

Aus der Abteilung „Biochemie der Mikronährstoffe“ am
Deutschen Institut für Ernährungsforschung

Selenabhängige Glutathionperoxidasen als Mediatoren und Ziele der intrazellulären Redoxregulation:

Identifizierung der GI-GPx als Ziel für Nrf2 und der PHGPx als
Regulator redoxsensitiver Signalkaskaden

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin „Biochemie der Ernährung“

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von

ANTJE BANNING

geboren am 12.05.1977 in Weimar

Potsdam, im Januar 2005

Gutachter:

Prof. Dr. Regina Brigelius-Flohé
Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Abteilung Biochemie der Mikronährstoffe,
Potsdam-Rehbrücke

Prof. Dr. Josef Köhrle
Charite – Universitätsmedizin, Institut für experimentelle Endokrinologie, Berlin

Prof. Dr. Franz Jakob
Universität Würzburg, Institut für experimentelle und klinische Osteologie, Würzburg

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juni 2005

*„Die Zeit wird kommen, wo unsere Nachkommen sich wundern, dass wir so
offenbare Dinge nicht gewußt haben.“*

*Lucius A. Seneca
[4 v.Chr. – 65 n.Chr.]*

INHALTSVERZEICHNIS

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	I
VERZEICHNIS DER TABELLEN	III
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Selen	1
1.1.1 Historie und chemische Eigenschaften	1
1.1.2 Funktionen von Selenoproteinen	1
1.1.2.1 Übersicht über bisher bekannte Selenoproteine	1
1.1.2.2 Synthese von Selenoproteinen	3
1.1.2.3 Regulation der Selenoproteinexpression	4
1.1.2.4 Glutathionperoxidasen (GPx)	5
1.1.2.5 Gastrointestinale Glutathionperoxidase (GI-GPx)	6
1.1.2.6 Phospholipidhydroperoxid Glutathionperoxidase (PHGPx)	7
1.2 Redoxsensitive Transkriptionsfaktoren und Mechanismen der Genaktivierung	8
1.2.1 NF- κ B	8
1.2.2 Nrf2/Keap1	10
1.3 Glutathionperoxidasen bei Atherosklerose und Krebs	12
1.3.1 Atherosklerose	12
1.3.1.1 Pathogenese der Atherosklerose und Bedeutung von Adhäsions-	
molekülen	13
1.3.1.2 Glutathionperoxidasen und Atherosklerose	14
1.3.1.3 Glutathionperoxidasen und Adhäsionsmoleküle	14
1.3.2 Glutathionperoxidasen und Krebs	15
1.4 Ziel der Arbeit	16
2 METHODEN	18
2.1 Zellkultur	18
2.2 RNA-Isolierung und reverse Transkription	19
2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	19
2.3.1 Standard-PCR mit densitometrischer Auswertung	19
2.3.2 Real Time PCR	20
2.4 Klonierung von PCR-Produkten und synthetischen Oligonukleotiden	21
2.4.1 TA-Klonierung	21
2.4.2 Ligation mit T4-Ligase	21
2.4.3 Transformation in <i>E. coli</i>	21
2.4.4 Plasmidisolierung und Sequenzierung	22
2.5 Isolierung, Mutation und Analyse von Genabschnitten	22
2.5.1 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)	22
2.5.2 "Genome Walking" zur Charakterisierung unbekannter Genabschnitte	22
2.5.3 Generierung von Deletionskonstrukten	23
2.5.4 Zielgerichtete Mutagenese von Promotoren	23

2.5.5	Computer-unterstützte Analyse genomischer DNA	23
2.6	Reportergenanalysen	24
2.6.1	Plasmide.....	24
2.6.2	Transiente Transfektion von SMC, ECV304, HepG2 und CaCo-2	25
2.6.3	Bestimmung der Reportergenaktivität.....	26
2.6.3.1	β-Galactosidasemessung.....	26
2.6.3.2	Luciferasemessung	26
2.7	Immuncytochemie	27
2.8	Durchflusscytometrie	27
2.9	Gewinnung von Kernlysaten.....	28
2.10	Proteinbestimmung	29
2.11	SDS-PAGE und Western Blot.....	29
2.12	[³² P]-in vivo Labeling.....	30
2.13	Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)	30
2.14	MTT-Test.....	31
2.15	Enzymaktivitäten	32
2.15.1	GPx-Aktivitäten im Gesamtlusat.....	32
2.15.2	PHGPx-Aktivität im Kernlysat.....	32
2.15.3	Hämoxygenaseaktivität	33
2.16	Glutathionbestimmung.....	33
2.17	Bestimmung von gemischten Disulfiden	34
2.18	Erfassung des zellulären Thiolstatus	35
2.19	Statistik	35
3	ERGEBNISSE	36
3.1	Identifizierung der GI-GPx als Ziel für Nrf2	36
3.1.1	Der GI-GPx-Promotor enthält ein funktionales ARE	36
3.1.2	Das GI-ARE-2 ist essentiell für die Aktivität des GI-GPx-Promotors	40
3.1.3	Die Aktivität des GI-GPx-Promotors wird dosisabhängig durch das Nrf2/Keap1-System reguliert.....	42
3.1.4	Regulation des GI-GPx-Promotors durch das Nrf2/Keap1-System in CaCo-2-Zellen	44
3.1.5	Induktion der endogenen GI-GPx durch Nrf2-Induktoren	44
3.2	Die PHGPx als Regulator redoxsensitiver Signalkaskaden	47
3.2.1	Charakterisierung von SMC und SMC ^{PHGPx}	47
3.2.1.1	GPx-Aktivitäten.....	47
3.2.1.2	Proliferationsrate	48
3.2.1.3	Glutathionstatus	48
3.2.1.4	Thiolstatus	49
3.2.2	VCAM-1-Expression in Kaninchen-SMC.....	49
3.2.2.1	Isolierung und Sequenzierung der VCAM-1 cDNA	49
3.2.2.2	IL-1-induzierte VCAM-1-Expression in SMC und SMC ^{PHGPx}	50
3.2.3	Charakterisierung des Kaninchen-VCAM-1-Promotors	54

3.2.3.1	Isolierung des VCAM-1-Promotors mittels „Genome Walking“	54
3.2.3.2	Untersuchung der IL-1-abhängigen VCAM-1-Promotoraktivität	55
3.2.4	NF- κ B-Aktivierung in SMC und ECV304.....	58
3.2.4.1	Nukleäre Translokation von NF- κ B	58
3.2.4.2	NF- κ B-DNA-Bindefähigkeit	59
3.2.4.3	Transaktivierungsaktivität von NF- κ B	60
3.2.4.4	Phosphorylierung von p65.....	61
3.2.5	Nrf2-Aktivierung und Expression der Hämoxxygenase-1 in SMC und SMC ^{PHGPx} ...	62
3.2.5.1	Transaktivierungsaktivität von Nrf2	62
3.2.5.2	Hämoxxygenaseaktivität und –expression.....	63
3.2.5.3	Regulation der VCAM-1-Expression durch Nrf2	63
4	DISKUSSION.....	65
4.1	Die Regulation der GI-GPx-Expression durch das Nrf2/Keap1-System	65
4.1.1	Konsequenzen einer Nrf2-abhängigen GI-GPx-Expression	67
4.2	Regulation atheroskleroserelevanter Prozesse durch die PHGPx	70
4.2.1	Modulation des zellulären Redoxstatus durch die PHGPx	70
4.2.2	Einfluss der PHGPx auf die Expression von zellulären Adhäsionsmolekülen	71
4.2.3	PHGPx und die Aktivität der redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren NF- κ B und Nrf2.....	73
4.3	Moderater oxidativer Stress als Auslöser zellulärer Verteidigungsmechanismen?	78
4.4	Ausblick.....	81
5	ZUSAMMENFASSUNG	83
6	LITERATUR	85
7	DANKSAGUNG	101

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abb. 1.	Selenoproteinsynthese in Eukaryoten.....	3
Abb. 2.	Reaktionsmechanismus der Glutathionperoxidasen	6
Abb. 3.	Prinzip der NF- κ B-vermittelten Genexpression	10
Abb. 4.	Prinzip der Nrf2-vermittelten Genexpression.....	12
Abb. 5.	Skizze des GI-GPx-Promotors und Position der potentiellen AREs	36
Abb. 6.	tBHQ und SFN induzieren eine verstärkte Bindung von Nrf2 an das GI-ARE-2	37
Abb. 7.	Nukleäre Translokation von Nrf2 in Abhängigkeit von tBHQ und SFN	38
Abb. 8.	Aktivierung der im GI-GPx-Promotor vorhandenen AREs durch Nrf2.....	39
Abb. 9.	Aktivierung der im GI-GPx-Promotor vorhandenen AREs durch Nrf2- Induktoren.....	40
Abb. 10.	Regulation der GI-GPx-Promotoraktivität durch Nrf2	41
Abb. 11.	Regulation der GI-GPx-Promotoraktivität durch Nrf2-Induktoren.....	42
Abb. 12.	Dosisabhängige Regulation des GI-GPx-Promotors durch Nrf2 und Keap1	43
Abb. 13.	Regulation der GI-GPx-Promotoraktivität in CaCo-2-Zellen	44
Abb. 14.	GI-GPx-Expression in HepG2-Zellen in Abhängigkeit von tBHQ und SFN	45
Abb. 15.	Stimulation der GI-GPx-Expression in CaCo-2-Zellen durch tBHQ und SFN	46
Abb. 16.	Gesamt-GPx- und PHGPx-Aktivitäten in SMC und SMC ^{PHGPx}	47
Abb. 17.	Proliferationsrate von SMC und SMC ^{PHGPx}	48
Abb. 18.	Intrazellulärer Oxidationsstatus von SMC und SMC ^{PHGPx}	49
Abb. 19.	Kaninchen VCAM-1 cDNA.....	50
Abb. 20.	VCAM-1 mRNA in SMC und SMC ^{PHGPx}	51
Abb. 21.	Durchflusscytometrische Analyse der IL-1-induzierten VCAM-1-Expression in SMC und SMC ^{PHGPx}	52
Abb. 22.	Immuncytochemischer Nachweis der IL-1-induzierten VCAM-1-Expression auf SMC und SMC ^{PHGPx}	53
Abb. 23.	VCAM-1-Expression in SMC und SMC ^{PHGPx} : Western Blot	53

Abb. 24. Nachweis von glycosyliertem VCAM-1.....	54
Abb. 25. Skizze des Kaninchen VCAM-1-Promotors.....	55
Abb. 26. VCAM-1-Promotoraktivität in SMC und SMC ^{PHGPx} in Abhängigkeit von IL-1.....	56
Abb. 27. VCAM-1 Promotoraktivität in ECV ^{pcDNA3} und ECV ^{PHGPx} in Abhängigkeit von IL-1	56
Abb. 28. Einfluss der NF-κB-Bindestellen auf die IL-1-induzierte VCAM-1-Promotoraktivität in SMC und ECV304	57
Abb. 29. Nukleäre Translokation von NF-κB in Abhängigkeit von IL-1	58
Abb. 30. NF-κB-DNA-Bindung in Abhängigkeit von IL-1 in SMC und ECV304	59
Abb. 31. NF-κB-Supershift	60
Abb. 32. PHGPx-Überexpression hemmt die Transaktivierungsaktivität von NF-κB.....	61
Abb. 33. Einfluss der PHGPx auf den Phosphorylierungszustand der NF-κB-Untereinheit p65	62
Abb. 34. Nrf2-Aktivität und Expression der HO-1 mRNA in SMC und SMC ^{PHGPx}	63
Abb. 35. VCAM-1-Expression in SMC mit und ohne Hämvorbehandlung.....	64
Abb. 36. Modulation der VCAM-1-Promotoraktivität durch das Nrf2/Keap1-System.....	64
Abb. 37. Glutathionperoxidasen und redoxsensitive Transkriptionsfaktoren.....	80

VERZEICHNIS DER TABELLEN

Tabelle 1. Bislang identifizierte, eukaryotische Selenoproteine und deren physiologische Funktionen	2
Tabelle 2. Zelllinien	18
Tabelle 3. PCR-Oligonukleotide	20
Tabelle 4. Plasmide und Oligonukleotide	25
Tabelle 5. EMSA-Oligonukleotide.....	31
Tabelle 6. Glutathionstatus in SMC und SMC ^{PHGPx}	48

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

ARE	antioxidant response element
ATCC	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA
bp	Basenpaar
BIM	Biochemie der Mikronährstoffe
BSA	Rinderserumalbumin
CAM	zelluläres Adhäsionsmolekül
cGPx	cytosolische Glutathionperoxidase
COX	Cyclooxygenase
CUR	Curcumin (Diferuloylmethan)
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTNB	5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoesäure); Ellmann's Reagenz
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylen-glycol-bis-(2-aminoethylether)-tetraessigsäure
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
FCS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
γ -GCS	gamma-Glutamylcystein-Synthetase
GI-GPx	gastrointestinale Glutathionperoxidase
GIT	Gastrointestinaltrakt
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
GSSR	Glutathion-gemischtes Disulfid
HO-1	Hämoxygenase-1
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
IL-1	Interleukin-1 β
kDa	Kilodalton
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein-1
LOX	Lipoxygenase
MBrB	Monobromobimane
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure

MTT	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromid (Thiazolylblau)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NEM	N-Ethylmaleimid
NF- κ B	nukleärer Faktor kappa B
Nrf2	NF-E2 related factor-2
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ONPG	o-nitrophenyl β -D-galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCOOH	Phosphatidylcholinhydroperoxid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PHGPx	Phospholipidhydroperoxid Glutathionperoxidase
POD	Peroxidase
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RIPA	Radio-Immuno-Präzipitationsassay
ROOH	Hydroperoxid
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SBP-2	SECIS-bindendes Protein 2
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SECIS	Selenocysteine Inserting Sequence
Se-Cys	Selenocystein
SFN	Sulforaphan
SMC	glatte Muskelzelle
T3	3,5,3'-Trijodothyronin
T4	Thyroxin
T _A	Hybridisierungstemperatur
tBHQ	<i>tert</i> -Butylhydrochinon
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)-phosphin
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TTBS	Tween-TBS
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UTR	nicht translatierte Region
VCAM-1	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1

1 EINLEITUNG

1.1 Selen

1.1.1 Historie und chemische Eigenschaften

Die erste schriftliche Erwähnung des Spurenelementes Selen geht auf das Jahr 1817 zurück. Zu jener Zeit beschrieb der schwedische Chemiker Jöns Jacob Freiherr von Berzelius (1779 -1848) die Entdeckung eines unbekanntes chemischen Elementes, welchem er den Namen des Mondes, „Seléne“, gab. Dies tat er in Anlehnung an das bereits nach der Erde benannte Tellur (tellus, griech. = Erde). Erst 1957 wurde von Schwarz und Foltz erkannt, dass es sich bei Selen um einen essentiellen Mikronährstoff handelt, der in der Lage ist, in Ratten eine durch Mangelernährung induzierte Lebernekrose zu verhindern [1]. Es dauerte weitere 16 Jahre bis man die ersten Selenoproteine, sowohl in Bakterien [2] als auch in Säugerzellen [3, 4], fand und so der Grundstein für die Erforschung von Selenoproteinen auf regulatorischer und funktioneller Ebene gelegt wurde.

