendeten Primer an.

(B) Die Semiquantitative RT-PCR-Analyse zeigt, dass sowohl die mitochondriale als auch die nukleäre Form der PHGPx nur im Hoden exprimiert war, wohingegen die zytosolische Form in allen untersuchenden Embryonalstadien und Geweben nachzuweisen war. GAPDH diente als Positivkontrolle.

Abk.: E = Embryonaltag, G = Gehirn, H = Herz, N = Niere, Le = Leber, Lu = Lunge, S = Skelettmuskel, M = Milz, T = Testis, Th = Thymus



## **5. Diskussion**

### **5.1 Phänotypisierung von PHGPx-defizienten Mäusen**

Bei der Zucht PHGPx-defizienter Mäuse stellte sich heraus, dass homozygote PHGPx-Knock-out-Mäuse nicht lebensfähig sind und bereits sehr früh in der Embryonalentwicklung sterben. Hemizygoten PHGPx-Knock-out-Mäuse hingegen zeigen keinerlei klinische Auffälligkeiten und haben eine normale, den Wildtyp-Mäusen entsprechende Lebenserwartung. Somit reicht ein funktionelles PHGPx-Allel für das Überleben aus.

Im Laufe dieser Arbeit wurde von zwei anderen Arbeitsgruppen der Phänotyp von PHGPx-Knock-out-Mäusen publiziert (Imai et al., 2003; Yant et al., 2003).

Yant und Mitarbeiter (Yant et al., 2003) generierten Mäuse, denen die Exons 1b bis 7 des PHGPx-Gens fehlten. Homozygote Knock-out-Mäuse starben zum Zeitpunkt E7,5 der Embryonalentwicklung. Sie beschrieben retardierte Embryonen mit primitiven ekto-, endo- und mesodermalen Strukturen, eine vergrößerte Reichertsche Membran und fehlende Unterteilung in die drei für gastrulierende Embryonen typischen Kompartimente. Zusätzliche Untersuchungen für Anzeichen einer verminderten Zellproliferation oder einer erhöhten DNA-Fragmentation ergaben keine markanten Unterschiede im Vergleich zu den Wurfgeschwistern. Imai und Mitarbeiter (Imai et al., 2003) hingegen deletierten alle Exons des PHGPx-Gens. Auch diese Knock-out-Embryonen waren, wie bei Yant und seinen Mitarbeitern, zum gleichen Zeitpunkt embryonal letal und zeigten einen nahezu identischen Phänotyp. Ihre Untersuchungen zeigten jedoch eine erhöhte DNA-Fragmentation im distalen Bereich der homozygoten PHGPx-Knock-out-Embryonen zum Zeitpunkt E7,5, nicht aber zum Zeitpunkt E7,0. Die Ursache für die embryonale Letalität der PHGPx-Embryonen wurde in diesen Arbeiten nicht ermittelt.

Wie auch unsere Analysen zeigten, starben die homozygoten PHGPx-Knock-out-Embryonen am Tag 7,5 der Embryonalentwicklung, nach Ausbildung des dritten Keimblattes und zu Beginn der Neurulation. Die Differenzierung in die drei Keimblätter Ekto-, Endo- und Mesoderm und die Aufteilung der Fruchtanlage in die drei Kompartimente Embryonal-, Exozölon- und Ektoplazentarhöhle waren vom PHGPx-Knock-out nicht betroffen. Bis zum Zeitpunkt E7,0 waren keine morphologischen Auffälligkeiten zu beobachten, allerdings bereits am Tag 8,0 der

Embryonalentwicklung waren die homozygoten PHGPx-Knock-out-Embryonen weitestgehend resorbiert. Bei den PHGPx-Knock-out-Embryonen konnte zum einen ein massiv vermehrtes extraembryonales Mesoderm und zum anderen eine fehlerhafte Entwicklung der Neuralwülste, die sich in einer Hyperplasie der anterioren Region des Embryos äußerte, beobachtet werden. Die PHGPx-Knock-out-Embryonen waren somit in der Lage, die komplexen Differenzierungsvorgänge während der Gastrulation zu vollziehen. Damit wird im Embryo der Körperbauplan festgelegt. Durch die Umwandlung aus dem einfachen Epithel des Epiblasten, bestehend nur aus rund 800 Zellen, in einen mehrschichtigen Konzeptus wird ersichtlich, dass die Reorganisation und Ausbildung neuer Gewebe eine komplexe und koordinierte Kombination aus Morphogenese, Proliferation und Zelldifferenzierung zugrunde liegt. Infolge der Übergänge epithelialer zu mesodermalen Strukturen wird der Primitivstreifen ausgebildet, der sich dann von posterior zum distalen Pol des Embryos hin ausdehnt, und dadurch die embryonale Körperachse festlegt. Entlang der Achse des Primitivstreifens von anterior zu posterior sind die mesodermalen Vorläufer spezifisch angeordnet: aus der posterioren Region des Primitivstreifens entwickelt sich das extraembryonale Mesoderm, die Zellen der mesodermalen Herzanlage und des Kopfmesenchyms entstehen aus der mittleren Region und aus der anterioren Region bildet sich axiales und paraxiales Mesoderm aus (Rossant, 2002).

Die in den PHGPx-Knock-out-Embryonen beobachtete massive ekto- und mesodermale Hyperplasie im vorderen Bereich des Embryos, wo sich eigentlich zu diesem Zeitpunkt die Neuralwülste entwickeln sollten, weist auf eine gestörte Neurulation hin. Der reguläre Ablauf der Neurulation wird bereits mit der Ausbildung des Primitivstreifens eingeleitet. Im vordersten Bereich des Primitivstreifens bildet sich um Zeitpunkt E7,5 eine besondere Struktur aus, der so genannte Primitivknoten, der aus etwa 20 Zellen besteht und dem eine bedeutende Rolle während der Organisation zukommt (Beddington, 1994). Nach Explantation des Primitivknotens wird lediglich die hintere Körperregion formiert, und es werden keine Kopfstrukturen ausgebildet (Tam und Steiner, 1999). Ein ähnlicher Phänotyp konnte mittels knock-out einiger im Primitivstreifen spezifisch exprimierter Gene in Mäusen induziert werden, was beispielsweise für den Transkriptionsfaktor *Foxa2* oder für das zur Wnt-Familie gehörende Signalmolekül *Wnt3* gezeigt wurde (Behringer et al., 2000; Perea-Gomez et al., 1999). Dadurch konnte gezeigt werden, dass der murine Primitivknoten

für den ungestörten Ablauf der Neurulation notwendig ist. Neben dem Primitivknoten hat das so genannte vordere viszerale Endoderm (*anterior visceral endoderm*, AVE) ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die Zelldifferenzierung und Zellmigration während der Neurulation (Thomas et al., 1997; Weber et al., 1999). Das AVE exprimiert unter anderem einige für die anteriore Neurulation unerlässliche Faktoren, wie die Transkriptionsfaktoren Lim1 und Otx2, deren Expression bei der Analyse der PHGPx-Knock-out-Embryonen untersucht wurde. Ein Fehlen des AVE führt ebenfalls zum vollständigen Verlust anteriorer Marker des Epiblasten (Perea-Gomez et al., 2002; Waldrip et al., 1998). Anhand weiterführender *in vitro*-Studien zeigten weitere Arbeiten, dass sich nur dann anteriore Kopfstrukturen bildeten, wenn Anteile des AVE und des Primitivknoten kokultiviert wurden, nicht jedoch, wenn beide Anteile isoliert kultiviert wurden (Klingensmith et al., 1999; Thomas und Beddington, 1996). Dies spricht eindeutig dafür, dass der korrekte Ablauf der frühen Hirnentwicklung auf synergistischen Effekten zwischen Primitivstreifen und AVE beruht. Diese Effekte konnten durch Studien mit chimären Embryonen für die in dieser Arbeit verwendeten Neurulationsmarker Otx2 (Rhinn et al., 1998), Lim1 (Shawlot et al., 1999) und Hesx1 (Hermesz et al., 1996; Martinez-Barbera et al., 2000) gezeigt werden. Andere sowohl im AVE als auch Primitivstreifen exprimierte Faktoren induzieren die Gehirnentwicklung dadurch, dass sie Gene reprimieren, die für die posteriore Entwicklung essenziell sind. Beispiele hierfür sind Cerberus, Lefty2 und Dickkopf1 (Glinka et al., 1998; Meno et al., 1996; Oulad-Abdelghani et al., 1998). Lefty2-defiziente Embryonen zeigten einen vergrößerten Primitivstreifen und eine verstärkte mesodermale Entwicklung (Meno et al., 1996), weswegen auch Lefty2 als Marker für die Analyse der PHGPx-Knock-out-Embryonen verwendet wurde.