Hinsichtlich seiner chemischen Eigenschaften weist Selen eine hohe Ähnlichkeit zum ebenfalls in der VI. Hauptgruppe stehenden Schwefel auf. Dennoch unterscheiden sich die beiden Elemente auch in einigen wichtigen Punkten: Selenocystein, die Form in der Selen in Selenoproteinen vorkommt, besitzt einen niedrigeren pK-Wert als Cystein und liegt im physiologischen pH-Bereich vorwiegend in ionisierter Form vor, wohingegen Cystein protoniert ist. Demzufolge ist das Selenol, im Vergleich zum Thiol, ein wirksameres Nukleophil und verfügt über eine höhere Reaktivität [5, 6].

1.1.2 Funktionen von Selenoproteinen

1.1.2.1 Übersicht über bisher bekannte Selenoproteine

Die biologischen Funktionen von Selen werden durch verschiedene Selenoproteine vermittelt, die Selen in Form von Selenocystein (Se-Cys) inkorporiert haben. Selenoproteine findet man sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten, bei letzteren allerdings nicht in Hefen oder Pflanzen [7]. Bioinformatischen Analysen des humanen Genoms zufolge verfügt der Mensch über insgesamt 25 verschiedene Gene [8], die für jeweils mindestens ein Selenoprotein codieren (Tabelle 1; Übersicht in: [9, 10]). Aufgrund möglicher Splicevarianten und unterschiedlicher posttranslationaler Modifikationen ist davon auszugehen, dass die Zahl der bekannten Selenoproteine noch weiter ansteigen wird. Durch Markierung mit ⁷⁵Se konnte gezeigt werden, dass Selenocystein in mehr als 25 verschiedene Proteine oder Proteinuntereinheiten eingebaut wird [11].

Tabelle 1. Bislang identifizierte eukaryotische Selenoproteine und deren physiologische Funktionen

<i>Bezeichnung</i>	<i>Vorkommen</i>	<i>nachgewiesene bzw. postulierte Funktionen</i>	<i>Referenzen</i>
Glutathionperoxidasen (GPx)			
cytosolische GPx (cGPx, GPx1)	ubiquitär	Antioxidanz	[3]
gastrointestinale GPx (GI-GPx, GPx2)	GIT, Leber, Tumorgewebe	Oxidationsschutz im GIT, Barriere gegen Hydroperoxidabsorption	[12, 13]
plasmatische GPx (pGPx, GPx3)	Plasma	Antioxidanz?	[14, 15]
Phospholipidhydroperoxid GPx (PHGPx, GPx4)	ubiquitär	Spermienreifung, Redoxregulation, Biomembranschutz	[16, 17]
Spermienkern-PHGPx (snGPx)	Testis	Spermienreifung	[18]
Thioredoxinreduktasen (TrxR)			
Thioredoxinreduktase 1 (TrxR1)	ubiquitär	Reduktion von Thioredoxin (Trx)	[19]
mitochondriale TrxR (TrxR2)	ubiquitär	Reduktion von Trx	[20-22]
testikuläre TrxR	Testis	Reduktion von Trx	[23]
TrxR-Homologe (SelZf1, SelZf2)	unbekannt	unbekannt	[24]
Dejodinasen (DI)			
Typ I Dejodinase (5'DI-I)	Schilddrüse, Leber, Niere, ZNS	T4 → T3, Inaktivierung von T3 und T4	[25]
Typ II Dejodinase (5'DI-II)	Schilddrüse, Hypophyse, Gehirn, braunes Fettgewebe, Plazenta	T4 → T3	[26]
Typ III Dejodinase (5-DI-III)	Haut, Plazenta, ZNS	Inaktivierung von T3 und T4	[27]
Selenophosphat-Synthetase 2 (SPS2)	ubiquitär	Selenophosphatsynthese	[28]
Selenoprotein P (SelP)	Plasma	Selentransport	[29, 30]
Selenoprotein W (SelW)	Muskel, Gehirn, Testis, Milz	unbekannt, Antioxidanz?	[31]
Selenoprotein X (SelX, SelR)	unbekannt	Methionin-Sulfoxidreduktase B	[24, 32, 33]
Selenoprotein N (SelN)	fötale Gewebe, Myoblasten	Muskelbildung?, Verhinderung von muskulärer Dystrophie	[24, 34]
Selenoprotein T (SelT)	unbekannt	unbekannt	[32]
15 kDa Selenoprotein (Sep15)	ubiquitär	Rolle von Sep15-Nukleotidpolymorphismus in der Krebsentstehung?	[35, 36]
Selenoprotein S (SelS)	unbekannt	Glucosehomöostase?	[8, 37]

1.1.2.2 Synthese von Selenoproteinen

Chambers et al. identifizierten 1986 in der cDNA der murinen cGPx das Triplet „UGA“ an der Stelle, wo man ein für Se-Cys codierendes Triplet erwartet hätte [38]. Diese Entdeckung widerlegte die bis dahin akzeptierte Universalität des genetischen Codes. Es öffnete sich ein neues Wissenschaftsfeld, das zunächst die Aufklärung der zellulären Mechanismen zum Ziel hatte durch welche zwischen UGA als Stoppcodon und UGA als für Se-Cys codierendes Triplet unterschieden wird. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Aminosäure Se-Cys und ihr zugehöriges Triplet UGA dem genetischen Code erst nachträglich hinzugefügt wurden [39].

Die Inkorporation von Se-Cys in Proteine ist ein cotranslationaler Prozess und konnte für Bakterien bereits weitgehend aufgeklärt werden [40]. Die bis heute bekannten, in Abb. 1 illustrierten Schritte der eukaryotischen Selenoproteinsynthese sind in verschiedenen Übersichtsartikeln dargestellt [7, 9, 39, 41] und werden an dieser Stelle nur kurz zusammengefasst.

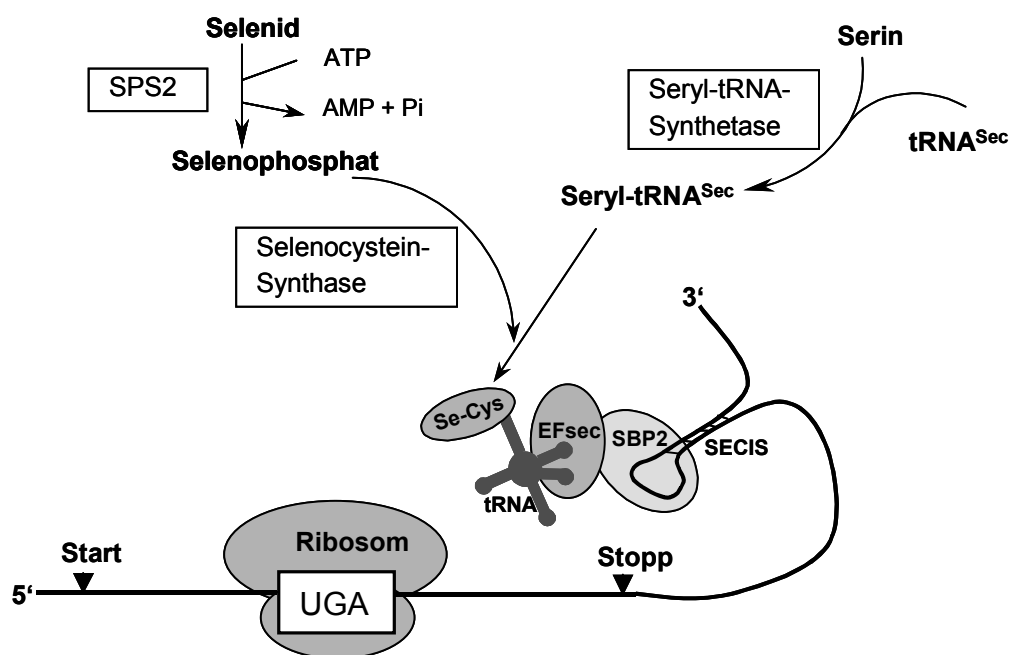


Abb. 1. Selenoproteinsynthese in Eukaryoten (nach: [7, 39, 41])

Sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten erfordert die Erkennung des UGA, als ein für Se-Cys codierendes Triplet, das Vorhandensein einer bestimmten Sekundärstruktur innerhalb der mRNA (SECIS = selenocysteine inserting sequence) sowie bestimmter Proteine, die mit dieser Sekundärstruktur interagieren. Im Gegensatz zu den Prokaryoten, bei welchen sich die SECIS in der codierenden Sequenz direkt hinter dem UGA befindet, ist diese in Eukaryoten in der 3'UTR lokalisiert. Für Bakterien scheint nur ein SECIS-bindendes Protein (SelB) erforderlich zu sein, wohingegen man in Eukaryoten bereits

zwei essentielle Proteine, das SBP-2 (SECIS-bindendes Protein 2) [42] und das mSelB [43], welches auch als eEFsec bezeichnet wird [44], identifiziert hat. Das SelB in Bakterien bzw. das eEFsec in Eukaryoten erkennt die mit Se-Cys beladene tRNA und dirigiert diese in Richtung UGA. Das eukaryotische SBP-2 ist an die Ribosomen assoziiert, bindet an die SECIS und interagiert mit eEFsec [45]. Die das Se-Cys tragende tRNA (in Bakterien SelC) wird zunächst von der Seryl-tRNA-Synthetase mit Serin beladen, das dann enzymatisch durch die Selenocystein-Synthase (in Bakterien SelA) in einen Selenocysteylrest umgewandelt wird. Als Selendonor verwendet die Selenocystein-Synthase das von der Selenophosphat-Synthetase (SPS2; in Bakterien SelD) aus Selenid und ATP gebildete Selenophosphat. Im Gegensatz zu den 20 übrigen Aminosäuren findet die Synthese von Se-Cys also erst an der entsprechenden tRNA statt und bedient sich einer anderen Aminosäure (Serin) als Gerüst. Der gesamte eukaryotische Selenoproteinsynthesekomplex wird auch als Selenosom bezeichnet.

1.1.2.3 Regulation der Selenoproteinexpression

Eine wichtige Voraussetzung für die Synthese von Selenoproteinen ist eine ausreichende Verfügbarkeit von Selen und von mit Se-Cys beladener tRNA. In Selenmangelsituationen kommt es zu einem vorzeitigen Abbruch der Selenoproteinsynthese, da die mit Se-Cys beladene tRNA nicht in ausreichendem Maße zur Verfügung stehen. Das für Se-Cys codierende Triplet UGA wird unter solchen Bedingungen wie ein Stoppcodon behandelt und die neu synthetisierte mRNA vermehrt abgebaut. Eine Selenunterversorgung der Zelle wirkt sich unterschiedlich auf die Synthese der einzelnen Selenoproteine aus. So wird die Synthese einiger Selenoproteine, wie z.B. der cGPx, schon sehr frühzeitig unterdrückt, wohingegen andere Selenoproteine, wie z.B. die GI-GPx oder die Dejodinasen, auch während eines länger andauernden Selenmangelzustandes noch in nahezu unveränderter Menge gebildet werden. Andererseits werden gerade diese „stabilen“ Proteine bei Selenresupplementierung als erste wieder auf ihr normales Expressionsniveau gebracht. Somit unterliegt die Selenoproteinsynthese bei limitiertem Selenangebot einer strikten Hierarchie. Diejenigen Proteine, die erst spät von einem Selenmangel betroffen sind, werden dementsprechend höher in der Hierarchie angesiedelt und scheinen gegenüber den anderen Selenoproteinen eine wichtigere Rolle im Organismus zu spielen [9, 39, 46]. Die Hierarchie der Selenoproteine manifestiert sich auch innerhalb der einzelnen Selenoproteingruppen. So steht beispielsweise in der Gruppe der Glutathionperoxidasen die GI-GPx an höchster Stelle, gefolgt von der PHGPx und dann gleichermaßen von pGPx und cGPx [13, 47]. Die jeweilige Stellung in der Hierarchie beruht auf der Stabilität der mRNAs im Selenmangel, welche wiederum zum Teil von der Beschaffenheit der 3'UTR, insbesondere der SECIS, bestimmt wird [48]. So

konnten die mRNAs der GI-GPx und der PHGPx durch einen Austausch ihrer 3'UTRs mit dem der cGPx instabil gemacht werden. Allerdings war es nicht möglich, die mRNA der cGPx durch das 3'UTR von GI-GPx oder PHGPx zu stabilisieren, was auf einen weitaus komplexeren Regulationsmechanismus hindeutet [49, 50]. Des Weiteren existieren Hinweise, dass das SBP2 eine unterschiedliche Affinität zu den verschiedenen SECIS-Elementen aufweist und somit die Hierarchie der Selenoproteine mitbestimmt [51].

Auch Organe werden einer Hierarchie entsprechend mit Selen versorgt. Beispielsweise sinkt im Selenmangel die Aktivität von Glutathionperoxidasen im Gehirn und in den reproduzierenden Organen erst viel später als in der Leber, den Nieren oder der Lunge [47].

Die Verfügbarkeit von Selen kann jedoch nicht der einzige Regulator der Selenoproteinsynthese sein. Für die Dejodinasen kennt man eine Regulation durch Schilddrüsen- und Sexualhormone sowie durch Gluco- und Corticosteroide [52]. Nicht alle Selenoproteine werden ubiquitär exprimiert, allerdings weiß man bisher nicht viel über eine gewebespezifische Regulation der Selenoproteine.