Aus diesen Arbeiten wird ersichtlich, dass für eine regulär ablaufende, frühe Gehirnentwicklung nicht nur einzelne Gene wichtig sind, sondern viel mehr die zeitliche und räumliche Koordination der Gesamtheit der Faktoren und sezernierten Proteine aus Primitivstreifen und AVE. Störungen in der Feinregulierung dieser einzelnen Faktoren könnten zu dem in den PHGPx-Knock-out-Embryonen beobachteten Phänotyp führen. Erste In-Situ-Hybridisierungs-Experimente mit Sonden für einzelne der genannten Kandidatengene zeigten, dass die entsprechenden Gene exprimiert werden, wobei jedoch deren Lokalisation bei PHGPx-Knock-out-Embryonen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen nicht anterior, sondern weiter posterior im Primitivstreifen zu finden war. Diese Ergebnisse

sprechen dafür, dass PHGPx neben seiner Rolle als Antioxidans möglicherweise noch eine weitere Funktion, nämlich in der Regulation von Zellproliferation und Signaltransduktion innehat.

Es stellt sich allerdings die Frage, ob die Unterschiede in der Genexpression primäre Ereignisse darstellen, die zu den morphologischen Abnormalitäten in den Knock-out-Embryonen führen, oder sekundär bedingt sind durch die Hyperplasie des embryonalen und extraembryonalen Mesoderms. Während der Gastrulation kommt es zu einem massiv gesteigerten Wachstum und zu einem hohen Maß an Zelldifferenzierung (Snow, 1977). Die durchschnittliche Zellzyklusdauer reduziert sich von 11,5 Stunden am Tag 5,5 auf 4,4 Stunden am Tag 6,5 der Embryonalentwicklung. Die neu gebildeten mesodermalen Zellen teilen sich schließlich alle 8 bis 10 Stunden. Die Zellzahl steigt von geschätzten 120 Zellen zum Zeitpunkt E5,5 auf 660 zum Zeitpunkt E6,5 und 8060 Zellen zum Zeitpunkt E7,5. Das zelluläre Volumen steigt innerhalb kurzer Zeit auf das 14-fache. Um diese Teilungsrate und somit die massive Größenzunahme des gesamten Embryos gewährleisten zu können, werden hohe energetische und biosynthetische Anforderungen an den Embryo gestellt. Dies wird dadurch deutlich, dass die Zellen des Epiblasten sensitiver gegenüber metabolischen Inhibitoren sind (Rowinski et al., 1975). Es wurde zudem gezeigt, dass der Epiblast im Gegensatz zum Trophoblasten sehr viel anfälliger ist gegenüber Röntgen- oder UV-Strahlung (Matsui et al., 1996). Die extrem hohe Mitoserate während der Gastrulation erfordert ebenfalls gut funktionierende Systeme zur Zellzyklus-Kontrolle und Genom-stabilisierung, sowie DNA-Reparatur-Mechanismen. Sind diese Systeme nicht oder nicht ausreichend vorhanden, kommt es zur Verlangsamung oder gar zum Stillstand des Zellzyklus und somit zum Entwicklungsstillstand. Dies konnte in murinen Knock-out-Modellen der DNA-Reparatur-Gene *Xrcc1* und *Rad51*, sowie der Tumor-Suppressor-Gene *Brca1* und *Brca2* beobachtet werden (Hakem et al., 1996; Lim and Hasty, 1996; Suzuki et al., 1997; Tebbs et al., 1999), deren defiziente Knock-out-Embryonen ebenfalls sehr früh letal sind. Auch Cyclin A2 Knock-out-Embryonen sterben kurz nach der Implantation (Murphy et al., 1997). Diese Embryonen zeigen jedoch durchweg eine verminderte Proliferationsrate, was bei den PHGPx-Knock-out-Embryonen nicht der Fall ist.

Auch der embryonale Metabolismus selbst unterliegt zwischen Implantation und Gastrulation einem Wandel. Für Mausembryonen, wie auch für Embryonen anderer

Säugetiere, wurde gezeigt, dass der Glukosemetabolismus während dieser Phase der Entwicklung variiert. In der Präimplantationsperiode wechselt der murine Embryo vom aeroben Glukosemetabolismus zunächst zur anaeroben Glykolyse (Gardner und Leese, 1986). Nach der Implantation erfolgt anschließend die langsame Umstellung zurück auf den aeroben Glukosemetabolismus. So konnte mittels *in vitro*-Studien gezeigt werden, dass Embryonen kurz nach der Implantation Glukose nahezu vollständig zu Laktat verstoffwechseln (Kelly und West, 1996). Des Weiteren konnte ein gradueller Anstieg des oxidativen Glukosemetabolismus in den folgenden Tagen der Postimplantationsphase beobachtet werden (Clough und Whittingham, 1983). Ob diese Beobachtungen allerdings für die *in vivo*-Situation relevant sind, muss noch geklärt werden. Houghton und Mitarbeiter konnten erste Hinweise liefern, dass Embryonen im Postimplantationsstadium Sauerstoff verbrauchen (Houghton et al., 1996). Dass der aerobe Glukosemetabolismus bereits zum Zeitpunkt der Gastrulation notwendig ist, konnte durch Dld-defiziente Mausmutanten gezeigt werden, die bereits während der Gastrulation sterben (Johnson et al., 1997). Das Dld-Gen kodiert für die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase, eine Oxidoreduktase, welche eine katalytische Funktion in Multienzymkomplexen im Intermediärstoffwechsel innehat. Die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase katalysiert eine Teilreaktion im Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (Tsai et al., 1973). Der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex ist essenziell für den aeroben Glukosemetabolismus, indem er das in der Glykolyse entstandene Pyruvat vor der Einschleusung in den Zitratzyklus in Acetyl-CoA umwandelt. Diese Reaktion und damit der oxidative Glukose-Abbau kann in Dld-defizienten Embryonen nicht mehr durchgeführt werden, was für den Embryo eine Restriktion auf die anaerobe Glykolyse zur Energiegewinnung bedeutet. Dadurch stehen Dld-defizienten Embryonen nur 5% des möglichen ATPs zur Verfügung, was offensichtlich für das massiv gesteigerte Wachstum während der Gastrulation nicht mehr ausreicht. Somit ist der oxidative Glukosekatabolismus tatsächlich ab dem Stadium der Gastrulation für die Embryonalentwicklung von wesentlicher Bedeutung. Dies würde aber auch bedeuten, dass ab diesem Stadium eine stark vermehrte physiologische Bildung von freien Sauerstoffradikalen als Nebenprodukt der Atmungskette stattfindet. Da die PHGPx als Teil des Glutathion/Glutathion-Peroxidase-Systems zur Detoxifizierung freier Sauerstoffradikale beiträgt, könnte dies auch eine massive Auswirkung auf den Phänotyp der PHGPx-Knock-out-Embryonen haben. Interessanterweise ähnelt der

Phänotyp von  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase ( $\gamma$ -GCS)-Knock-out Embryonen stark dem der PHGPx-Knock-out-Embryonen (Shi et al., 2000). Die  $\gamma$ -GCS katalysiert den ersten limitierenden Schritt in der Glutathionsynthese. Glutathion ist das am häufigsten vorkommende zelluläre Reduktionsäquivalent, das beispielsweise auch von der cGPx und der PHGPx als Substrat verwendet wird. Homozygote  $\gamma$ -GCS-defiziente Mäuse starben ebenfalls um den Zeitpunkt E7,5 und waren morphologisch stark auffällig. Die Embryonen sind in ihrer Entwicklung ebenfalls retardiert, bilden im Gegensatz zu den PHGPx-Knock-out-Embryonen aber keine mesodermalen Zellen, weder im embryonalen, noch im extraembryonalen Bereich aus. Zusätzlich wurden vermehrt apoptotische Zellen im distalen Bereich des Embryos nachgewiesen.

Dass der antioxidative Status bereits während der Embryonalentwicklung eine Rolle spielt, konnte bei Ratten beobachtet werden, die mit einer Vitamin E-Mangel-Diät ernährt wurden und bei denen in der Folge eine hohe Rate früher embryonaler Letalität auftrat. Vitamin E ist ein bekanntes Antioxidans, das Membranen vor Lipidperoxidation schützt. Vitamin E-Mangel führt bei Menschen zu Ataxien. Ein klinisch ähnliches Bild zeigt sich bei der Friedreich-Ataxie, einer rezessiven Erbkrankheit des Menschen, die durch eine Punktmutation im Frda-Gen ausgelöst wird. Das Genprodukt Frataxin ist in den mitochondrialen Eisenmetabolismus involviert und hat ebenfalls antioxidative Wirkung (Koutnikova et al., 1997). Diese Funktion konnte in Hefen gezeigt werden, wo die Deletion des Fraxatin-Homologs unter anderem in einer höheren Empfindlichkeit der Hefen gegenüber oxidativem Stress, induziert durch Wasserstoffperoxid und Eisen resultierte (Wilson und Roof, 1997). Frda-Knock-out-Mäuse sterben während der Gastrulation (Cossee et al., 2000). Diese Embryonen zeigten massive Apoptose und Nekrose, zunächst in den extraembryonalen Bereichen, später aber auch im Embryo selbst. Ähnlich wie bei den PHGPx-Knock-out-Embryonen, waren aber ektodermale, endodermale und mesodermale Strukturen ausgebildet.

Der Kupfer-Transporter CTR1 ist essenziell für die Kupfer-Aufnahme in Säugetierzellen. Auch die Knock-out-Embryonen des Kupfer-Transporters CTR1 waren während der Gastrulation embryonal letal (Kuo et al., 2001). Kupfer ist integraler Bestandteil einer Vielzahl von antioxidativen Enzymen, wie zum Beispiel der Katalasen und der Kupfer/Zink-Superoxid-Dismutase (Vulpe und Packman, 1995).

Die Beobachtung, dass der Ausfall verschiedener antioxidativ wirkender Enzyme frühe embryonale Letalität induziert, zeigt, dass die Detoxifizierung freier Sauerstoffradikale bereits sehr früh ein überlebenswichtiger Mechanismus ist. Dieser könnte durch eine fehlende funktionelle PHGPx so gravierend gestört sein, dass die Knock-out-Embryonen bereits im Stadium E7,5 sterben.

Die Analysen der endothel-/hämatopoesespezifischen PHGPx-Knock-out-Mäuse scheiterten, da bei der Zucht dieser Tiere eine Entwicklungsretardation, die unabhängig vom jeweiligen Genotyp des Embryos war, auftrat. Die beobachtete Varianz im Entwicklungsstadium der einzelnen Embryonen innerhalb eines Wurfes betrug zum Teil mehr als 48 Stunden. Eine Varianz von 12 Stunden in der Entwicklung einzelner Embryonen innerhalb eines Wurfes wird als physiologisch angegeben (Kaufman, 1992). Auch war die Zahl der Resorptionen (3 bis 4 pro Wurf) erhöht, 1 bis 2 natürliche Resorptionen sind bei einer durchschnittlichen Wurfgröße von 10 Tieren physiologisch (Ward M., 2000).

Aufgrund dieser Varianzen unbekannter Ursache erschien es unmöglich, die Knock-out-Embryonen zu analysieren, da damit zu rechnen war, dass die endothelspezifischen PHGPx-Knock-outs gerade zu den Zeitpunkt E8,5 bis E9,5 abstarben. Unabhängig von den Schwierigkeiten gibt die Tatsache, dass keine PHGPx-endothel-/hämatopoesespezifischen Knock-out-Tiere ( $\text{PHGPx}^{\text{fl/-Tg[Cre-Tie2]}}$ ) geboren wurden, einen starken Hinweis darauf, dass eine Expression der PHGPx in Endothelien und im hämatopoetischen System für die Entwicklung eines Mausembryos essenziell ist.

Um dennoch die Funktion der PHGPx in pathophysiologischen Prozessen der Entzündung und der Atherogenese *in vivo* untersuchen zu können, stehen mittlerweile induzierbare Systeme zur Verfügung. So besteht beispielsweise die Möglichkeit mit einer endothelspezifischen Cre-Linie zu kreuzen, bei der die Cre-Rekombinase zunächst inaktiv ist und erst im adulten Stadium durch Verabreichung tamoxifenhaltigen Futters aktiviert wird (Forde et al., 2002), wodurch in der Folge das betreffende Gen deletiert wird. Auch für die Ausschaltung der PHGPx in hämatopoetischen Zellen steht mit Mx-Cre-transgenen Mäusen ein ähnlich funktionierendes System zur Verfügung. Hierbei wird die Expression der Cre-Rekombinase von einem Promotor reguliert, der natürlicherweise nur bei Virusinfektionen aktiv ist (Kuhn et al., 1995). Durch die Applikation einer Interferon-induzierenden Substanz wird dieser Promotor, und damit die Cre-Rekombinase

aktiviert und es erfolgt die Deletion des Gens, hier hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen und Hepatozyten. Mit diesen Systemen soll in Zukunft die Funktion der PHGPx weiter untersucht werden.

## **5.2 Embryonales Expressionsmuster der PHGPx**

Da die PHGPx-Knock-out-Embryonen kurz nach der Gastrulation und somit sehr früh in der Embryonalentwicklung sterben, kann zwar festgestellt werden, dass die PHGPx eine essenzielle Funktion im Organismus innehat, es können aber keine Aussagen über die Bedeutung der PHGPx in einzelnen Organsystemen getroffen werden.

Deshalb wurden PHGPx-Expressionsstudien vom Zeitpunkt E7,5 bis zum Zeitpunkt E18,5 durchgeführt. Im Stadium E7,5 konnte eine PHGPx-Expression zunächst in allen embryonalen und nichtembryonalen Geweben nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht teilweise im Gegensatz zu den von Imai und Mitarbeitern veröffentlichten Daten (Imai, 2003). Immunhistologische Analysen mit einem PHGPx-Antikörper zeigten dass die PHGPx-Expression ausschließlich auf das embryonale Ektoderm und auf den Dottersack beschränkt war. Diese Diskrepanz kann zum einen durch eine mögliche Regulation der PHGPx auf translationaler Ebene oder zum anderen durch eine niedrigere Sensitivität der verwendeten Nachweismethode begründet sein.

Zusätzlich konnte auch eine hohe PHGPx-Expression im umgebenden maternalen Gewebe gezeigt werden.

Während der weiteren Embryonalentwicklung bis etwa zum Zeitpunkt E11,5 war eine basale PHGPx-Expression in nahezu allen Geweben zu beobachten. Interessanterweise war allerdings in den rasch proliferierenden und differenzierenden Geweben die PHGPx stärker exprimiert, beispielsweise in den Kiemenbögen, in den Gliedmaßenanlagen und besonders in den Somiten. Hier konnte eine Ko-Lokalisation der PHGPx-Expression mit den sich neu bildenden Somiten in den Embryonen festgestellt werden. Später war eine stärkere Expression in den neuronalen Geweben, den Plexus chorioidei, im Herzen, in der Leber, der Lunge, der Milz, den Nebennieren und vor allem in allen Epithelien zu sehen. Besonders



hervorzuheben ist, dass die während der gesamten Embryonalentwicklung bestehende sehr hohe PHGPx-Expression in der Leber zum Geburtszeitpunkt hin schwächer wurde. Die Leber ist während der Embryonalentwicklung das Hauptorgan der Hämatopoese, und erst kurz vor der Geburt wird diese von Knochenmark und Milz übernommen. Diese Beobachtung weist möglicherweise auf eine wichtige Funktion der PHGPx in der Hämatopoese hin. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass auch in der Milz und im Thymus eine relativ hohe PHGPx-Expression beobachtet wurde.

Da für die Etablierung des PHGPx-defizienten Mausmodells eine konditionale Knock-out-Strategie gewählt wurde, kann durch Verwendung gewebespezifisch Cre-exprimierender Mauslinien die *in vivo*-Funktion der PHGPx in bestimmten Organsystemen weiter untersucht werden. Da die Rekombinase Cre in diesen Mauslinien meist schon während der Embryonalentwicklung exprimiert wird, liefert die Erstellung des embryonalen Expressionsmusters der PHGPx in dieser Arbeit wichtige Hinweise darauf, zu welchen Zeitpunkten und in welchen Geweben mit pathologischen Veränderungen zu rechnen ist.