1.1.2.4 Glutathionperoxidasen (GPx)

Die Familie der Glutathionperoxidasen umfasst mindestens fünf Mitglieder, von denen es sich bei den vier folgenden um Selenoproteine handelt: die cytosolische oder klassische GPx (cGPx, GPx1), die gastrointestinale GPx (GI-GPx, GPx2), die plasmatische GPx (pGPx, GPx3) und die Phospholipidhydroperoxid GPx (PHGPx, GPx4). Mittlerweile wurde auch das Gen einer sechsten selenabhängigen GPx identifiziert, jedoch konnte bislang kein zugehöriges Protein nachgewiesen werden [8]. Die cGPx war das erste Selenoprotein, welches entdeckt wurde [3, 4], und ist bis dato das am meisten erforschte Selenoprotein. Alle Glutathionperoxidasen haben gemeinsam, dass sie in der Lage sind, Hydroperoxide (ROOH) unter Verbrauch von GSH oder einem anderen Thiol (z.B. Glutaredoxin oder Thioredoxin im Falle der pGPx oder Proteinthiole im Falle der PHGPx) zu den entsprechenden Alkoholen (ROH) zu reduzieren. Sie sind somit am Schutz von Makromolekülen und Biomembranen beteiligt (Reaktionsmechanismus siehe Abb. 2). Die vier Enzyme unterscheiden sich erheblich in ihrer Substratspezifität. GI-GPx und cGPx vermögen nur lösliche ROOH (H_2O_2 , Hydroperoxy-Fettsäuren) umzusetzen, wohingegen die PHGPx, und in geringerem Maße auch die pGPx, ROOH, die Bestandteil von komplexen Lipiden sind (z.B. PCOOH), umsetzen können. Die PHGPx kann darüber hinaus noch ROOH in Lipoproteinen, Cholesterolestern und Biomembranen als Substrat verwenden. Mit Ausnahme der PHGPx, bei welcher es sich um ein Monomer handelt, sind Glutathionperoxidasen Homotetramere. Sie enthalten pro Monomer ein aus Se-Cys, Glutamin und Tryptophan bestehendes aktives Zentrum [47, 53]. Neben der

unterschiedlichen Substratspezifität und Struktur weichen die einzelnen Enzyme auch hinsichtlich ihrer Lokalisation und wie diskutiert hinsichtlich ihrer Funktion und Regulation voneinander ab.

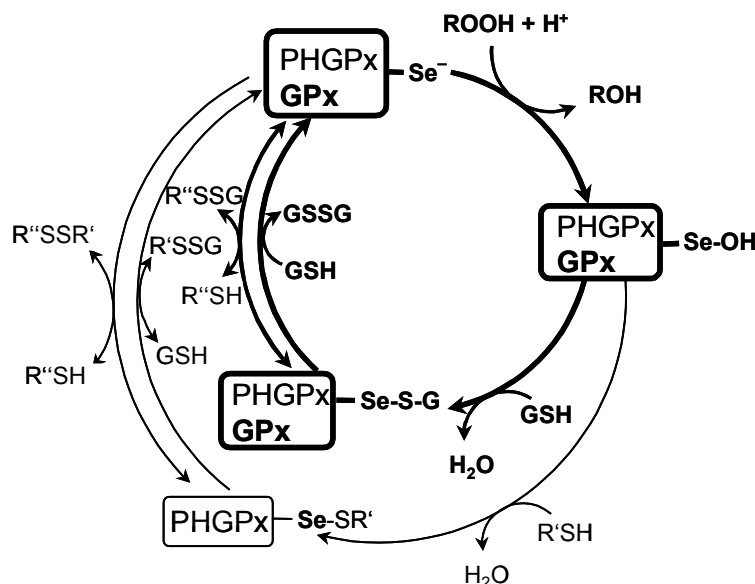


Abb. 2. Reaktionsmechanismus der Glutathionperoxidasen

Infolge der Reaktion mit ROOH wird die als Selenolat vorliegende GPx zur Selenensäure (R-Se-OH) oxidiert, welche anschließend durch zwei aufeinander folgende Reaktionen mit einem Thiol (GSH, R'SH) zur Ursprungsform reduziert wird. Die Thiole verlassen die Reaktion als GSSG, R'SSG oder R''SSR'' (nach: [46, 54]).

Da sich die vorliegende Arbeit vor allem mit der GI-GPx und der PHGPx beschäftigt, wird nachfolgend auf diese beiden Enzyme genauer eingegangen.

1.1.2.5 Gastrointestinale Glutathionperoxidase (GI-GPx)

Bei der GI-GPx handelt es sich um die zuletzt identifizierte GPx [12]. Bezüglich Sequenz und Substratspezifität ist sie der cGPx am ähnlichsten. Allerdings steht sie in der Hierarchie der Selenoproteine mit an höchster Stelle, weshalb von einer wichtigen Funktion dieses Enzyms auszugehen ist. In Nagetieren findet man die höchste GI-GPx-Expression im Epithel des Gastrointestinaltraktes (GIT) [55], beim Menschen wird sie außerdem in hohem Maße in der Leber exprimiert [12]. Dieses ungewöhnliche Verteilungsmuster führte dazu, dass man die Hauptaufgabe der GI-GPx zunächst im Abfangen schädlicher, in der Nahrung enthaltener oder im GIT gebildeter, ROS sah. Eine derartige Aufgabe der GI-GPx konnte in einem CaCo-2-Zellmodell demonstriert werden. Hierbei wurde gezeigt, dass im Falle eines Selenmangels mehr Hydroperoxide durch die Darmzellen permeieren konnten als unter Bedingungen bei denen ausreichend Selen für die Synthese der GI-GPx, jedoch nicht für die cGPx zur Verfügung stand [56]. Diese Barrierefunktion scheint jedoch bei weitem nicht die alleinige Funktion der GI-GPx zu sein. Insgesamt nimmt die GI-GPx in der Familie der Glutathionperoxidasen aus folgenden Gründen eine Sonderstellung ein: (i) Die mRNA der GI-GPx ist auch unter Selenmangelbedingungen extrem stabil und bestimmt dadurch die hohe Stellung der GI-GPx innerhalb der Hierarchie der Selenoproteine [13]. (ii) Aufgrund der hohen mRNA-Stabilität wird die

GI-GPx nach beginnender Selenresupplementierung als erste der Glutathionperoxidasen wieder resynthetisiert. Die Neusynthese der cGPx findet erst zu einem späteren Zeitpunkt statt [56]. (iii) Die Verteilung der GI-GPx im GIT ist nicht gleichmäßig, sondern weist Bereiche mit unterschiedlich starker Expression auf. So findet man GI-GPx vor allem in den Darmkrypten und in den Panethzellen des Dünndarms [57]. (iv) Unter bestimmten pathologischen Bedingungen ist die Expression der GI-GPx erhöht. Beispielsweise fand man eine hohe GI-GPx-Expression in humanen colorektalen Adenomen [57-59], sowie im Falle eines „Barrett-Ösophagus“ [60] und während der neoplastischen Transformation von squamösen Epithelzellen [61].

Ob die GI-GPx eine konkrete Funktion in der Cancerogenese erfüllt und ob es sich dabei um eine eher pro- oder eine anticancerogene Funktion handelt, wird zur Zeit kontrovers diskutiert (Übersicht in: [62]). GI-GPx-Knockout-Mäuse weisen, ähnlich wie cGPx-Knockout-Mäuse, keinen auffälligen Phänotyp auf [63], wohingegen cGPx/GI-GPx-Doppelknockout-Mäuse (GPx1/2-KO) sowohl Colitis [64] als auch Tumoren in den unteren Bereichen des GIT entwickeln [65].

1.1.2.6 Phospholipidhydroperoxid Glutathionperoxidase (PHGPx)

Die PHGPx nimmt insofern eine Sonderstellung ein, als sie, bedingt durch ihr niedrigeres Molekulargewicht und ihre Lipophilie, über ein weitaus größeres Substratspektrum als die übrigen Glutathionperoxidasen verfügt. Neben der 1982 von Ursini et al. identifizierten cytosolischen PHGPx [66] kennt man mittlerweile noch eine mitochondriale und eine nukleäre Form (Spermienkern-PHGPx, snGPx). Die mitochondriale PHGPx besitzt eine N-terminale Extension, die die mitochondriale Lokalisation bestimmt [67]. Diese Sequenz ist in den Mitochondrien nicht mehr vorhanden. Die nukleäre snGPx wird durch einen alternativen Promotor, der sich im ersten Intron befindet, reguliert und unterscheidet sich in der Sequenz ihres N-Terminus von den beiden anderen PHGPx-Formen [18]. Die PHGPx wird in fast allen Zellen, meist aber nur in geringen Mengen, exprimiert. Die mit Abstand höchste PHGPx-Expression findet man in den Testis, genauer gesagt im Mittelstück der Spermien. Hier fungiert die PHGPx als enzymatisch inaktives Strukturprotein und ist an der Bildung der mitochondrialen Kapsel beteiligt. Diese Kapsel besteht aus verschiedenen Proteinen, unter anderem PHGPx, die durch Disulfid-, Diselenid- oder Selendisulfidbrücken vernetzt sind [68]. Im Falle eines Selenmangels brechen die Spermien im Bereich des Mittelstückes, was eine verminderte Spermienmobilität zur Folge hat [69, 70]. Die PHGPx spielt also eine unersetzbare Rolle für die männliche Fertilität.

Wie bereits unter 1.1.2.4 erwähnt, kann die PHGPx auch mit anderen Proteinen, die über freie SH-Gruppen verfügen, interagieren. Aus der enzymatischen Reaktion der PHGPx

können deshalb, neben dem normalerweise gebildeten GSSG, auch gemischte Disulfide, bestehend aus Glutathion und einem anderen Protein (GSSR) bzw. aus zwei miteinander vernetzten Proteinen (RSSR'), entstehen (Abb. 2). Des Weiteren kann sich die PHGPx mit sich selbst oder mit anderen Proteinen vernetzen. Aufgrund ihrer Fähigkeit mit Proteinthiolen zu interagieren und diese zu modifizieren, schreibt man der PHGPx eine Rolle in der Regulation redoxsensitiver Signalkaskaden zu. Hierbei wäre es denkbar, dass sie die Aktivität bestimmter Transkriptionsfaktoren oder Rezeptoren moduliert [71]. Neben ihrer Funktion in der Spermatogenese gelten einige andere Funktionen als gesichert. So kann die PHGPx regulierend in die Synthese von Leukotrienen und Prostaglandinen eingreifen, indem sie die Aktivität der an der Leukotriensynthese beteiligten Lipoxygenasen (LOX) und der an der Prostaglandinsynthese beteiligten Cyclooxygenasen (COX) moduliert. Sowohl LOX als auch COX benötigen für ihre Aktivität einen bestimmten Hydroperoxidtonus, der von der PHGPx gesenkt wird [72-75]. Des Weiteren wirkt die mitochondriale PHGPx antiapoptotisch [76, 77].

Die Untersuchung der PHGPx-Funktion mit Hilfe von Knockout-Mäusen ist nicht möglich, da ein homozygoter PHGPx-Knockout embryonal letal ist. Heterozygote PHGPx-Knockout-Mäuse sind lebensfähig und zeigen keinen auffälligen Phänotyp [78, 79].

Aufgrund der von ihnen katalysierten Reaktionen sind Glutathionperoxidasen, vor allem jedoch die PHGPx, in der Lage, den zellulären Redoxstatus zu modulieren. Nachfolgend wird näher auf zwei verschiedene redoxregulierte Transkriptionsfaktorfamilien eingegangen, für welche eine Regulation durch Glutathionperoxidasen denkbar ist. Für den Transkriptionsfaktor NF- κ B wurde bereits eine Hemmung durch Überexpression der cGPx [80] bzw. PHGPx [81, 82] beschrieben.

1.2 Redoxensitive Transkriptionsfaktoren und Mechanismen der Genaktivierung

1.2.1 NF- κ B

Der Begriff NF- κ B („nuclear factor kappa-B“) umfasst eine Gruppe von strukturell verwandten und evolutionär konservierten Transkriptionsfaktoren mit insgesamt fünf Mitgliedern: p50, p52, p65 (RelA), cRel und RelB. Diese fünf Proteine verfügen über eine N-terminal konservierte Region von etwa 300 Aminosäuren, die sogenannte Rel-Homologiedomäne (RHD). p50 und p52 werden zunächst als größere Vorläufermoleküle (p105 und p100) synthetisiert, von denen später die C-terminale Region abgespalten wird. Die Untereinheiten p65, c-Rel und RelB besitzen eine Transaktivierungsdomäne, über die sie die Transkription ihrer Zielgene regulieren. P50 und p52, welchen eine derartige Transaktivierungsdomäne fehlt, sind hauptsächlich für die Bindung der Heterodimere an

die DNA verantwortlich (Übersicht in: [83, 84]). Um an die DNA binden zu können, müssen bestimmte Cysteine des NF- κ B in reduzierter Form vorliegen [85]. Eine Modifizierung der SH-Gruppen des p50, beispielsweise durch Glutathionylierung [86], Oxidation oder Alkylierung [87], führt zu einem Verlust der DNA-Bindefähigkeit. Die NF- κ B-Proteine bilden Dimere, bei welchen es sich um Homo- oder Heterodimere handeln kann. Von p50/p50- und p52/p52-Homodimeren weiß man, dass diese wegen der fehlenden Transaktivierungsdomäne die Transkription hemmen können. Alle anderen NF- κ B-Dimere aktivieren die Transkription. Die am häufigsten vorkommende und auch als klassisches NF- κ B bekannte Form ist ein Heterodimer bestehend aus den Untereinheiten p50 und p65. Nachfolgend wird die Bezeichnung „NF- κ B“ für dieses Dimer verwendet.

Unter normalen Umständen liegt NF- κ B im Cytosol vor, wo es von seinem Inhibitor I κ B, welcher die nukleäre Lokalisationssequenz des NF- κ B maskiert, fixiert wird. Verschiedene Substanzen (z.B. IL-1, TNF α) können eine NF- κ B-Aktivierung initiieren. Es ist davon auszugehen, dass der zelluläre Redoxstatus ein maßgeblicher Regulator der NF- κ B-Aktivierung ist. Die meisten der NF- κ B-aktivierenden Substanzen reagieren entweder selbst als Oxidanzien oder führen zu einer verstärkten Bildung von ROS, wie z.B. von Hydroperoxiden (ROOH). In manchen Zelllinien kann NF- κ B direkt durch H₂O₂ oder andere Hydroperoxide aktiviert werden. Andererseits lässt sich die NF- κ B-Aktivierung durch verschiedene Antioxidanzien unterdrücken (Übersicht in: [88]).