Da die Verwendung der beiden PHGPx-spezifischen RNA-Sonden für die Erstellung des embryonalen Expressionsmusters keine Hinweise darauf lieferte, welche der drei Formen der PHGPx exprimiert ist, wurde die semiquantitative RT-PCR-Analyse durchgeführt. Die Verwendung spezifischer Primerpaare für die drei unterschiedlichen PHGPx-Formen sollte deren Expressionsmuster aufklären helfen. Sowohl die mitochondriale als auch die spermienkern-spezifische Form der PHGPx konnte nur in Hodengewebe nachgewiesen werden. Für die spermienkern-spezifische Form der PHGPx ist dieses Ergebnis nicht überraschend, da für sie eine bedeutende Rolle während der Chromatinkondensation der Spermien postuliert wird (Conrad et al., 2005; Moreno et al., 2003; Pfeifer et al., 2001). Auch für die mitochondriale Form der PHGPx ist dieses Ergebnis wenig überraschend, da gezeigt werden konnte, dass sie überwiegend nur in Hodengewebe exprimiert ist (Pushpa-Rekha et al., 1995). Allein die zytosolische Form der PHGPx ist ubiquitär in somatischen Zellen exprimiert und damit für die embryonale Letalität verantwortlich, da sowohl die mitochondriale und die spermienkern-spezifische Form embryonal nicht exprimiert sind. Dies spielt vor allem auch deswegen eine besondere Rolle, da in vielen Überexpressionstudien nur die mitochondriale Form der PHGPx überexprimiert wurde (Arai et al., 1999; Arai et al., 1996; Hurst et al., 2001; Imai et

al., 1998; Imai et al., 1996; Nomura et al., 1999; Nomura et al., 2000; Wenk et al., 2004). Die Übertragbarkeit der Ergebnisse dieser Arbeiten auf die *in vivo*-Situation wird durch die hier vorgestellten Befunde in Frage gestellt.

## Zusammenfassung

### **Untersuchungen zur Funktion der Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase anhand eines Knock-out-Mausmodells**

Die Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase (PHGPx), ein Mitglied der Selen-abhängigen Glutathion-Peroxidase Familie, ist an der Detoxifikation von Sauerstoffradikalen beteiligt und übernimmt somit eine wesentliche Funktion beim Schutz des Organismus vor oxidativem Stress. Die PHGPx liegt in drei unterschiedlichen Formen, der zytosolischen, der mitochondrialen und der spermienkern-spezifischen Form vor.

Durch gezielte Inaktivierung des PHGPx-Gens mittels eines konditionalen Knock-out-Mausmodells sollte deren Funktion *in vivo* analysiert werden. Die ubiquitäre Inaktivierung führte kurz nach der Gastrulation zu früher embryonaler Letalität (E7,5) in PHGPx-Knock-out-Embryonen. Die Knock-out-Embryonen waren in der Lage, alle drei Keimblätter, Ektoderm, Mesoderm und Endoderm, auszubilden. Ebenso war die für Mausembryonen typische Dreiteilung der Fruchtanlage durch Embryonal-, Exozölon- und Ektoplazentarhöhle erkennbar. Zu Beginn der Neurulation traten hingegen morphologische Abnormalitäten in Knockout-Embryonen auf. Diese waren charakterisiert durch hyperplastische Missbildungen vor allem in den anterioren Strukturen des embryonalen Ekto- und Mesoderms sowie im extraembryonalen Bereich. Weiterführende Studien zeigten, dass die Expression einiger für die Neurulation essenzieller Gene bei den PHGPx-Knock-out-Embryonen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen deutlich von anterior nach posterior verschoben waren. Dies deutet darauf hin, dass die PHGPx neben ihrer Rolle als zelluläres Antioxidans möglicherweise noch weitere Funktionen in der Regulation der Zellproliferation und Zelldifferenzierung innehat. Dies wird zurzeit anhand von primären Zellkultursystemen analysiert.

Die frühe Letalität der PHGPx-Knock-out-Embryonen zeigte, dass die PHGPx eine essenzielle Funktion bereits zu Beginn der Embryonalentwicklung übernimmt. Aufgrund dieses Befunds sollte die Erstellung eines embryonalen Expressionsprofils Aufschluss darüber geben, in welchen Geweben die PHGPx exprimiert wird und bei welchen Organen bzw. Organsystemen sie in der weiteren Embryonalentwicklung beteiligt ist. Die embryonale Expressionsstudie zeigte, dass die PHGPx bis etwa

Tag 12 der Embryonalentwicklung ubiquitär exprimiert war. Danach war eine starke Expression in der Leber, im Herzen und in den neuronalen Geweben zu erkennen, sowie in allen Epithelien wie beispielsweise der Lunge und des Magen-Darm-Traktes, später auch in der Haut. Bemerkenswert war ein starker Rückgang der Expression in der Leber, dem Hauptorgan der embryonalen Hämatopoese, kurz vor dem Zeitpunkt der Geburt. Dies implementiert, dass die PHGPx eine bedeutende Rolle in der Hämatopoese spielt.

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die zytosolische Form der PHGPx ubiquitär exprimiert war, wohingegen die mitochondriale und die spermienkernspezifische Formen nur im Hodengewebe detektiert werden konnten. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass ausschließlich die zytosolische Form der PHGPx essenziell für die frühe Embryonalentwicklung ist.

## Summary

### **Addressing the role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase *in vivo***

Phospholipid-hydroperoxide-glutathione-peroxidase (PHGPx), a member of the selenium-dependent glutathione peroxidase family, plays a major role in the detoxification of oxygen radicals, and thus has an important function in protecting cells from oxidative stress. PHGPx is expressed in three different forms, a cytosolic, a mitochondrial and a sperm-nuclei specific form.

To investigate its physiological role *in vivo* mice with a targeted deficiency in PHGPx were analysed. Ubiquitous, Cre-mediated inactivation of PHGPx was associated with early embryonic lethality just after gastrulation (E7.5). Both differentiation into the three germ layers, ectoderm, mesoderm, and endoderm and division into embryonic cavity, the exocoelomic cavity, and ectoplacental cavity, were not affected in PHGPx-deficient embryos. However, they failed to develop beyond the early-headfold-stage. The knock-out-embryos showed hyperplasia of the anterior part of the embryonic ecto- and mesoderm as well as malformations of extraembryonic structures. Expression analysis of genes required for proper headfold development showed a clear shift from anterior to posterior in knock-out-embryos. This finding indicates a dual function for PHGPx: being an antioxidant enzyme essential for all cell types and being a regulatory enzyme for cell proliferation/differentiation.

Since PHGPx plays an essential role during early embryogenesis, it was interesting to know in which tissues and organs PHGPx was expressed throughout later stages of embryonic development. A detailed embryonic expression analysis showed that up to day 12 of embryonic development PHGPx was ubiquitously expressed. At later stages, more prominent expression was observed in cardiac tissue, liver and neuronal tissues, as well as in all epithelial tissues, particularly in epithelia of the intestine and the lung. A strong decrease of expression was noticed in the liver, the main organ of embryonic haematopoiesis, during the final stages of embryogenesis. This may imply an important function of PHGPx in the haematopoietic system.

Further expression analysis demonstrated that only the cytosolic form of PHGPx and not the mitochondrial or the sperm-nuclei specific forms were expressed in embryonic as well as in somatic tissues. Therefore, one can conclude that it is the cytosolic form of PHGPx which is essential for early embryonic development.

## Abkürzungsverzeichnis

<u>Abkürzung</u>	<u>Erklärung</u>
A	Adenosin
Abb.	Abbildung(en)
Abk.	Abkürzung(en)
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua. dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
b.	bei
Bp	Basenpaar(e)
BrdU	5'-Brom-2'-desoxy-Uridin
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
°C	Grad Celsius
Ca	Kalzium
cDNA	<i>complementary-DNA</i>
Ci	Curie
CMV	Cytomegalie-Virus
conc.	konzentriert
cpm	<i>counts per minute</i> (Impulse pro Minute)
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	3'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonaltag
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	und andere
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FELASA	<i>Federation of European Animal Science Associations</i>
fl	gefloxt
g	Gramm
(x) g	Erdbeschleunigung
G-Phase	<i>gap</i> -Phase
GIT	Gastrointestinaltrakt

G	Guanosin
h	Stunde(n)
HCl	Chlorwasserstoffsäure, Salzsäure
HEPA	<i>High Efficiency Particle Arrestance</i>
KCl	Kaliumchlorid
k	kilo ( $10^3$ )
l	Liter
M	molar (Mol pro Liter)
m	milli ( $10^{-3}$ )
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
M-Phase	Mitose-Phase
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NaOH	Natriumhydroxid, Natronlauge
NP40	Nonidet P-40
NTP	Ribonukleosid-5'-Triphosphat
p.a.	per analysi
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
p.c.	post coitum
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PVP40	Polyvinylpyrrolidon-40
rATP	Adenosin-5'-Triphosphat
rCTP	Cytosin-5'-Triphosphat
rGTP	Guanosin-5'-Triphosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rUTP	Uracil-5'-Triphosphat (Ribonukleotid)
RT	Raumtemperatur
<sup>35</sup> S	radioaktiver Schwefel 35
S-Phase	Synthese-Phase
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
Sec	Selenocystein
sec	Sekunde(n)
SECIS	<i>Selenocysteine Insertion Sequence</i>
SSC	<i>Saline Sodium Citrate</i>
Tab.	Tabelle

---

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA-Puffer
T	Thymidin
TRIS	$\alpha, \alpha, \alpha$ -Tris-(hydroxymethyl)methylamin
tRNA	<i>transfer</i> -RNA
U	<i>Unit(s)</i> , Einheit enzymatischer Aktivität
UTP	Uridin-5'-Triphosphat
V	Volt
v/v	Volumenprozent
wt	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent



## Literaturverzeichnis

### A

- Ambremski, K. and Gottesmann, S.** (1981). Site-specific recombination Xis-independent excisive recombination of bacteriophage lambda. *J Mol Biol* **215**, 403-10.
- Andreesen, J. R. and Ljungdahl, L. G.** (1973). Formate dehydrogenase of *Clostridium thermoaceticum*: incorporation of selenium-75, and the effects of selenite, molybdate, and tungstate on the enzyme. *J Bacteriol* **116**, 867-73.
- Andrews, B. J., Proteau, G. A., Beatty, L. G. and Sadowski, P. D.** (1985). The FLP recombinase of the 2 $\mu$  circle DNA of yeast: interaction with target sequences. *Cell* **40**, 795-803.
- 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. *J Biol Chem* **274**, 4924-33.
- Arai, M., Imai, H., Sumi, D., Imanaka, T., Takano, T., Chiba, N. and Nakagawa, Y.** (1996). Import into mitochondria of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase requires a leader sequence. *Biochem Biophys Res Commun* **227**, 433-9.
- Arthur, J. R., Nicol, F. and Beckett, G. J.** (1990). Hepatic iodothyronine 5'-deiodinase. The role of selenium. *Biochem J* **272**, 537-40.

### B

- Bates, J. M., St Germain, D. L. and Galton, V. A.** (1999). Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat. *Endocrinology* **140**, 844-51.
- Beck, M. A., Levander, O. A. and Handy, J.** (2003). Selenium deficiency and viral infection. *J Nutr* **133**, 1463S-7S.
- Beddington, R. S.** (1994). Induction of a second neural axis by the mouse node. *Development* **120**, 613-20.
- 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. *Biol Trace Elem Res* **55**, 99-110.
- Behne, D., Kyriakopoulos, A., Meinhold, H. and Kohrle, J.** (1990). Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **173**, 1143-9.
- Behringer, R. R., Wakamiya, M., Tsang, T. E. and Tam, P. P.** (2000). A flattened mouse embryo: leveling the playing field. *Genesis* **28**, 23-30.
- Bock, A., Forchhammer, K., Heider, J. and Baron, C.** (1991a). Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. *Trends Biochem Sci* **16**, 463-7.
- Bock, A., Forchhammer, K., Heider, J., Leinfelder, W., Sawers, G., Veprek, B. and Zinoni, F.** (1991b). Selenocysteine: the 21st amino acid. *Mol Microbiol* **5**, 515-20.
- Borchert, A., Savaskan, N. E. and Kuhn, H.** (2003). Regulation of expression of the phospholipid hydroperoxide/sperm nucleus glutathione peroxidase gene. Tissue-specific expression pattern and identification of functional cis- and trans-regulatory elements. *J Biol Chem* **278**, 2571-80.

- Borchert, A., Schnurr, K., Thiele, B. J. and Kuhn, H.** (1999). Cloning of the mouse phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene. *FEBS Lett* **446**, 223-7.
- 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). *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5531-4.
- 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* **14**, 179-90.
- Brigelius-Flohe, R.** (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* **27**, 951-65.
- Brigelius-Flohe, R., Friedrichs, B., Maurer, S. and Streicher, R.** (1997). Determinants of PHGPx expression in a cultured endothelial cell line. *Biomed Environ Sci* **10**, 163-76.
- 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**, 307-16.
- Burk, R. F.** (1991). Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. *Faseb J* **5**, 2274-9.
- Burk, R. F. and Hill, K. E.** (1993). Regulation of selenoproteins. *Annu Rev Nutr* **13**, 65-81.
- Carlson, B. A., Novoselov, S. V., Kumaraswamy, E., Lee, B. J., Anver, M. R., Gladyshev, V. N. and Hatfield, D. L.** (2004). Specific excision of the selenocysteine tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> (Trsp) gene in mouse liver demonstrates an essential role of selenoproteins in liver function. *J Biol Chem* **279**, 8011-7.

## C

- Chambers, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Affara, N., McBain, W. and Harrison, P. R.** (1986). The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *Embo J* **5**, 1221-7.
- Cheng, W., Fu, Y. X., Porres, J. M., Ross, D. A. and Lei, X. G.** (1999). Selenium-dependent cellular glutathione peroxidase protects mice against a pro-oxidant-induced oxidation of NADPH, NADH, lipids, and protein. *Faseb J* **13**, 1467-75.
- Cheng, W. H., Combs, G. F., Jr. and Lei, X. G.** (1998a). Knockout of cellular glutathione peroxidase affects selenium-dependent parameters similarly in mice fed adequate and excessive dietary selenium. *Biofactors* **7**, 311-21.
- Cheng, W. H., Ho, Y. S., Ross, D. A., Valentine, B. A., Combs, G. F. and Lei, X. G.** (1997). Cellular glutathione peroxidase knockout mice express normal levels of selenium-dependent plasma and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases in various tissues. *J Nutr* **127**, 1445-50.
- Cheng, W. H., Ho, Y. S., Valentine, B. A., Ross, D. A., Combs, G. F., Jr. and Lei, X. G.** (1998b). Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in mice. *J Nutr* **128**, 1070-6.
- Chu, F. F., Doroshow, J. H. and Esworthy, R. S.** (1993). Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem* **268**, 2571-6.
- Clough, J. R. and Whittingham, D. G.** (1983). Metabolism of [<sup>14</sup>C]glucose by postimplantation mouse embryos in vitro. *J Embryol Exp Morphol* **74**, 133-42.

**Cone, J. E., Del Rio, R. M., Davis, J. N. and Stadtman, T. C.** (1976). Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase: identification of selenocysteine as the organoselenium moiety. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 2659-63.

**Conrad, M.** (2001). Etablierung von Mausstämmen defizient für die Selenoproteine mitochondriale Thioredoxin-Reduktase und Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase (PHGPx) und Charakterisierung einer Spermienkern-spezifischen Form der PHGPx. In *Fakultät für Biologie*, (ed. München: Ludwig-Maximilians-Universität.

**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. *Mol Cell Biol* **24**, 9414-23.

**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. *Mol Cell Biol* **25**, 7637-44.

**Constien, R., Forde, A., Liliensiek, B., Grone, H. J., Nawroth, P., Hammerling, G. and Arnold, B.** (2001). Characterization of a novel EGFP reporter mouse to monitor Cre recombination as demonstrated by a Tie2 Cre mouse line. *Genesis* **30**, 36-44.

**Cossee, M., Puccio, H., Gansmuller, A., Koutnikova, H., Dierich, A., LeMeur, M., Fischbeck, K., Dolle, P. and Koenig, M.** (2000). Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum Mol Genet* **9**, 1219-26.

**Croteau, W., Davey, J. C., Galton, V. A. and St Germain, D. L.** (1996). Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. A selenoprotein differentially expressed and regulated in human and rat brain and other tissues. *J Clin Invest* **98**, 405-17.

## D

**Davey, J. C., Becker, K. B., Schneider, M. J., St Germain, D. L. and Galton, V. A.** (1995). Cloning of a cDNA for the type II iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem* **270**, 26786-9.

**Downs, K. M. and Davies, T.** (1993). Staging of gastrulating mouse embryos by morphological landmarks in the dissecting microscope. *Development* **118**, 1255-66.

**Dürre, P. and Andreesen, J. R.** (1986). In *Biol in uns. Zeit*, vol. 16 (ed., pp. 12.

**Dymecki, S. M.** (1996). Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6191-6.

## E

**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. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**, G848-55.

## F

**Fagegaltier, D., Hubert, N., Yamada, K., Mizutani, T., Carbon, P. and Krol, A.** (2000). Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation. *Embo J* **19**, 4796-805.