Während der NF- κ B-Aktivierung kommt es zunächst zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung des Kinasekomplexes IKK (I κ B-Kinase). Die aktivierte IKK phosphoryliert I κ B spezifisch an bestimmten Serinresten. Eine solche Phosphorylierung führt nachfolgend zur Ubiquitinierung und Degradation des I κ B. Das nun freie NF- κ B transloziert in den Zellkern, bindet an seine Konsensussequenz und aktiviert die Transkription seiner Zielgene (Abb. 3). Die NF- κ B-Konsensussequenz wurde beschrieben als 5'-GGGRnnYYCC-3' (R: Purin, Y: Pyrimidin, n: irgendein Nukleotid).

P65 muss an einigen Serinresten phosphoryliert werden, um ein Transaktivierungspotential zu besitzen [89, 90]. Von besonderer Bedeutung scheint hierbei Serin 276 zu sein [91]. Andere Arbeiten berichten zudem von einer induzierbaren Phosphorylierung an Serin 529 [92] und an Serin 536 [93]. Neben den beschriebenen Phosphorylierungen wird die NF- κ B-Aktivität und dessen Fähigkeit, mit verschiedenen Coaktivatoren und/oder Corepressoren zu interagieren, auch durch reversible Acetylierungen am p65 reguliert (Übersicht in: [94]). Die Histonacetyltransferasen CBP und p300 acetylieren p65 an verschiedenen Lysinresten, was die DNA-Bindung und Transaktivierungsaktivität erhöht und eine Reassoziierung von p65 mit neu synthetisiertem I κ B verhindert. Histondeacetylasen (HDAC) spalten die Acetylreste ab und lösen einen erhöhten Rücktransport von NF-

κ B ins Cytosol aus [95]. Die Regulation der NF- κ B-Aktivität ist somit sehr komplex und kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen: (i) auf Ebene der nukleären Translokation, welche von der Aktivität der IKK und dem Abbau von I κ B bestimmt wird; (ii) auf Ebene der DNA-Bindung, welche wiederum vom Vorhandensein freier SH-Gruppen am p50 abhängt und (iii) auf Ebene der Transaktivierungsaktivität, die unter anderem vom Phosphorylierungs- und Acetylierungszustand des p65 bestimmt wird.

NF- κ B-regulierte Gene codieren z.B. für inflammatorische Cytokine, für iNOS und COX-2, für Proteine, die in die Zellproliferation und Apoptose eingreifen, und auch für Zelladhäsionsmoleküle wie das VCAM-1.

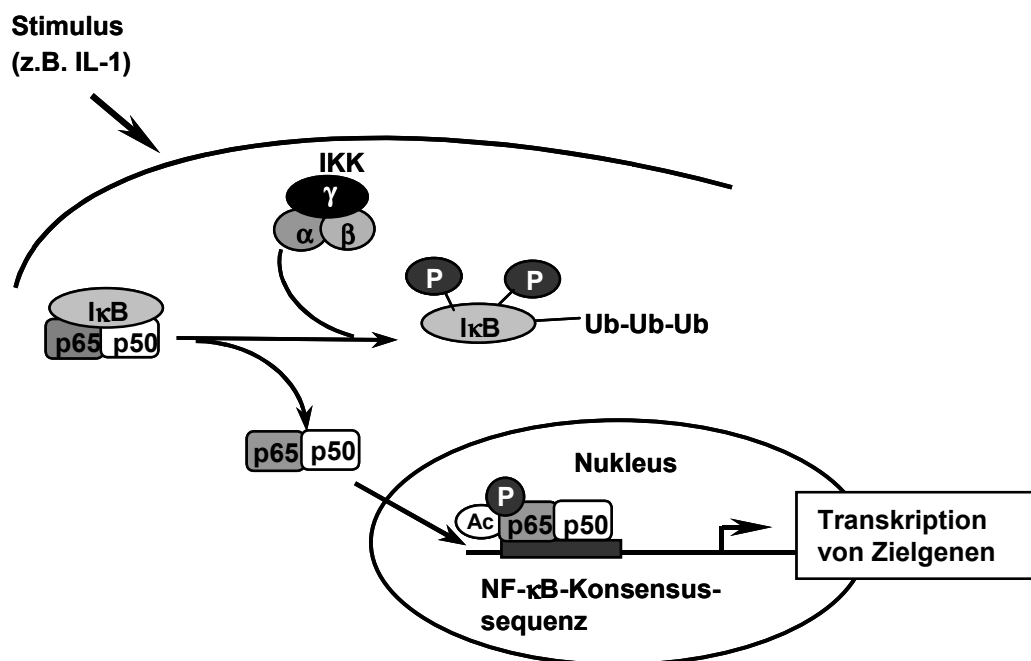


Abb. 3. Prinzip der NF- κ B-vermittelten Genexpression

1.2.2 Nrf2/Keap1

Der Transkriptionsfaktor Nrf2 („NF-E2-related factor 2“) gehört zur Familie der basischen Leucizippertranskriptionsfaktoren. Gene, die nachweislich einer Nrf2-abhängigen Expression unterliegen (z.B. NAD(P)H:Chinon Oxidoreduktase, γ -Glutamylcysteinsynthetase, Hämoxxygenase-1), haben gemeinsam, dass sie über das sogenannte „antioxidant response element“ (ARE) innerhalb ihrer Promotorregion verfügen. Die AREs sind sowohl für die basale als auch für die induzierte Expression dieser Gene verantwortlich (Übersicht in: [96, 97]).

Die ARE-Konsensussequenz wurde mit Hilfe von Mutationsanalysen charakterisiert und umfasst die Sequenz 5'-TGACnnnGC-3', wobei es sich bei „n“ um irgendein Nukleotid

handeln kann [97, 98]. Die Wirksamkeit des ARE wird außer von dieser ARE-Kernsequenz auch von deren 5'- und 3'-flankierenden Regionen mitbestimmt. Die erweiterte ARE-Konsensussequenz wurde folgendermaßen beschrieben [99]: T^A/CAnn^A/G^ATGA^C/TnnnGC^A/G^A/T^A/T^A/T. Nrf2 kann spezifisch an die ARE-Sequenz binden [100]. Die meisten der bislang identifizierten Nrf2-Zielgene codieren für Proteine, die über antioxidative und/oder detoxifizierende Eigenschaften verfügen. Die Bedeutung von Nrf2 für die Expression jener Gene wurde mit Hilfe von Nrf2-Knockout-Mäusen demonstriert, welche diese Gene auf deutlich niedrigerem Niveau exprimieren und eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber cancerogenen Substanzen zeigen [101].

Ohne Stimulus wird Nrf2 im Cytosol von einem cysteinreichen Protein, dem Keap1, zurückgehalten [102]. Keap1 reguliert außerdem die Stabilität des Nrf2, indem es dieses aktiv zur Ubiquitylierung und somit zur proteasomabhängigen Degradierung markiert [103, 104]. Keap1 wird seinerseits durch Wechselwirkungen mit den Aktinfilamenten des Cytoskelettes in der Zelle verankert [105]. In Keap1-Knockout-Mäusen findet man eine konstitutive nukleäre Akkumulation von Nrf2, die mit einer sehr hohen Expression typischer Nrf2-Zielgene verbunden ist. Eine Kreuzung dieser Mäuse mit Nrf2-Knockout-Mäusen machte den Phänotyp der Keap1-Knockout-Mäuse rückgängig [106].

Die Mechanismen, durch welche das Nrf2/Keap1-System Einfluss auf die Genexpression nimmt, wurden umfassend untersucht. Durch Behandlung mit einem stimulierenden Agens werden essentielle SH-Gruppen am Keap1 modifiziert, was eine Auflösung des Nrf2/Keap1-Komplexes zur Folge hat. Daraufhin transloziert Nrf2 in den Zellkern, bildet Heterodimere mit anderen basischen Leucizipperproteinen (z.B. mit Maf-Proteinen), bindet an die ARE-Sequenz und induziert die Transkription des entsprechenden Genes [107] (Abb. 4).

Elektrophile, aber ansonsten chemisch sehr unterschiedliche Substanzen können die SH-Gruppen des Keap1 modifizieren und Nrf2 somit aktivieren. Man unterscheidet hierbei neun verschiedene Substanzklassen (Übersicht in: [108, 109]): Isothiocyanate, Dithiolthione, oxidierbare Diphenole und Chinone, Michael-Akzeptoren, vicinale Dithiole, trivalente Arsenverbindungen, divalente Schwermetallkationen, Hydroperoxide sowie Carotenoide und andere konjugierte Polyene. Vier der 25 im Keap1 vorhandenen Cysteine weisen eine besonders hohe Reaktivität gegenüber diesen Substanzen auf [110], und für zwei davon wurde eine Bedeutung in der Keap1-abhängigen Ubiquitylierung von Nrf2 gezeigt [103].

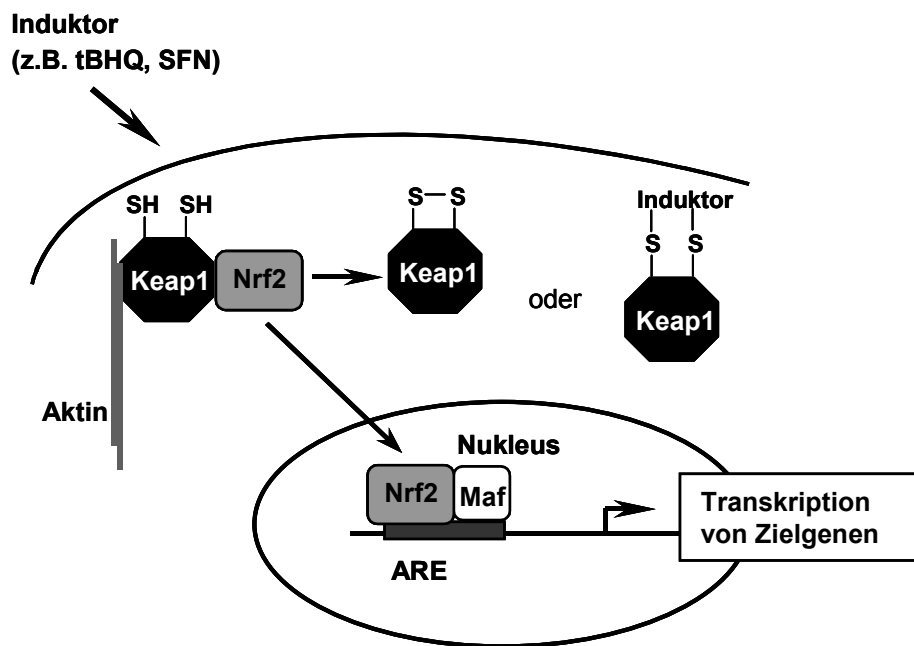


Abb. 4. Prinzip der Nrf2-vermittelten Genexpression

Die Anzahl der durch Nrf2 regulierten Gene nimmt stetig zu. In Microarrayanalysen von Nrf2-Knockout-Mäusen wurde gezeigt, dass die mRNA einer Glutathionperoxidase vermindert exprimiert wird. Allerdings wurde nicht angegeben, um welche der Glutathionperoxidasen es sich handelt [111]. Die GI-GPx mRNA war in Nrf2-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen mit induzierter Lungenfibrose vermindert [112, 113].

1.3 Glutathionperoxidasen bei Atherosklerose und Krebs

1.3.1 Atherosklerose

Atherosklerose ist die weltweit am häufigsten vorkommende Gefäßerkrankung und ist gekennzeichnet durch eine zunehmende Ablagerung von Lipiden und fibrösem Material in den Wandungen der Blutgefäße. Dies ist verbunden mit Elastizitätsverlust, Abnahme des Blutgefäßdurchmessers und eingeschränktem Blutfluss. Atherosklerosebedingte cardiovascular Erkrankungen und deren Folgeerscheinungen (z.B. Myocardinfarkt, Schlaganfall, Durchblutungsstörungen) stellen in den Industrieländern noch immer die häufigste Todesursache dar. Als wichtigste Risikofaktoren für die Entwicklung von Atherosklerose gelten Hypercholesterinämie, Hypertonie, Adipositas, Diabetes mellitus, Bewegungsmangel und Rauchen [114].

1.3.1.1 Pathogenese der Atherosklerose und Bedeutung von Adhäsionsmolekülen

Die ersten sichtbaren Anzeichen einer entstehenden Atherosklerose sind die sogenannten „fatty streaks“, bei welchen es sich um subendotheliale Lipidablagerungen, bestehend aus cholesterinreichen Makrophagen („Schaumzellen“), handelt. Derartige Läsionen bilden sich bevorzugt in Aortenabschnitten mit turbulentem Blutfluss. Die Entstehung atherosklerotischer Läsionen wurde vor allem an Tiermodellen untersucht und gliedert sich in die folgenden Phasen: Zunächst kommt es zur Ablagerung von Lipoproteinpartikeln in Bereichen der Tunica Intima wo das Endothel bereits Schädigungen aufweist. Diese Lipoproteine unterliegen verschiedenen Einflüssen und werden vor allem durch die von umliegenden Zellen gebildeten ROS oxidativ modifiziert. Innerhalb mehrerer Tage oder Wochen beginnen Monocyten an die Oberfläche des Endothels zu adhären und migrieren nachfolgend in den Subendothelialraum. Die Monocytenadhäsion wird durch eine verstärkte Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle (CAMs) vermittelt. Die infiltrierten Monocyten proliferieren, differenzieren zu Makrophagen und nehmen als solche die exzessiven modifizierten Lipoproteine auf, was wiederum zur Bildung von Schaumzellen führt. Weiterhin beginnen die in der Tunica Media lokalisierten glatten Muskelzellen (SMC) zu proliferieren und in die Tunica Intima einzuwandern. Die entstehenden sogenannten Plaques nehmen an Größe zu und werden von Bindegewebe durchsetzt (Übersicht in: [114, 115]).

Eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen ist ein frühes Ereignis in der Atherogenese. Der Eintritt von Monocyten in das Innere der Blutgefäßwand wird durch verschiedene Adhäsionsmoleküle, die auf der Oberfläche von Endothelzellen und SMC exprimiert werden, vermittelt. Zunächst bewegen sich die Monocyten in einer Art Rollbewegung entlang des Endothels. Diese ersten Interaktionen werden vor allem durch die CAMs P-Selectin und E-Selectin eingeleitet. Für eine feste Bindung zwischen Monocyt und Endothel sind das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül VCAM-1 und das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 verantwortlich [114]. VCAM-1 und ICAM-1 gehören beide zur Immunglobulin-Superfamilie und interagieren mit Integrinen auf der Oberfläche von Monocyten. Außer auf Endothelzellen werden VCAM-1 und ICAM-1 auch auf glatten Muskelzellen exprimiert. Die Funktion der CAMs in SMC wurde jedoch bislang noch nicht näher charakterisiert [116]. Obwohl beide CAMs in atherosklerotischen Läsionen vorzufinden sind, spricht man vor allem dem VCAM-1 eine Schlüsselstellung während den frühen Ereignissen der Atherogenese zu, was durch folgende Untersuchung in Mäusen zum Ausdruck kam: Eine Zerstörung der vierten VCAM-1-Immunglobulindomäne, welche für die Interaktion mit den Monocyten-Integrinen verantwortlich ist, resultierte in einer deutlich verringerten Läsionenbildung im Vergleich zu Wildtypmäusen. Im Gegensatz dazu hatte ein Mangel an ICAM-1 keinen Einfluss auf die Bildung früher Läsionen [117].

Da sich die vorliegende Arbeit vor allem mit VCAM-1 beschäftigt, wird nachfolgend genauer auf dieses Adhäsionsmolekül eingegangen. Die erste Erwähnung von VCAM-1 geht auf das Jahr 1989 zurück [118]. Strukturanalysen des humanen und murinen VCAM-1 ergaben, dass es sich um ein Glycoprotein, bestehend aus mehreren Immunglobulin-domänen (im Menschen 6 oder 7, in der Maus 3 oder 7) mit maximal zwei Integrinbindestellen, handelt, welches mit dem Integrin VLA-4 auf der Oberfläche von mononukleären Leukocyten (Monocyten, Lymphocyten) interagiert [119-121]. Die Expression von VCAM-1 ist durch Cytokine (IL-1, $\text{TNF}\alpha$) sowohl in Endothelzellen [118, 122, 123] als auch in SMC [124-127] auf mRNA- und Proteinebene induzierbar. Analysen des humanen [128] sowie des murinen [120] VCAM-1-Promotors ergaben das Vorhandensein von zwei potentiellen NF- κ B-Bindestellen. Darüber hinaus ist über die Regulation der VCAM-1-Expression bislang nichts Konkretes bekannt [129].

1.3.1.2 Glutathionperoxidasen und Atherosklerose

Ein andauernder subakuter Selenmangel galt lange Zeit als Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, allerdings konnte durch epidemiologische Studien bislang kein eindeutiger Zusammenhang aufgezeigt werden (zusammengefasst in [130]). Beispielsweise wurde von Salonen et al. berichtet, dass bei Serum-Selenwerten von weniger als 45 $\mu\text{g/l}$ das Myocardinfarktrisiko deutlich erhöht ist [131], wohingegen in einer kleineren, ähnlich angelegten Studie eine solche Korrelation nicht auf statistisch signifikantem Niveau gezeigt werden konnte [132]. Dennoch erscheint eine Verbindung zwischen mangelhafter Selenversorgung und der Entstehung von Atherosklerose vor dem Hintergrund, dass eine oxidative Modifikation von LDL-Partikeln einen Hauptrisikofaktor darstellt und Selenoproteine, genauer gesagt die Glutathionperoxidasen, aufgrund der von ihnen katalysierten Reaktionen die Entstehung solcher oxidierten LDL verhindern könnten, plausibel. Allerdings ist auch dieser Zusammenhang als kritisch zu betrachten, da die PHGPx, welche als Einzige in der Lage ist komplexe ROOH umzusetzen und Lipoxygenasen in ihrer Aktivität zu hemmen, in der Hierarchie der Selenoproteine sehr weit oben anzusiedeln ist und demzufolge erst relativ spät von einem Selenmangel betroffen wäre. Außerdem entstehen oxidierte LDL im Extrazellulärraum, die PHGPx wird jedoch nur intrazellulär exprimiert. Die übrigen Glutathionperoxidasen verfügen nicht über die nötige Substratspezifität, könnten aber an einem Schutz des vaskulären Endothels vor schädlichen Oxidanzien beteiligt sein [9].

1.3.1.3 Glutathionperoxidasen und Adhäsionsmoleküle

Trotz eingehender Bemühungen, die Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle im Blutgefäßsystem zu reduzieren, weiß man bisher nur wenig über mögliche regulatorische

Funktionen von Selen oder von einzelnen Selenoproteinen. Insgesamt ist jedoch von einer expressionshemmenden Wirkung auszugehen. So zeigten Zhang et al., dass die durch Cytokine induzierte Expression von CAMs auf der Oberfläche von Endothelzellen durch Vorbehandlung mit Natriumselenit gehemmt werden konnte [123]. Umgekehrt resultierte ein zellulärer Selenmangel in Endothelzellen in einer verstärkten Cytokin-induzierten Adhäsion von Neutrophilen [133]. Die genauen Mechanismen, durch welche das Selen diese Effekte erzielt, sind nicht bekannt. Allerdings ist eine Beteiligung von Glutathionperoxidasen wahrscheinlich. Diese Vermutung wird durch Berichte, dass die GPx-ähnliche Substanz BXT-51072 eine Cytokin-induzierte CAM-Adhäsion unterdrückt, bestärkt [134].

1.3.2 Glutathionperoxidasen und Krebs

Seit den 70-iger Jahren berichten epidemiologische Studien von einem inversen Verhältnis zwischen dem Selenstatus und der Krebsmortalität (Übersicht in: [130, 135]). Beispielsweise verglichen Schrauzer et al. [136] die alimentäre Selenaufnahme in 27 Staaten und korrelierten diese mit der Krebsmortalität, mit der Schlussfolgerung, dass Selen die Krebsmortalität, vor allem die von Colon-, Prostata-, Lungen-, Brust- und Eierstockkrebs, senkt. Eine niederländische Studie kam zu einem ähnlichen Ergebnis. Auch hier korrelierte ein niedriger Serum-Selenspiegel mit einer deutlich erhöhten Krebsinzidenz und –mortalität [137]. In den 90-iger Jahren konnten diese früher gemachten Beobachtungen bestätigt werden. So ergab eine epidemiologische Studie im Jahre 1998, dass Männer mit niedrigen Serum-Selenspiegeln ein deutlich erhöhtes Prostatakrebsrisiko aufweisen [138].

Bislang gab es nur wenige Interventionsstudien, die sich mit dem Zusammenhang von Selen und Krebsinzidenz und –mortalität befassten. Der in den USA durchgeführte „Nutritional Prevention of Cancer Trial“ (auch genannt „Clark-Studie“ nach dem verantwortlichen L.C. Clark) war die erste doppelblinde sowie placebokontrollierte Interventionsstudie in einem westlichen Industrieland. 1312 Personen, die zu einem früheren Zeitpunkt bereits erfolgreich gegen Hautkrebs therapiert wurden, bekamen für die Dauer von durchschnittlich 4,5 Jahren täglich 200 µg Selen in Form von Selenangereicherter Hefe verabreicht. Das ursprüngliche Anliegen der Clark-Studie war es, einen Einfluss von Selen auf das Wiederauftreten von Hautkrebs aufzuzeigen. Ein derartiger Zusammenhang konnte nicht hergestellt werden, allerdings fiel auf, dass die selensupplementierte Probandengruppe eine um 50% verminderte Gesamtkrebsmortalität und eine um 37% niedrigere Krebsinzidenz aufwies. Diese Effekte waren besonders ausgeprägt für das Auftreten von Prostata-, Colon- und Lungenkrebs [139]. Wie auch in früheren epidemiologischen Studien zum Ausdruck kam, waren die Effekte einer

Selensupplementation in Patienten mit einem zum Studienbeginn niedrigen Serum-Selenspiegel am deutlichsten ausgeprägt. Eine kürzlich veröffentlichte Metaanalyse aller Interventionsstudien bei denen Selen placebokontrolliert supplementiert wurde kam ebenfalls zu dem Schluss, dass Selen die Inzidenz von gastrointestinalem Krebs senkt. Für die Vitamine A, C und E konnten derartige Zusammenhänge nicht aufgezeigt werden [140].

Derzeit laufen zwei große Interventionsstudien mit dem Schwerpunkt Selen und Krebs. Der „Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial“ (SELECT) wird seit 2001 mit 32.800 männlichen US-Amerikanern durchgeführt, die für die Dauer von insgesamt 5 -12 Jahren mit täglich 200 µg Selenomethionin und/oder 400 IU alpha-Tocopherolacetat supplementiert werden. Die europäische PRECISE-Studie („Prevention of Cancer by Intervention with Selenium“) befindet sich derzeit in der Pilotphase mit 500 Personen, soll aber auf 33.000 Probanden ausgeweitet werden.

Ob die beobachteten anticancerogenen Eigenschaften von Selen auf eine erhöhte Biosynthese von Selenoproteinen zurückzuführen sind, ist fragwürdig. Die Menge des in den Studien verabreichten Selens (meist 200 µg) ist deutlich höher als die Menge, die nötig wäre, um ausreichend Selen für die Synthese aller bekannten Selenoproteine zur Verfügung zu stellen. Ebenso wäre es denkbar, dass durch hohe Selengaben der Abbau von cancerogenen Substanzen positiv beeinflusst wird [135]. Bislang konnte der verantwortliche Selenmetabolit nicht identifiziert werden, jedoch scheint das für die Selenoproteinsynthese benötigte Selenid für die anticancerogenen Effekte nicht zwingend erforderlich zu sein [141]. Selenverbindungen mit einer Methylgruppe (z.B. Methylselenol, Selenomethylselenocystein) zeigten sich als besonders wirksam, wohingegen mit Selenverbindungen, die über drei Methylgruppen verfügen, keine anticancerogenen Effekte erzielt werden konnten (Übersicht in: [141]). Bis dato liegen keine eindeutigen Daten vor, die sich mit dem Einfluss von Glutathionperoxidasen auf die Cancerogenese befassen.

1.4 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit lässt sich in den Komplex „Funktionen von Selenoproteinen“ einordnen. Von besonderem Interesse waren hierbei die gastrointestinale Glutathionperoxidase (GI-GPx) sowie die Phospholipidhydroperoxid Glutathionperoxidase (PHGPx). Im Vergleich zu den übrigen Glutathionperoxidasen ist über die GI-GPx, vor allem über deren transkriptionale Regulation, bislang nur wenig bekannt. Ausgehend von den Beobachtungen einer erhöhten GI-GPx-Expression in Krebszellen und humanen Darmtumoren sollte der Promotor der GI-GPx charakterisiert, die wichtigsten Trans-

kriptionsfaktoren identifiziert und deren Funktionalität untersucht werden. Methodisch sollten diese Fragen zunächst mit Promotordeletionskonstrukten in Reportergerneversuchen und später auf mRNA- und Proteinebene beantwortet werden. Die hierbei erlangten Erkenntnisse sollten zu einem besseren Verständnis der selenunabhängigen GI-GPx-Expression in normalen und in Tumorgewebe beitragen.

Die PHGPx nimmt aufgrund ihres breiten Substratspektrums und ihrer postulierten aber wenig bewiesenen Fähigkeit, freie SH-Gruppen in Proteinen zu modifizieren, eine Sonderstellung innerhalb der Familie der Glutathionperoxidase ein. Der zelluläre Redoxstatus und das davon abhängige Vorhandensein freier SH-Gruppen sind wichtige Regulatoren für verschiedene Signalkaskaden. Hydroperoxide, welche als Substrat für Glutathionperoxidase fungieren, erfüllen ebenfalls regulatorische Aufgaben in der Signaltransduktion. Aufgrund dieser Tatsachen ist es denkbar, dass die PHGPx die Expression verschiedener Gene, die unter Kontrolle redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren stehen, reguliert und somit auf die Entstehung und/oder Progression verschiedener pathologischer Zustände, die mit dem Redoxstatus der Zelle im Zusammenhang stehen sollen (z.B. Atherosklerose), einwirken kann. Mit Hilfe eines PHGPx-überexprimierenden Zellsystemes sollte eine Beeinflussung des zellulären Redoxstatus sowie die Expression von atheroskleroserelevanten Adhäsionsmolekülen untersucht werden.

Es wurde erwartet, dass durch solche Untersuchungen auch mehr über die Rolle des essentiellen Spurenelementes Selen als integraler Bestandteil von zwei wichtigen Selenoproteinen in Erfahrung gebracht werden könnte.

2 METHODEN

2.1 Zellkultur

Mit folgenden Zelllinien wurden experimentelle Arbeiten durchgeführt:

Tabelle 2. Zelllinien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zelltyp</i>	<i>Bezugsquelle</i>
HepG2	humane epitheliale Lebercarcinomzelllinie	ATCC HB8065
CaCo-2	humane epitheliale Colonicarcinomzelllinie	DSMZ ACC 169
SMC	glatte Aortenmuskelzelle aus Kaninchen	[142]
SMC ^{PHGPx}	SMC, die die PHGPx stabil überexprimieren	[82]
ECV ^{pcDNA3}	ECV304-Zellen (humane epitheliale Nierencarcinomzellen), welche das Expressionsplasmid pcDNA3 stabil überexprimieren	[143]; #
ECV ^{PHGPx}	ECV304, die die PHGPx stabil überexprimieren	#

zur Verfügung gestellt von Dr. D. Kupper, DIFE, Abt. BIM

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂-Partialdruck und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre in den folgenden Medien und unter Verabreichung der angegebenen Zusätze:

HepG2: RPMI 1640 mit 10% FCS, 2 mM L-Alanyl-L-Glutamin, pH 7,1

CaCo-2: DMEM-high-glucose mit 10% FCS, 1% nicht-essentielle Aminosäuren, pH 7,3

ECV304: M199 mit 5% FCS, 0,68 mM L-Glutamin, 0,22% NaHCO₃, 5 mM HEPES, pH 7,1

SMC: DMEM-low-glucose mit 10% FCS, 2 mM L-Alanyl-L-Glutamin, pH 7,3

Zusätzlich wurden alle Zellkulturmedien mit 50 U/ml (ECV304) bzw. 100 U/ml (SMC, HepG2, CaCo-2) Penicillin sowie 50 µg/ml (ECV304) bzw. 100 µg/ml (SMC, HepG2, CaCo-2) Streptomycin versetzt. Alle Zellkulturreagenzien, mit Ausnahme des FCS, wurden von Gibco (Karlsruhe) bezogen. Des Weiteren wurden die Medien zur Selektion der stabil transfizierten Zellen während deren Erhaltung mit 400 µg/ml (SMC^{PHGPx}) bzw. 800 µg/ml (ECV^{pcDNA3}, ECV^{PHGPx}) Geneticin (Calbiochem, Schwalbach) versehen. Alle 3 – 4 Tage erfolgte eine Umsetzung der Zellen durch Trypsinieren (0,05% Trypsin, 0,53 mM EDTA in PBS [140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 3 mM KH₂PO₄, pH 7,4]), wobei sich die Zellen für maximal 12 (SMC) bzw. 30 (HepG2, CaCo-2, ECV304) Passagen in Kultur befanden. Das verwendete FCS entstammte einer Charge, welche nur über einen sehr geringen Selengehalt verfügte (Chargennummer: 40F9314K; Biochrom, Berlin). Zur Repletion der zellulären Selenversorgung wurden die Zellen mit 50 nM (HepG2, ECV304, CaCo-2) bzw. 100 nM (SMC) Natriumselenit (Sigma, Taufkirchen) supplementiert.

Für Stimulationsexperimente wurden die Substanzen Interleukin-1 β (IL-1; GBF, Braunschweig), Sulforaphan (SFN; Alexis, Grünberg), *tert*-Butylhydrochinon (tBHQ; Sigma) und Curcumin (CUR; Sigma) in nicht toxischen Mengen eingesetzt.

2.2 RNA-Isolierung und reverse Transkription

Die jeweiligen Zellen wurden in 6-well-Platten kultiviert und durch Trypsinieren geerntet. Die Extraktion der gesamten zellulären RNA erfolgte mit Hilfe eines Invisorb Spin Cell RNA Mini Kit (InViTek, Berlin) nach Anweisung des Herstellers. Je 3 μ g RNA wurde durch Verwendung von Oligo(dT)15-Oligonukleotiden und einer Moloney's murine leukemia virus RNase H⁻ reversen Transkriptase (Promega, Mannheim) für 2 h bei 37°C in cDNA umgeschrieben.

2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.3.1 Standard-PCR mit densitometrischer Auswertung

PCRs wurden in 25 μ l-Ansätzen durchgeführt. Jeder Ansatz enthielt 25 pmol der entsprechenden Oligonukleotide (siehe Tabelle 3), 200 μ M dNTP-Mischung, 0,625 U Taq DNA-Polymerase (Promega, Mannheim), 2,5 μ l 10 x Reaktionspuffer, 0,5 mM (für GI-GPx-PCR), 1 mM (für Hämoxygenase- und β -Actin-PCR) bzw. 2 mM (für alle anderen PCRs) MgCl₂ und 60 – 120 ng RNA-Äquivalente. Alle PCRs wurden unter den folgenden Temperaturbedingungen durchgeführt:

- Denaturierung: 94°C, 4 min
- 23 – 30 Zyklen bestehend aus:
 - Denaturierung: 94°C, 40 s
 - Hybridisierung: T_A (Tabelle 3), 30 s
 - Elongation: 72°C, 2 min
- abschließende Elongation: 72°C, 10 min
- Abkühlung auf 4°C

Die optimale Hybridisierungstemperatur und die Anzahl der Zyklen wurden für jede PCR individuell bestimmt. Zur Analyse wurde ein Aliquot von 10 μ l auf ein Agarosegel aufgetragen, das Gel nach Abschluss der Elektrophorese mit Ethidiumbromid (5 μ g/ml in 1 x TBE; Sigma, Taufkirchen) gefärbt und die DNA mittels UV-Licht an einem GelDoc2000 (BioRad, München) sichtbar gemacht. In einigen Fällen wurde das erhaltene PCR-Produkt aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA zur Weiterverarbeitung mit Hilfe eines Gelextraktionskits (Invitex, Berlin) isoliert.

2.3.2 Real Time PCR

Real Time PCRs zur Erfassung der VCAM-1-Expression in SMC und SMC^{PHGPx} wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®]Green (Invitrogen, Karlsruhe) in einem iCycler (BioRad, München) durchgeführt. Die Reaktionsansätze und Temperaturbedingungen waren identisch zur Standard-PCR. Die Quantifizierung der erhaltenen PCR-Produkte erfolgte nach der komparativen Methode [144], wonach sich die Menge des Zielgens VCAM-1, bezogen auf das Kontrollgen GAPDH und relativ zu einem Kalibrator aus der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ergibt. Hierbei ist Ct die Nummer des PCR-Zyklus, bei welchem das Fluoreszenzsignal des PCR-Produktes einen arbiträren Schwellenwert innerhalb der exponentiellen Phase der PCR überschreitet. Der Wert für $\Delta\Delta Ct$ berechnet sich wie folgt:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{VCAM-1 \text{ unbekannte Probe}} - Ct_{GAPDH \text{ unbekannte Probe}}) - (Ct_{VCAM-1 \text{ Kalibrator}} - Ct_{GAPDH \text{ Kalibrator}}).$$

Als Kalibrator dienten unbehandelte Wildtyp-SMC.

Tabelle 3. PCR-Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	Hybridisierungs-Temperatur T_A (°C)	Genbank-nummer (falls vorhanden)
AP1	gta ata cga ctc act ata ggg c	67	-
AP2	act ata ggg cac gcg tgg t	67	-
β -Actin up	caa gag atg gcc acg gct gct	60	X00351
β -Actin down	tcc ttt gca tcc tgt cgg ca	60	X00351
GAPDH up	ggg ctg ctt tta act ctg	56	L23961
GAPDH down	aga tga tga ccc ttt tgg	56	L23961
GI-prom up	cca ctg aat tgg att cac tgg agg	63	AL139022
GI-prom down	ttg gca atg aaa cgc gtg gtg aag	63	AF199441
GI-prom Mut up	gga cct gtt ttt tat aag tca tcc tgg	63	AF199441
GI-prom Mut down	cca gga tga ctt ata aaa aac agg tcc	63	AF199441
GI-GPx up	ggc ttt cat tgc caa gtc ctt c	63	X53463
GI-GPx down	cta tat ggc aac ttt aag gag gcg c	63	X53463
RACE GSP1	tgc aat cat cat cca aag tag agt tg	67	AY212510
RACE GSP2	act cca aag acc agg acc atc ttc	67	AY212510
HO-1 up	gag att gag cgc aac aag ga	60	BC001491
HO-1 down	agc ggt aga gct gct tga act	60	BC001491
RACE GSP1	cat caa tat gta act tgg cct gac	63	AY212510
RACE GSP2	cac tgg caa agt tct tgt ttg tca	63	AY212510
VCAM-prom-down	acc atc ttc cca cgc gtt tta aat agc t	67	AY699272
VCAM-prom-I up	ctc ttc tga gag gta ccg gga ggc atg	67	AY699272
VCAM-prom-II up	act ata ggc acg cgt ggt	67	AY699272
VCAM-prom-III up	tga gtc atc tga cgc gtg atc taa at	67	AY699272
VCAM-prom-IV up	agt gtc tgt aac gcg ttt ttc cct ggc t	67	AY699272
VCAM-prom-V up	ctg gcc cgg gtt tac gcg tga agg gat t	67	AY699272
VCAM-prom-VI up	ctt gca aca aga cgc gtt ata aag agc a	67	AY699272
VCAM κ B-5'-Mut-up	ggc tct ggc ccg agt ctc gcc ttg aag gg	67	AY699272
VCAM κ B-5'-Mut-do	ccc ttc aag gcg aga ctc ggg cca gag cc	67	AY699272
VCAM κ B-3'-Mut-up	tga aga gat ctc gct cct cct ctt gc	67	AY699272
VCAM κ B-3'-Mut-do	gca aga gga gga gcg aga tct ctt ca	67	AY699272
VCAM up	acc ttc atc cct acc att gaa ga	57	NM001078
VCAM down	tta aac ttc tta att gtg agc caa c	57	NM001078

2.4 Klonierung von PCR-Produkten und synthetischen Oligonukleotiden

2.4.1 TA-Klonierung

Das Prinzip der TA-Klonierung beruht auf der Tatsache, dass einige DNA-Polymerasen am 3'-Ende des PCR-Produktes einen Desoxyadenosin-Überhang bilden und man diese Produkte direkt in einen linearisierten Vektor mit dazu komplementären Desoxythymidin-Überhängen klonieren kann. Die TA-Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor pCR-II-Topo erfolgte mit einem TOPO TA-Cloning®-Kit (Invitrogen, Karlsruhe) nach Anweisung des Herstellers.

2.4.2 Ligation mit T4-Ligase

PCR-Produkte oder synthetische Oligonukleotide mit geeigneten Schnittstellen wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (alle von NEB, Frankfurt) geschnitten und mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase (NEB) für 12 h bei 16°C in einen Zielvektor, der ebenfalls mit den entsprechenden Restriktionsenzymen behandelt wurde, ligiert.

2.4.3 Transformation in *E. coli*

Plasmid-DNA wurde in kompetente *E. coli* vom Typ Top10 transformiert. Die Herstellung dieser kompetenten *E. coli* erfolgte, ausgehend von einer 250 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von etwa 0,5 durch 30-minütige Inkubation des abzentrifugierten Bakterienpellets mit 30 ml CaCl₂ (100 mM) auf Eis. Das nach erneuter Zentrifugation (7 min, 5.000 g, 4°C) erhaltene Pellet wurde in 5 ml CaCl₂ (100 mM), 15% (v/v) Glycerin aufgenommen und in Aliquots von 50 µl bis zur Nutzung bei -80°C eingefroren. Zur Transformation wurde die Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut, die Plasmid-DNA zugegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein 30-sekündiger Hitzeschock bei 42°C, wonach die Reaktionsansätze sofort auf Eis gestellt und mit 250 µl SOC-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) versetzt wurden. Nach einer 1-stündigen Schüttelphase bei 37°C wurden die Transformationsansätze auf S1-Agarplatten (Standard I-Nähragar; Merck, Darmstadt), welche zur Selektion 100 µg/ml Ampicillin (Roth, Karlsruhe) enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Im Falle einer „Blau-Weiss-Selektion“, basierend auf der Umsetzung von X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid) durch das Enzym β-Galactosidase, wurden die Agarplatten zuvor noch mit je 70 µl X-Gal (40 mg/ml in DMF; Roth, Karlsruhe) bestrichen. Erhaltene weiße Klone wurden gepickt und über Nacht in 5 ml ampicillinhaltigem S1-Medium (Standard I-Nährbouillon; Merck, Darmstadt) angezogen. Nach Überprüfung der Richtigkeit der gewünschten Klone wurden diese bei -80°C in S1-Medium mit 5% DMSO gelagert.

2.4.4 Plasmidisolierung und Sequenzierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Übernachtskulturen erfolgte mit Plasmid Mini- bzw. Midi-Kits (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers.

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde extern durch die Firma MWG-Biotech (Ebersberg) durchgeführt.

2.5 Isolierung, Mutation und Analyse von Genabschnitten

2.5.1 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Die vollständige cDNA-Sequenz und der Transkriptionsstart des Kaninchen-VCAM-1 wurden mittels „Rapid Amplification of cDNA Ends“ (RACE) unter Verwendung eines SMART RACE cDNA Amplification Kits (Clontech, Heidelberg) nach Anweisung des Herstellers ermittelt. Ausgehend von einem, im mittleren Bereich der VCAM-1 cDNA liegenden, Abschnitt mit bereits bekannter Sequenz wurden genspezifische Primer synthetisiert (RACE GSP1 und -2; Tabelle 3) und für die RACE-Reaktion in 5'- bzw. in 3'-Richtung eingesetzt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mittels TA-Klonierung (siehe 2.4.1) in den Vektor pCR-II-Topo kloniert, in *E. coli* transformiert und die isolierte Plasmid-DNA sequenziert (siehe 2.4.4).

Basierend auf der erhaltenen cDNA-Sequenz wurde von Seiten der Firma Pineda (Berlin) eine Epitopanalyse durchgeführt. Das zur Antikörpersynthese ausgewählte Epitop umfasst eine Länge von 15 Aminosäuren (NH₂-CMMKNKEFLEEDKK-COOH) und befindet sich im Bereich der fünften Immunglobulin-domäne. Der gewünschte Antikörper wurde in einer Ziege hergestellt und das gewonnene Serum aufgereinigt (Pineda, Berlin).

2.5.2 “Genome Walking” zur Charakterisierung unbekannter Genabschnitte

Die erstmals von Siebert et al. [145] detailliert beschriebene Methode des „Genome Walkings“ ermöglicht es, unbekannte Genabschnitte zu amplifizieren. Aus 15×10^6 SMC-Zellen wurde die genomische DNA isoliert (DNA-Mini-Kit; Qiagen, Hilden), in vier gleich große Ansätze aufgeteilt und mit verschiedenen Restriktionsenzymen (*Sma I*, *Hinc II*, *EcoR V*, *Sca I*), welche glatte Enden generieren, behandelt. Je nach Häufigkeit der Restriktionsschnittstellen innerhalb der genomischen DNA erhält man hierdurch in den verschiedenen Ansätzen unterschiedlich lange DNA-Fragmente. Nachfolgend wurden die, zuvor mit Phenol und Chloroform aufgereinigten, Spaltansätze an einen DNA-Adapter ligiert. Bei dem DNA-Adapter handelte es sich um ein kurzes Fragment doppelsträngiger DNA mit bekannter Sequenz (adaptor fwd: 5'-gtaatacgactcactatagggcagcgcgtggc-gacggcccgggctgg-3', adaptor rev: 5'-accagccc-NH₂-3'). Der erhaltene Ligationsansatz wurde anschließend in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Voraussetzung für die PCR ist das Vorhandensein eines kurzen DNA-Abschnittes mit bekannter Sequenz, der sich in der

Nähe des zu untersuchenden DNA-Abschnittes befinden muss. Diese Voraussetzung muss erfüllt sein, um die Synthese von für die Amplifikation des unbekanntem DNA-Abschnittes nötigen spezifischen Primern zu gewährleisten. Als Primer wurden je ein Oligonukleotid, welches komplementär zur Adaptorsequenz (AP1) und ein Oligonukleotid, das spezifisch für die VCAM-1 cDNA ist (GSP1), eingesetzt. Um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen, wurde, ausgehend vom Reaktionsansatz der ersten PCR, zusätzlich eine zweite PCR (nested PCR) mit einem weiteren Primerpaar (AP2, GSP2) durchgeführt (Primer siehe Tabelle 3). Erhaltene PCR-Produkte wurden mittels TA-Klonierung (siehe 2.4.1) in den Vektor pCR-II-Topo kloniert und sequenziert. Die Sequenz des längsten Fragmentes wurde unter der Genbanknummer AY699272 veröffentlicht.