**Ferreiro, A., Quijano-Roy, S., Pichereau, C., Moghadaszadeh, B., Goemans, N., Bonnemann, C., Jungbluth, H., Straub, V., Villanova, M., Leroy, J. P. et al.** (2002). Mutations of the selenoprotein N gene, which is implicated in rigid spine muscular dystrophy, cause the classical phenotype of multiminicore disease: reassessing the nosology of early-onset myopathies. *Am J Hum Genet* **71**, 739-49.

**Flohe, L., Gunzler, W. A. and Schock, H. H.** (1973). Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett* **32**, 132-4.

**Foley, J., Ton, T., Maronpot, R., Butterworth, B. and Goldsworthy, T. L.** (1993). Comparison of proliferating cell nuclear antigen to tritiated thymidine as a marker of proliferating hepatocytes in rats. *Environ Health Perspect* **101 Suppl 5**, 199-205.

**Forde, A., Constien, R., Grone, H. J., Hammerling, G. and Arnold, B.** (2002). Temporal Cre-mediated recombination exclusively in endothelial cells using Tie2 regulatory elements. *Genesis* **33**, 191-7.

## G

**Ganther, H. E.** (1999). Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis* **20**, 1657-66.

**Gardner, D. K. and Leese, H. J.** (1986). Non-invasive measurement of nutrient uptake by single cultured pre-implantation mouse embryos. *Hum Reprod* **1**, 25-7.

**Gasdaska, J. R., Harney, J. W., Gasdaska, P. Y., Powis, G. and Berry, M. J.** (1999). Regulation of human thioredoxin reductase expression and activity by 3'-untranslated region selenocysteine insertion sequence and mRNA instability elements. *J Biol Chem* **274**, 25379-85.

**Gladyshev, V. N., Jeang, K. T., Wootton, J. C. and Hatfield, D. L.** (1998). A new human selenium-containing protein. Purification, characterization, and cDNA sequence. *J Biol Chem* **273**, 8910-5.

**Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A. P., Blumenstock, C. and Niehrs, C.** (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* **391**, 357-62.

**Guimaraes, M. J., Peterson, D., Vicari, A., Cocks, B. G., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Ferrick, D. A., Kastelein, R. A., Bazan, J. F. et al.** (1996). Identification of a novel selD homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism? *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 15086-91.

## H

**Hakem, R., de la Pompa, J. L., Sirard, C., Mo, R., Woo, M., Hakem, A., Wakeham, A., Potter, J., Reitmair, A., Billia, F. et al.** (1996). The tumor suppressor gene Brca1 is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell* **85**, 1009-23.

**Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N.** (2002). How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol Cell Biol* **22**, 3565-76.

**Hermesz, E., Mackem, S. and Mahon, K. A.** (1996). Rpx: a novel anterior-restricted homeobox gene progressively activated in the prechordal plate, anterior neural plate and Rathke's pouch of the mouse embryo. *Development* **122**, 41-52.

**Hill, K. E., Lloyd, R. S., Yang, J. G., Read, R. and Burk, R. F.** (1991). The cDNA for rat selenoprotein P contains 10 TGA codons in the open reading frame. *J Biol Chem* **266**, 10050-3.

**Hill, K. E., Zhou, J., McMahan, W. J., Motley, A. K., Atkins, J. F., Gesteland, R. F. and Burk, R. F.** (2003). Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse. *J Biol Chem* **278**, 13640-6.

**Houghton, F. D., Thompson, J. G., Kennedy, C. J. and Leese, H. J.** (1996). Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Mol Reprod Dev* **44**, 476-85.

**Hubert, N., Walczak, R., Sturchler, C., Myslinski, E., Schuster, C., Westhof, E., Carbon, P. and Krol, A.** (1996). RNAs mediating cotranslational insertion of selenocysteine in eukaryotic selenoproteins. *Biochimie* **78**, 590-6.

**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 Radic Biol Med* **31**, 1051-65.

## I

**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. *Biochem Biophys Res Commun* **305**, 278-86.

**Imai, H., Narashima, K., Arai, M., Sakamoto, H., Chiba, N. and Nakagawa, Y.** (1998). Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *J Biol Chem* **273**, 1990-7.

**Imai, H., Sumi, D., Sakamoto, H., Hanamoto, A., Arai, M., Chiba, N. and Nakagawa, Y.** (1996). Overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppressed cell death due to oxidative damage in rat basophile leukemia cells (RBL-2H3). *Biochem Biophys Res Commun* **222**, 432-8.

## J

**Jakupoglu, C., Przemec, 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. *Mol Cell Biol* **25**, 1980-8.

**Johnson, M. T., Yang, H. S., Magnuson, T. and Patel, M. S.** (1997). Targeted disruption of the murine dihydrolipoamide dehydrogenase gene (Dld) results in perigastrulation lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14512-7.

## K

**Kalcklosch, M., Kyriakopoulos, A., Hammel, C. and Behne, D.** (1995). A new selenoprotein found in the glandular epithelial cells of the rat prostate. *Biochem Biophys Res Commun* **217**, 162-70.

**Kaufman, M. H.** (1992). *The Atlas of Mouse Development*. London, San Diego: Harcourt Brace & Company.

- Kelly, A. and West, J. D.** (1996). Genetic evidence that glycolysis is necessary for gastrulation in the mouse. *Dev Dyn* **207**, 300-8.
- Kelman, Z.** (1997). PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* **14**, 629-40.
- Klingensmith, J., Ang, S. L., Bachiller, D. and Rossant, J.** (1999). Neural induction and patterning in the mouse in the absence of the node and its derivatives. *Dev Biol* **216**, 535-49.
- Korotkov, K. V., Novoselov, S. V., Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N.** (2002). Mammalian selenoprotein in which selenocysteine (Sec) incorporation is supported by a new form of Sec insertion sequence element. *Mol Cell Biol* **22**, 1402-11.
- Koutnikova, H., Campuzano, V., Foury, F., Dolle, P., Cazzalini, O. and Koenig, M.** (1997). Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat Genet* **16**, 345-51.
- 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* **300**, 1439-43.
- Kryukov, G. V., Kumar, R. A., Koc, A., Sun, Z. and Gladyshev, V. N.** (2002). Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4245-50.
- Kuhn, R., Schwenk, F., Aguet, M. and Rajewsky, K.** (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science* **269**, 1427-9.
- Kumaraswamy, E., Carlson, B. A., Morgan, F., Miyoshi, K., Robinson, G. W., Su, D., Wang, S., Southon, E., Tessarollo, L., Lee, B. J. et al.** (2003). Selective removal of the selenocysteine tRNA [Ser]Sec gene (Trsp) in mouse mammary epithelium. *Mol Cell Biol* **23**, 1477-88.
- Kuo, Y. M., Zhou, B., Cosco, D. and Gitschier, J.** (2001). The copper transporter CTR1 provides an essential function in mammalian embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6836-41.
- Kyriakopoulos, A. and Behne, D.** (2002). Selenium-containing proteins in mammals and other forms of life. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **145**, 1-46.

## L

- Lee, B. J., Worland, P. J., Davis, J. N., Stadtman, T. C. and Hatfield, D. L.** (1989). Identification of a selenocysteyl-tRNA(Ser) in mammalian cells that recognizes the nonsense codon, UGA. *J Biol Chem* **264**, 9724-7.
- Lee, S. R., Kim, J. R., Kwon, K. S., Yoon, H. W., Levine, R. L., Ginsburg, A. and Rhee, S. G.** (1999). Molecular cloning and characterization of a mitochondrial selenocysteine-containing thioredoxin reductase from rat liver. *J Biol Chem* **274**, 4722-34.
- Lescure, A., Fagegaltier, D., Carbon, P. and Krol, A.** (2002). Protein factors mediating selenoprotein synthesis. *Curr Protein Pept Sci* **3**, 143-51.
- Li, F. S., Duan, Y. J., Yan, S. J., Guan, J. Y., Zou, L. M., Wei, F. C., Mong, L. Y., Li, L. and Li, S. Y.** (1990). Presenile (early ageing) changes in tissues of Kaschin-Beck disease and its pathogenetic significance. *Mech Ageing Dev* **54**, 103-20.
- Lim, D. S. and Hasty, P.** (1996). A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. *Mol Cell Biol* **16**, 7133-43.
- Lindenau, J., Noack, H., Asayama, K. and Wolf, G.** (1998). Enhanced cellular glutathione peroxidase immunoreactivity in activated astrocytes and in microglia during excitotoxin induced neurodegeneration. *Glia* **24**, 252-6.

**Low, S. C. and Berry, M. J.** (1996). Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* **21**, 203-8.

**Low, S. C., Grundner-Culemann, E., Harney, J. W. and Berry, M. J.** (2000). SECIS-SBP2 interactions dictate selenocysteine incorporation efficiency and selenoprotein hierarchy. *Embo J* **19**, 6882-90.