2.5.3 Generierung von Deletionskonstrukten

Um die für die Genexpression essentiellen Bereiche des VCAM-1-Promotors identifizieren zu können, wurden, ausgehend vom längsten Promotorfragment, fünf weitere verkürzte Varianten des Promotors mittels PCR hergestellt, so dass am Ende sechs unterschiedlich lange Promotorkonstrukte zur weiteren Analyse zur Verfügung standen. Diese wurden in den Luciferasereportervektor pGL3-basic (Promega, Mannheim) kloniert. Um die Ligation in den Vektor pGL3-basic zu ermöglichen, wurden die verwendeten PCR-Oligonukleotide so gewählt, dass eine *Mlu I*- oder eine *Kpn I*-Schnittstelle am 5'-Ende sowie eine *Mlu I*-Schnittstelle am 3'-Ende des PCR-Produktes inkorporiert wurde. Die Richtigkeit der entstandenen Klone wurde durch Sequenzierung verifiziert.

2.5.4 Zielgerichtete Mutagenese von Promotoren

Um zielgerichtet Punktmutationen innerhalb des VCAM-1- bzw. des GI-GPx-Promotors im Bereich der NF- κ B- bzw. Nrf2-Bindestellen einzufügen, wurde die Methode der "overlap-extension-PCR" [146] gewählt. Bei dieser Methode werden insgesamt je drei PCR-Reaktionen durchgeführt, wobei durch die verwendeten Oligonukleotide während PCR1 und PCR2 die gewünschten Mutationen in den oberen bzw. unteren DNA-Doppelstrang eingefügt wurden. Die in PCR1 und PCR2 erhaltenen Fragmente verfügen über einen kurzen, die Mutation enthaltenden, Bereich mit identischer Sequenz und können somit jeweils als Primer füreinander fungieren. Diese Fragmente dienten deshalb als Ausgangsprodukte für die dritte PCR. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden ebenfalls in den Vektor pGL3-basic kloniert und die Richtigkeit durch Sequenzierung überprüft.

2.5.5 Computer-unterstützte Analyse genomischer DNA

Die Sequenzen des Kaninchen-VCAM-1-Promotors und des humanen GI-GPx-Promotors wurden hinsichtlich der potentiell darin vorhandenen Transkriptionsfaktorbindestellen

untersucht. Hierfür wurden die Sequenzen mit Hilfe des Computerprogrammes „MatInspector“ [147], welches im Internet unter www.genomatix.de zur Verfügung steht, analysiert.

2.6 Reportergenanalysen

2.6.1 Plasmide

Für Transfektionsexperimente wurden folgende Plasmide eingesetzt:

VCAM-1-Promotorkonstrukte in pGL3-basic wurden wie unter 2.5.3 beschrieben hergestellt. GI-GPx-Promotorkonstrukte in pGL3-basic wurden von Dr. Z. Zhou (DIFE, Abt. BIM) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid κ B-tk-Luc enthält ein responsives Element für den Transkriptionsfaktor NF- κ B und wurde folgendermaßen konstruiert: Das entsprechende doppelsträngige Oligonukleotid (siehe Tabelle 4) wurde in die *EcoR I*-Schnittstelle des Plasmides pBluescript II KS(+) (Stratagene, USA) kloniert. Das daraus resultierende Konstrukt wurde mit *Hind III* und *BamH I* verdaut und das entstandene Fragment zwischen die *Hind III*- und *BamH I*-Schnittstelle des Plasmides PPRE3-tk-Luc [148], aus welchem das PPRE-Oligonukleotid zuvor mit *Hind III* und *BamH I* herausgeschnitten wurde, kloniert. Das Plasmid PPRE3-tk-Luc wurde freundlicherweise von Dr. L. Nagy (Universität Debrecen, Ungarn) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid tk-Luc ist das entsprechende Kontrollplasmid ohne responsives Element und wurde aus PPRE3-tk-Luc nach Entfernen des PPRE-Oligonukleotides, Auffüllen der überstehenden Enden und Religation gewonnen. Die Plasmide HO-ARE-pGL, GI-ARE-1-pGL und GI-ARE-2-pGL enthalten jeweils ein sogenanntes ARE (antioxidant response element) und wurden gewonnen, indem die entsprechenden doppelsträngigen Oligonukleotide (siehe Tabelle 4) zunächst zwischen die *EcoR I* und *Hinc II*-Schnittstellen des pBluescript II KS(+) und anschließend in die *Sma I* und *Xho I*-Schnittstelle des Vektors pGL3-promoter (Promega, Mannheim) kloniert wurden. Die Expressionsplasmide pcDNA3-mNrf2 und pcDNA3-mKeap1, die die komplette cDNA des murinen Nrf2 bzw. Keap1 enthalten, wurden von Dr. M. Yamamoto (Universität Tsukuba, Japan) zur Verfügung gestellt. Als Kontrolle diente das leere Expressionsplasmid pcDNA3 (Invitrogen, Karlsruhe). Die β -Galactosidase-Plasmide pCH-110 (Amersham Biosciences, Freiburg) bzw. pSV- β -Galactosidase (Promega, Mannheim) wurden zur Normierung der Transfektionseffizienz verwendet (pCH-110 für SMC und ECV304; pSV- β -Galactosidase für HepG2 und CaCo-2). Zur besseren Übersicht sind alle Plasmide und die darin inklonierten DNA-Fragmente in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4. Plasmide und Oligonukleotide

Plasmid	kurze Beschreibung
pGL3-basic	leerer Luciferase-Reportergenvektor ohne Promotor
GI-prom-I	pGL3-basic mit 2111 bp des GI-GPx-Promotors
GI-prom-II	pGL3-basic mit 1589 bp des GI-GPx-Promotors
GI-prom-III	pGL3-basic mit 1258 bp des GI-GPx-Promotors
GI-prom-IV	pGL3-basic mit 879 bp des GI-GPx-Promotors
GI-prom-V	pGL3-basic mit 302 bp des GI-GPx-Promotors
GI-prom-VI	pGL3-basic mit 172 bp des GI-GPx-Promotors
GI-prom-I-mut	GI-prom-I mit Punktmutation im Bereich des GI-ARE-2
VCAM-prom-I	pGL3-basic mit 1934 bp des VCAM-1-Promotors
VCAM-prom-II	pGL3-basic mit 1202 bp des VCAM-1-Promotors
VCAM-prom-III	pGL3-basic mit 562 bp des VCAM-1-Promotors
VCAM-prom-IV	pGL3-basic mit 212 bp des VCAM-1-Promotors
VCAM-prom-V	pGL3-basic mit 182 bp des VCAM-1-Promotors
VCAM-prom-VI	pGL3-basic mit 144 bp des VCAM-1-Promotors
VCAM-prom-I-5'm	VCAM-prom-I mit Punktmutation im Bereich der 5' NF- κ B-Stelle
VCAM-prom-I-3'm	VCAM-prom-I mit Punktmutation im Bereich der 3' NF- κ B-Stelle
VCAM-prom-I-5'3'm	VCAM-prom-I mit Punktmutation im Bereich beider NF- κ B-Stellen
pGL3-promoter	leerer Luciferase-Reportergenvektor mit SV40 Minimalpromotor
HO-ARE-pGL	pGL3-promoter mit Hämooxygenase-ARE-Element
GI-ARE-1-pGL	pGL3-promoter mit GI-GPx-ARE-1-Element
GI-ARE-2-pGL	pGL3-promoter mit GI-GPx-ARE-2-Element
tk-Luc	leerer Luciferase-Reportergenvektor mit Thymidinkinase Minimalpromotor
κ B-tk-Luc	tk-Luc mit NF- κ B-Element
pcDNA3	leeres Expressionsplasmid
pcDNA3-mNrf2	pcDNA3 mit cDNA des murinen Nrf2
pcDNA3-mKeap1	pcDNA3 mit cDNA des murinen Keap1
pCH-110	β -Galactosidase-Kontrollplasmid zur Normierung der Transfektionseffizienz
pSV- β -Gal	β -Galactosidase-Kontrollplasmid zur Normierung der Transfektionseffizienz
pBluescript II KS(+)	zur „Blau-Weiß“-Selektion geeigneter Klonierungsvektor
<i>Oligonukleotid</i>	<i>Sequenz 5'-3'</i>
NF- κ B	aat tca caa aga ggg act ttc ccc tac atc cat tg
HO-ARE	gga att ctg ttt tcg ctg agt cat ggt c
GI-ARE-1	gaa ttc aga ccc gcc cct aca gac aa
GI-ARE-2	gga att ctg ttt tgc taa gtc atc ctg ggg a

2.6.2 Transiente Transfektion von SMC, ECV304, HepG2 und CaCo-2

Transiente Transfektionen von Plasmid-DNA wurden mit Hilfe der Reagenzien SuperFect® (Qiagen, Hilden) in SMC und ECV304 bzw. mit Tfx™-20 (Promega, Mannheim) in HepG2 und CaCo-2 durchgeführt. Hierbei wurde nach den vom Hersteller angegebenen Protokollen vorgegangen. Die Aussaat der Zellen erfolgte 24 h vor der Transfektion in 12-well-Platten (SMC, ECV304: je 100.000 Zellen) bzw. in 24-well-Platten (HepG2: 200.000, CaCo-2: 250.000 Zellen). SMC und ECV304 wurden mit je 0,5 μ g des Kontrollplasmides pCH-110, 0,8 μ g Reportergenplasmid und für einige Fragestellungen zusätzlich mit 0,3 μ g Expressionsplasmid transfiziert. HepG2- und CaCo-2-Zellen wurden mit 0,5 μ g pSV- β -Gal sowie mit 150 ng Reportergenplasmid und unterschiedlichen Mengen (maximal 150 ng) Expressionsplasmid transfiziert. Im Falle eines Stimulationsexperimentes wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion mit dem entsprechenden Stimulus für maximal 24 h in

serumfreiem Medium inkubiert. Zellen ohne Stimulus wurden 48 h nach der Transfektion geerntet. Zur Ernte wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums und Waschen mit PBS in je 150 µl Reporter-Lysepuffer (Promega, Mannheim) für 15 min bei Raumtemperatur lysiert und bis zur Messung bei -80°C gelagert. Nach Auftauen der Proben wurden diese für 2 min bei 11.900 g und 4°C zentrifugiert und der klare Überstand zur Messung von β -Galactosidase- bzw. Luciferaseaktivität eingesetzt.

2.6.3 Bestimmung der Reportergenaktivität

2.6.3.1 β -Galactosidasemessung

Die Erfassung der β -Galactosidaseaktivität beruht auf der Umsetzung von *o*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) zu *o*-Nitrophenol und erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm in einem Mikrotiterplatten-Photometer. Je 50 µl Zellysate wurden in eine 96-well-Platte pipettiert und mit 70 µl β -Galactosidasepuffer (120 mM Na₂HPO₄, 80 mM NaH₂PO₄, 20 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 100 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,3) sowie mit 30 µl ONPG-Lösung (4 mg/ml ONPG in 60 mM Na₂HPO₄, pH 7,5; Sigma, Taufkirchen) gemischt und bei 37°C bis zum Erreichen einer deutlichen Gelbfärbung inkubiert. Als Blindwert dienten Proben, die anstelle von Zellysate nur Reporter Lysepuffer enthielten (siehe 2.6.2).

2.6.3.2 Luciferasemessung

Die Messung der Luciferaseaktivitäten erfolgte in 10 µl (SMC) bzw. 20 µl (ECV304, HepG2, CaCo-2) Zellysate mit einem Luminoskan Ascent (Labsystems, Finnland). Hierfür wurde das Lysat in eine lichtundurchlässige 96-well-Platte pipettiert und das Messgerät so programmiert, dass pro Probe 100 µl Luciferingemisch injiziert und das entstehende Lichtsignal erfasst wurde. Das verwendete Luciferingemisch setzte sich aus Reaktionspuffer (20 mM Tricin, 1,07 mM MgCO₃, 0,1 mM EDTA, 2,67 mM MgSO₄, 33,3 mM DTT, pH 7,8 – 8,0) und Luciferinreagenz (500 µl gefriergetrocknetes Luciferinreagenz pro 3 ml Reaktionspuffer), welche kurz vor der Messung vereinigt und auf 37°C temperiert wurden, zusammen. Das benötigte Luciferinreagenz wurde folgendermaßen angesetzt: Zu 5 ml 100 mM Tris, pH 7,8 wurden 6,2 mg Coenzym A (Sigma, Taufkirchen), 4,3 mg Luciferin (P.J.K., Kleinblittersdorf) und 8,84 mg ATP (Sigma) gegeben, in 500 µl Aliquots aufgeteilt, bei -80°C tiefgefroren und anschließend über Nacht gefriergetrocknet.

Die relative Reportergenaktivität wurde durch Division der Luciferase-Lumineszenzeinheiten durch die β -Galactosidaseaktivitäten erhalten. Für die Auswertung wurden, je nach Fragestellung, entweder die Wildtypzellen oder die unbehandelten Zellen auf 1 normiert und alle anderen Proben darauf bezogen. Um eine eventuelle Beeinflussung des leeren

Reportergenvektors durch die applizierten Substanzen (z.B. IL-1, tBHQ, SFN, CUR) rechnerisch auszuschließen, wurde die relative Reportergenaktivität des entsprechenden leeren Reportergenvektors (pGL3-basic, pGL3-promoter, tk-Luc) für jedes Experiment mitbestimmt und bei der Auswertung berücksichtigt.

2.7 Immuncytochemie

Die für immuncytochemische Untersuchungen verwendeten SMC-Zellen wurden für mindestens vier Tage auf sterilen Objektträgern kultiviert, anschließend für 5 min in kaltem Methanol fixiert und bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Nach Rehydrierung der Objektträger in H₂O erfolgte eine Blockierung der endogen vorkommenden Peroxidasen durch eine 10-minütige Inkubation in 3% H₂O₂. Unspezifische Immunreaktionen wurden durch eine 30-minütige Vorbehandlung mit Antikörperverdünnungsmedium (AKV; DAKO, Hamburg) unterbunden. Die weitere Behandlung der Objektträger umfasste die folgenden Arbeitsschritte:

- 15 min, Raumtemperatur: Avidin D Blockierungsreagenz (Vektor, USA)
- 15 min, Raumtemperatur: Biotin Blockierungsreagenz (Vektor, USA)
- 1 h, 37°C: Primärantikörper (Maus-anti-Kaninchen VCAM-1 (Rb1/9) [149]; zur Verfügung gestellt von Dr. M. Cybulsky, University of Toronto, Kanada; 1:100 in AKV)
- 30 min, 37°C: biotinylierter Sekundärantikörper (Esel-anti-Maus IgG; Dianova, Hamburg; 1:800 in AKV)
- 30 min, Raumtemperatur: Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (DAKO, Hamburg)

Nach jedem der einzelnen Arbeitsschritte wurden die Objektträger mehrfach mit PBS, 0,1% Tween-20 gespült. Die Sichtbarmachung der Peroxidasereaktion erfolgte mit dem Substrat Diaminobenzidin (DAB; DAKO, Hamburg). Abschließend wurden die Objektträger mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, in Entellan (Merck, Darmstadt) eingebettet und mit einem Microscope-digital imaging system E1000 (NIKON) ausgewertet.