## M

**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**, 651-60.

**Martinez-Barbera, J. P., Rodriguez, T. A. and Beddington, R. S.** (2000). The homeobox gene *Hesx1* is required in the anterior neural ectoderm for normal forebrain formation. *Dev Biol* **223**, 422-30.

**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**, 179-85.

**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. *Biol Chem* **384**, 575-88.

**Meno, C., Saijoh, Y., Fujii, H., Ikeda, M., Yokoyama, T., Yokoyama, M., Toyoda, Y. and Hamada, H.** (1996). Left-right asymmetric expression of the TGF beta-family member *lefty* in mouse embryos. *Nature* **381**, 151-5.

**Mills, G. C.** (1957). Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem* **229**, 189-97.

**Miranda-Vizuete, A., Damdimopoulos, A. E. and Spyrou, G.** (1999). cDNA cloning, expression and chromosomal localization of the mouse mitochondrial thioredoxin reductase gene(1). *Biochim Biophys Acta* **1447**, 113-8.

**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). *Biol Chem* **384**, 635-43.

**Motsenbocker, M. A. and Tappel, A. L.** (1982). Selenium and selenoproteins in the rat kidney. *Biochim Biophys Acta* **709**, 160-5.

**Muller, C., Wingler, K. and Brigelius-Flohe, R.** (2003). 3'UTRs of glutathione peroxidases differentially affect selenium-dependent mRNA stability and selenocysteine incorporation efficiency. *Biol Chem* **384**, 11-8.

**Murphy, M., Stinnakre, M. G., Senamaud-Beaufort, C., Winston, N. J., Sweeney, C., Kubelka, M., Carrington, M., Brechot, C. and Sobczak-Thepot, J.** (1997). Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene. *Nat Genet* **15**, 83-6.

## N

**Nicklas, W. and Baneux, P.** (2002). Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Animal* **36**, 20-42.

**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. *J Biol Chem* **274**, 29294-302.

**Nomura, K., Imai, H., Koumura, T., Kobayashi, T. and Nakagawa, Y.** (2000). Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem J* **351**, 183-93.

## O

**Oulad-Abdelghani, M., Chazaud, C., Bouillet, P., Mattei, M. G., Dolle, P. and Chambon, P.** (1998). Stra3/lefty, a retinoic acid-inducible novel member of the transforming growth factor-beta superfamily. *Int J Dev Biol* **42**, 23-32.

## P

**Perea-Gomez, A., Shawlot, W., Sasaki, H., Behringer, R. R. and Ang, S.** (1999). HNF3beta and Lim1 interact in the visceral endoderm to regulate primitive streak formation and anterior-posterior polarity in the mouse embryo. *Development* **126**, 4499-511.

**Perea-Gomez, A., Vella, F. D., Shawlot, W., Oulad-Abdelghani, M., Chazaud, C., Meno, C., Pfister, V., Chen, L., Robertson, E., Hamada, H. et al.** (2002). Nodal antagonists in the anterior visceral endoderm prevent the formation of multiple primitive streaks. *Dev Cell* **3**, 745-56.

**Petit, N., Lescure, A., Rederstorff, M., Krol, A., Moghadaszadeh, B., Wewer, U. M. and Guicheney, P.** (2003). Selenoprotein N: an endoplasmic reticulum glycoprotein with an early developmental expression pattern. *Hum Mol Genet* **12**, 1045-53.

**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 J* **15**, 1236-8.

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

**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. *J Biol Chem* **270**, 26993-9.

## R

**Rhinn, M., Dierich, A., Shawlot, W., Behringer, R. R., Le Meur, M. and Ang, S. L.** (1998). Sequential roles for Otx2 in visceral endoderm and neuroectoderm for forebrain and midbrain induction and specification. *Development* **125**, 845-56.

**Rossant, J. a. T., P. P. L.** (2002). Mouse Development: Patterning, Morphogenesis, and Organogenesis. San Diego: Academic Press.



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

**Roveri, A., Ursini, F., Flohe, L. and Maiorino, M.** (2001). PHGPx and spermatogenesis. *Biofactors* **14**, 213-22.

**Rowinski, J., Solter, D. and Koprowski, H.** (1975). Mouse embryo development in vitro: effects of inhibitors of RNA and protein synthesis on blastocyst and post-blastocyst embryos. *J Exp Zool* **192**, 133-42.

**Rüsse, I., Sinowatz, F.** (1991). Lehrbuch der Embryologie der Haustiere.

## S

**Salvatore, D., Bartha, T., Harney, J. W. and Larsen, P. R.** (1996). Molecular biological and biochemical characterization of the human type 2 selenodeiodinase. *Endocrinology* **137**, 3308-15.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F. and T., M.** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual, 2. Edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Sattler, W., Maiorino, M. and Stocker, R.** (1994). Reduction of HDL- and LDL-associated cholesterylester and phospholipid hydroperoxides by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and Ebselen (PZ 51). *Arch Biochem Biophys* **309**, 214-21.

**Schomburg, L., Schweizer, U., Holtmann, B., Flohe, L., Sendtner, M. and Kohrle, J.** (2003). Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *Biochem J* **370**, 397-402.

**Schwarz, K., Foltz, C. M.** (1957). Selenium as an integral part of factor 3 against necrotic liver degeneration. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 3292.

**Schweizer, U., Brauer, A. U., Kohrle, J., Nitsch, R. and Savaskan, N. E.** (2004). Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. *Brain Res Brain Res Rev* **45**, 164-78.

**Schwenk, F., U., B. and Rajewsky, K.** (1995). A cre-ic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res.* **25**, 5080-5081.

**Shawlot, W., Wakamiya, M., Kwan, K. M., Kania, A., Jessell, T. M. and Behringer, R. R.** (1999). Lim1 is required in both primitive streak-derived tissues and visceral endoderm for head formation in the mouse. *Development* **126**, 4925-32.

**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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5101-6.

**Snow, M. H.** (1977). Mammalian development. *Nature* **270**, 281.

**Steinberg, D.** (1997). Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* **272**, 20963-6.

**Streeter, G. L., 211-245.** (1942). Developmental horizons in human embryos. Description of age group XI, 13 to 20 somites, and age group XII, 21 to 29 somites. *Carnegie Institution of Washington Publication 550 Contributions to Embryology* **30**, 211-245.

**Sun, Q. A., Wu, Y., Zappacosta, F., Jeang, K. T., Lee, B. J., Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N.** (1999). Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. *J Biol Chem* **274**, 24522-30.

**Sung, S. Z.** (1980). [The relationship between seasonal prevalence of Keshan disease and hair selenium level of local inhabitants (author's transl)]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* **14**, 17-9.

**Suppmann, S., Persson, B. C. and Bock, A.** (1999). Dynamics and efficiency in vivo of UGA-directed selenocysteine insertion at the ribosome. *Embo J* **18**, 2284-93.

**Suzuki, A., de la Pompa, J. L., Hakem, R., Elia, A., Yoshida, R., Mo, R., Nishina, H., Chuang, T., Wakeham, A., Itie, A. et al.** (1997). Brca2 is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Genes Dev* **11**, 1242-52.

## T

**Takahashi, K., Avissar, N., Whitin, J. and Cohen, H.** (1987). Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch Biochem Biophys* **256**, 677-86.

**Tam, P. P. and Steiner, K. A.** (1999). Anterior patterning by synergistic activity of the early gastrula organizer and the anterior germ layer tissues of the mouse embryo. *Development* **126**, 5171-9.

**Tamura, T. and Stadtman, T. C.** (1996). A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1006-11.

**Tebbs, R. S., Flannery, M. L., Meneses, J. J., Hartmann, A., Tucker, J. D., Thompson, L. H., Cleaver, J. E. and Pedersen, R. A.** (1999). Requirement for the Xrcc1 DNA base excision repair gene during early mouse development. *Dev Biol* **208**, 513-29.

**Theiler, K.** (1989). The House Mouse. Development and Normal Stages from Fertilization to 4 Weeks of Age. . Berlin: Springer-Verlag.ent.

**Thomas, P. and Beddington, R.** (1996). Anterior primitive endoderm may be responsible for patterning the anterior neural plate in the mouse embryo. *Curr Biol* **6**, 1487-96.

**Thomas, P., Brickman, J. M., Popperl, H., Krumlauf, R. and Beddington, R. S.** (1997). Axis duplication and anterior identity in the mouse embryo. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **62**, 115-25.

**Tsai, C. S., Burgett, M. W. and Reed, L. J.** (1973). Alpha-keto acid dehydrogenase complexes. XX. A kinetic study of the pyruvate dehydrogenase complex from bovine kidney. *J Biol Chem* **248**, 8348-52.

**Tujebajeva, R. M., Copeland, P. R., Xu, X. M., Carlson, B. A., Harney, J. W., Driscoll, D. M., Hatfield, D. L. and Berry, M. J.** (2000). Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion. *EMBO Rep* **1**, 158-63.

**Turner, D. C. and Stadtman, T. C.** (1973). Purification of protein components of the clostridial glycine reductase system and characterization of protein A as a selenoprotein. *Arch Biochem Biophys* **154**, 366-81.

## U

**Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohe, R., Aumann, K. D., Roveri, A., Schomburg, D. and Flohe, L.** (1995). Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* **252**, 38-53.

**Ursini, F., Maiorino, M. and Roveri, A.** (1997). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx): more than an antioxidant enzyme? *Biomed Environ Sci* **10**, 327-32.

## V

**Vendeland, S. C., Beilstein, M. A., Chen, C. L., Jensen, O. N., Barofsky, E. and Whanger, P. D.** (1993). Purification and properties of selenoprotein W from rat muscle. *J Biol Chem* **268**, 17103-7.

**Vulpe, C. D. and Packman, S.** (1995). Cellular copper transport. *Annu Rev Nutr* **15**, 293-322.

## W

**Waldrip, W. R., Bikoff, E. K., Hoodless, P. A., Wrana, J. L. and Robertson, E. J.** (1998). Smad2 signaling in extraembryonic tissues determines anterior-posterior polarity of the early mouse embryo. *Cell* **92**, 797-808.

**Ward M., M., Sundberg.** (2000). Pathology of Genetically Engineered Mice. Ames: Iowa State University Press.

**Watabe, S., Makino, Y., Ogawa, K., Hiroi, T., Yamamoto, Y. and Takahashi, S. Y.** (1999). Mitochondrial thioredoxin reductase in bovine adrenal cortex its purification, properties, nucleotide/amino acid sequences, and identification of selenocysteine. *Eur J Biochem* **264**, 74-84.

**Weber, R. J., Pedersen, R. A., Wianny, F., Evans, M. J. and Zernicka-Goetz, M.** (1999). Polarity of the mouse embryo is anticipated before implantation. *Development* **126**, 5591-8.

**Weitzel, F. and Wendel, A.** (1993). Selenoenzymes regulate the activity of leukocyte 5-lipoxygenase via the peroxide tone. *J Biol Chem* **268**, 6288-92.

**Wenk, J., Schuller, J., Hinrichs, C., Syrovets, T., Azoitei, N., Podda, M., Wlaschek, M., Brenneisen, P., Schneider, L. A., Sabiwalsky, A. et al.** (2004). Overexpression of phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase in human dermal fibroblasts abrogates UVA irradiation-induced expression of interstitial collagenase/matrix metalloproteinase-1 by suppression of phosphatidylcholine hydroperoxide-mediated NFkappaB activation and interleukin-6 release. *J Biol Chem* **279**, 45634-42.

**Wilson, R. B. and Roof, D. M.** (1997). Respiratory deficiency due to loss of mitochondrial DNA in yeast lacking the frataxin homologue. *Nat Genet* **16**, 352-7.

## Y

**Yagi, K., Shidoji, Y., Komura, S., Kojima, H. and Ohishi, N.** (1998). Dissipation of mitochondrial membrane potential by exogenous phospholipid monohydroperoxide and protection against this effect by transfection of cells with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene. *Biochem Biophys Res Commun* **245**, 528-33.

**Yang, G., Yin, S., Zhou, R., Gu, L., Yan, B. and Liu, Y.** (1989). Studies of safe maximal daily dietary Se-intake in a seleniferous area in China. Part II: Relation between Se-intake and the manifestation of clinical signs and certain biochemical alterations in blood and urine. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* **3**, 123-30.

**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 Radic Biol Med* **34**, 496-502.

**Z**

**Zhong, L., Arner, E. S. and Holmgren, A.** (2000). Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5854-9.

**Zhong, L. and Holmgren, A.** (2000). Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations. *J Biol Chem* **275**, 18121-8.

**Zinoni, F., Birkmann, A., Stadtman, T. C. and Bock, A.** (1986). Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine-containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogen-lyase-linked) from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4650-4.

## Lebenslauf

Manuela Schneider

geboren am 20. Juli 1976 in Bayreuth

### Schulbildung

1982-1987 Grund- und Volksschule in Warmensteinach  
 1987-1996 Richard-Wagner-Gymnasium in Bayreuth, Abschluss: Abitur

### Hochschulstudium

1996-2002 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität  
 in München  
 Nov. 2002 Approbation als Tierärztin

### Promotion

Nov. 2002 – GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH,  
 Okt. 2005 Neuherberg, Abteilung für Vergleichende Medizin, Leiter Prof. Dr.  
 J. Schmidt: „Untersuchungen zur Funktion der Phospholipid-  
 Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase anhand eines Knock-out-  
 Mausmodells“

Nov. 2005 – Wissenschaftliche Mitarbeiterin im GSF Hämatologikum,  
 April 2006 Großhadern, Institut für Klinische Molekularbiologie und  
 Tumorummunologie, Leiter Prof. Dr. G. W. Bornkamm

Seit April 2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der LMU München, Institut für  
 Chirurgische Forschung/Physiologie, Leiter Prof. Dr. U. Pohl

## Publikationen

**Kiermayer C., Conrad M., Schneider M., Schmidt J., Brielmeier M.** Optimization of spatiotemporal gene inactivation by oral application of tamoxifen citrate in the mouse. (submitted)

**Schneider M., Vogt-Weisenhorn D. M., Seiler A., Bornkamm G. W., Brielmeier M., Conrad M.** (2006). Embryonic expression profile of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase.

Gene Expression Patterns 6(2006): 489-94

**Jakupoglu C., Przemeck G. K., Schneider M., Moreno S. G., Mayr N., Hatzopolous A. K., de Angelis M. H., Wurst W., Bornkamm G. W., Brielmeier M., Conrad M.** (2005). Cytoplasmatic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development.

Mol Cell Biol. 25(5): 1980-8.

**Conrad M., Jakupoglu C., Moreno S. G., Lippl S., Banjac A., Schneider M., Beck H., Hatzopoulos A. K., Just U., Sinowatz F., Schmahl W., Chien K. R., Wurst W., Bornkamm G. W., Brielmeier M.** (2004). Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function.

Mol Cell Biol. 24(21): 9414-23.

## Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich während der Entstehungszeit dieser Arbeit unterstützten:

Dr. Marcus Conrad für die Einführung in das selbstständige wissenschaftliche Arbeiten, für seine hervorragende ständige Betreuung bei der Durchführung der Projekte, für die Diskussion und Korrektur dieser Arbeit, für die Motivation und die aufmunternden Worte, sowie für die ausgezeichnete Zusammenarbeit.

Dr. Markus Brielmeier ebenfalls für seine Betreuung, ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung, vor allem bei der Fertigstellung und Korrektur dieser Arbeit.

Prof. J. Schmidt für die hervorragenden Arbeitsbedingungen in der Abteilung für Vergleichende Medizin und für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit.

Prof. W. Schmahl für die Betreuung dieser Arbeit am Institut der Tierpathologie der Veterinärmedizinischen Fakultät, sowie für die kritische Durchsicht meines Manuskripts und seine wertvollen Ratschläge.

Prof. G. W. Bornkamm, Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, für seine großes Interesse an dieser Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft und seine Unterstützung.

Dr. Daniela Vogt-Weisenhorn, Institut für Entwicklungsgenetik, für ihr Fachwissen und die Hilfe bei der Fertigstellung der Publikation, sowie Miriam Homburg für ihre technische Assistenz.

Dr. Lutz Ruprecht für seine Beratung im Bereich des Tierschutzes, für seine Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Nadja Mayr und Susi Bensch für die technische Assistenz und die große Hilfe bei vielen Kleinigkeiten zwischendurch, sowie wie allen Mitarbeitern der Abteilung für Vergleichende Medizin für die gute Zusammenarbeit.

Außerdem Tamara Perisic, Dr. Ana Banjac, Alex Seiler, Pankaj Mandal, Dr. Rob Chapman und Madhu Sukumar für die unterschiedlichsten Dinge und für die nette Atmosphäre am Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik.

Den Mitarbeitern der Spülküche für ihren Einsatz und vor allem den Tierpflegern für die sehr gute Zusammenarbeit.