2.8 Durchflusscytometrie

Die Quantifizierung der VCAM-1-Expression auf der Oberfläche von SMC und SMC^{PHGPx} erfolgte mit einem Durchflusscytometer der Marke FACScalibur (Becton Dickinson, Heidelberg). Hierfür wurden die Zellen für drei Tage in 24-well-Platten kultiviert (je 10.000 Zellen) und anschließend für 24 h mit IL-1 (1 ng/ml) stimuliert. Nach Absaugen des Zellkulturmediums wurden die Zellen einmal mit PBS plus 5 mM EDTA und einmal mit PBS plus 0,5% BSA gewaschen und anschließend für 90 min mit dem primären Antikörper in PBS/BSA auf Eis inkubiert. Als primärer Antikörper diente Maus-anti-

Kaninchen VCAM-1 (Rb1/9) [149], 1:100 verdünnt. Als Negativkontrolle wurden Zellen, die keiner Antikörperbehandlung unterzogen wurden, verwendet. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/BSA erfolgte die Inkubation mit sekundärem Antikörper (Fluorescein-konjugierter Ziege-anti-Maus-IgG, Dianova, Hamburg; 1:100) ebenfalls für 90 min abgedunkelt auf Eis in PBS/BSA. Hiernach wurden die Zellen durch Schaben vom Boden der Zellkulturplatte abgelöst, in ein 12 x 75 mm FACS-Röhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg) überführt und für 7 min bei 240 g zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen des Pellets mit PBS/BSA wurden die Zellen in 150 µl Paraformaldehydlösung (1% in PBS) resuspendiert und für 30 min auf Eis fixiert, danach nochmals zentrifugiert, in 500 µl PBS/BSA aufgenommen und sofort für die Messung am FACScalibur eingesetzt. Die folgenden Messparameter wurden für SMC-Zellen definiert und für alle Versuche konstant gehalten:

- Vorwärtsstreulicht (FSC): E-1; Verstärkung 4,59
- Seitwärtsstreulicht (SSC): 337 V
- Detektorspannung (FL1): 409 V

Jede Messung wurde nach Erfassung von 10.000 Ereignissen beendet.

2.9 Gewinnung von Kernlysaten

Kernlysate zur Durchführung von Enzymaktivitätsmessungen, Western Blots und EMSAs wurden folgendermaßen gewonnen:

SMC und ECV304:

Die durch Trypsinieren geernteten Zellen wurden in Lysepuffer (50 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,4), welcher frisch mit 1% (SMC) bzw. 0,3% (ECV304) Brij97 (Sigma, Taufkirchen) als Detergenz versetzt wurde, für 25 min bei 4°C durch kontinuierliche Rotation lysiert (1×10^7 Zellen pro 1,2 ml Lysepuffer). Der Überstand wurde nach Zentrifugation (1 min, 4°C, 6800 g) vollständig abgenommen und das zurückbleibende Pellet in 50 µl Kernlysepuffer (20 mM HEPES, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, pH 7,4) resuspendiert. Die Lyse der Kernmembran erfolgte anschließend für 15 min bei 4°C durch kontinuierliches Rütteln in einem Eppendorf-Mixer. Das durch Zentrifugation (5 min, 4°C, 20.800 g) erhaltene Kernlysate wurde bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert. Kernlysate, die für die Untersuchung der DNA-Bindung von NF-κB mittels EMSA zum Einsatz kamen, wurden stets mit Kernlysepuffer ohne Zusatz von DTT präpariert.

HepG2 und CaCo-2:

Im Unterschied zu SMC und ECV304 erfolgte die Gewinnung von Kernlysaten aus HepG2- und CaCo-2-Zellen mit Hilfe von Nonidet-P40 (Sigma, Taufkirchen) als Detergenz. Hierfür wurden die durch Trypsinieren geernteten Zellen in Homogenisationspuffer (10 mM HEPES, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF, pH 7,9), der

frisch mit 0,1% Nonidet-P40 versehen wurde, für 7 min bei 4°C durch kontinuierliche Rotation lysiert (1 x 10⁷ Zellen pro 1,2 ml). Der Überstand wurde nach Zentrifugation (1 min, 4°C, 6800 g) vollständig abgenommen und das zurückbleibende Pellet in 100 µl Kernlysepuffer (40 mM Hepes, 400 mM KCl, 10% Glycerol, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, pH 7,9) aufgenommen. Die Lyse der Zellkerne erfolgte nach Zugabe von 6,25 µl 5 M NaCl für 30 min auf Eis. Das durch Zentrifugation (30 min, 4°C, 20.800 g) erhaltene Kernlysate wurde bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

2.10 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der verwendeten Zelllysate wurde in einer 96-well-Platte nach der von Bradford beschriebenen Methode bei einer Wellenlänge von 630 nm bestimmt [150]. Zur Quantifizierung diente eine Eichreihe mit bekannter BSA-Konzentration in 1 N NaOH (Kernlysate) bzw. in H₂O (Cytosole, Gesamtllysate).

2.11 SDS-PAGE und Western Blot

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) wurden, in Abhängigkeit vom Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins, mit 7,5 – 12,5%-igen Polyacrylamidgelen in einer Minigelapparatur zur vertikalen PAGE (BioRad, München) bei einer Stromstärke von 15 mA pro Gel durchgeführt. Bei den applizierten Proben handelte es sich, je nach Fragestellung, um Kernlysate, postnukleäre Überstände oder um mit RIPA-Lysepuffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 0,1% SDS, 0,5% Natrium-Desoxycholat, 1% Nonidet-P40, pH 7,8) gewonnene Gesamtllysate. Nach Abschluss der Elektrophorese erfolgte der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher&Schüll, Dassel) mit einer Hoefer®SemiPhor™ Blotapparatur (Amersham Biosciences, Freiburg) für 2 h bei 4°C und 1,2 mA/cm². Anschließend wurde die Membran für mindestens 1 h in 5%-iger Magermilchlösung in TTBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH 7,5) blockiert und daraufhin mehrfach mit TTBS gespült, bevor der entsprechende Primärantikörper, verdünnt in TTBS, appliziert wurde. Die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper erfolgte entweder für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C.

Folgende Primärantikörper wurden in den angegebenen Verdünnungen verwendet:

- Ziege-anti-Kaninchen VCAM-1 (Pineda, Berlin); 1:100
- Kaninchen-anti-Human GI-GPx Antiserum (GBF, Braunschweig; [151]); 1:5000
- Ziege-anti-Human NF-κB-p65 sc-109-G (Santa Cruz Biotechnology, USA); 1:200
- Ziege-anti-Human NF-κB-p50 sc-1191 (Santa Cruz Biotechnology, USA); 1:1000
- Kaninchen-anti-Human Nrf2 sc-722 (Santa Cruz Biotechnology, USA); 1:500

Nach erneutem Waschen mit TTBS wurden die Membranen mit dem erforderlichen Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper in TTBS für 1 h bei Raumtemperatur behandelt.

Folgende Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper wurden in den angegebenen Verdünnungen verwendet:

- Huhn-anti-Ziege-IgG-POD (Chemicon, Hofheim); 1:50.000
- Ziege-anti-Kaninchen-IgG-POD (Chemicon, Hofheim); 1:50.000

Die Visualisierung der Immunreaktion mittels Chemolumineszenz erfolgte nach gleichmäßiger Überschichtung der Membran mit Supersignal West Dura (Perbio, Bonn) an einem Fuji LAS1000-CCD-Kamerasystem.

2.12 [³²P]-in vivo Labeling

ECV304-Zellen wurden nach 3-tägiger Kultivierung in 25 cm² Zellkulturflaschen (Aussaat: 0,5 x 10⁶ Zellen) zunächst für 1 h in phosphatfreiem Medium und anschließend für weitere 4 h in phosphatfreiem Medium mit [³²P]-Orthophosphat (100 µCi/ml; Hartmann Analytic, Braunschweig) inkubiert und danach für 30 min mit IL-1 (1 ng/ml) stimuliert. Nach Abschluss der Stimulation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 15 min auf Eis in je 0,5 ml RIPA-Lysepuffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 0,1% SDS, 0,5% Natrium-Desoxycholat, 1% Nonidet-P40, pH 7,8) lysiert. Das durch Zentrifugation (15 min, 20.800 g, 4°C) gewonnene Lysat wurde zur Immunpräzipitation der NF-κB-Untereinheit p65 eingesetzt. Hierfür wurde die Proteinkonzentration bestimmt und jeweils 500 µg Protein für 2 h bei 4°C mit 0,4 µg Antikörper (Ziege-anti-Human sc-109-G; Santa Cruz, USA) inkubiert. Nach Zugabe von 30 µl Protein-G-Sepharoselösung (Amersham Biosciences, Freiburg) wurde die Inkubation bei 4°C über Nacht fortgesetzt. Die Immunpräzipitate wurden fünfmal mit RIPA-Lysepuffer und einmal mit 50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7,4 gewaschen und anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden getrocknet und markierte Proteine mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Als Kontrolle wurden zusätzlich Proben ohne Zugabe von Radioaktivität identisch aufgearbeitet und die Expression von p65 mittels Western Blot bestimmt.

2.13 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Die für EMSA-Experimente eingesetzten Kernlysate wurden wie unter 2.9 beschrieben gewonnen. Die Hybridisierung der verwendeten Oligonukleotide (siehe Tabelle 5) erfolgte durch 5-minütige Erhitzung von äquimolaren Mengen der komplementären einzelsträngigen Oligonukleotide auf 98°C und anschließende Abkühlung auf 4°C (0,01°C pro min). Jeweils 2,5 pmol des doppelsträngigen Oligonukleotids wurden mit 10 U T4-Polynukleotidkinase (NEB, Frankfurt) und 30 µCi [³²P]-ATP (Hartmann Analytic,

Braunschweig) für 45 min bei 37°C radioaktiv markiert und überschüssiges [γ - 32 P]-ATP mittels Gelfiltration über eine Probe QuantTM G-50 Mikro-Säule (Millipore, Eschborn) entfernt. Die DNA-Bindungsreaktionen wurden mit je 5 μ g Kernprotein, 3 μ g (SMC, ECV304) bzw. 1 μ g (HepG2) Poly(dI-dC) (Amersham Biosciences, Freiburg) und 50 fmol des markierten Oligonukleotids in 15 mM Hepes, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% (w/v) Glycerol in einem Gesamtvolumen von 10 μ l für 30 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Elektrophorese der Proben erfolgte mit nativen 4%-igen Polyacrylamidgelen in 0,25 x TBE bei einer Spannung von 200 V. Anschließend wurden die Gele getrocknet und über Nacht bei -80°C autoradiographiert.

Um die Spezifität der Bindungsreaktionen zu überprüfen, wurden ausgewählte Proben zusätzlich mit einem 100-fachen Überschuss an nicht-radioaktivem Oligonukleotid versehen. Supershiftreaktionen wurden mit je 1 μ g eines spezifischen Antikörpers (Kaninchen-anti-Human NF- κ B-p65 sc-109, Kaninchen-anti-Human NF- κ B-p50 sc-114, Kaninchen-anti-Human Nrf2 sc-722; alle bezogen von Santa Cruz Biotechnology, USA), welcher entweder 15 min vor oder während der Bindungsreaktion mit dem Kernlysat inkubiert wurde, durchgeführt.

Tabelle 5. EMSA-Oligonukleotide

<i>Oligonukleotid</i>	<i>Sequenz 5'-3'</i>
NF- κ B fwd	aat tca caa aga ggg act ttc ccc tac atc cat tg
NF- κ B rev	caa tgg atg tag gga aag tcc ctc ttt gtg aat t
HO-ARE fwd	gga att ctg ttt tgg ctg agt cat ggt c
HO-ARE rev	gaa cca tga ctc agc gaa aac aga atc c
GI-ARE-1 fwd	gaa ttc aga ccc gcc cct aca gac aa
GI-ARE-1 rev	ttg tac atg tga gag ggc agg gtc tga att cc
GI-ARE-2 fwd	gga att ctg ttt tgc taa gtc atc ctg ggg a
GI-ARE-2 rev	tcc cca gga tga ctt agc aaa aac aga att cc

2.14 MTT-Test

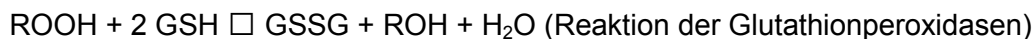
Die Proliferationsraten der untersuchten Zelllinien wurde mit Hilfe des MTT-Tests verglichen. Dieser beruht auf einer von endogen vorkommenden mitochondrialen Dehydrogenasen katalysierten Umsetzung des wasserlöslichen Tetrazoliumsalses MTT (= Thiazolylblau) zu einer unlöslichen Formazanverbindung. Die photometrisch ermittelte Menge dieses Formazans dient als Maß für die zum Zeitpunkt der Messung vorhandene Menge an vitalen Zellen. Für die Durchführung eines MTT-Tests wurden die Zellen in 96-well-Platten, ausgehend von einer sehr niedrigen Zellzahl, kultiviert und die Proliferation in 12-stündigen Abständen über einen Zeitraum von fünf Tagen verfolgt. Vor der Messung wurden zu jedem Ansatz 20 μ l MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS; Sigma, Taufkirchen) pipettiert und die Platte für 40 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurde das Medium abgeschlagen und die Zellen für 10 min in je 100 μ l Lysepuffer (95%

Isopropanol, 5% Ameisensäure) durch intensives Rütteln aufgeschlossen. Abschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 550 nm (Referenzwellenlänge: 690 nm).

2.15 Enzymaktivitäten

2.15.1 GPx-Aktivitäten im Gesamtlisat

Die GPx-Aktivität wurde mit Hilfe eines Glutathionreduktase-gekoppelten Tests nach [152] bestimmt. Diesem Test liegen folgende Reaktionsgleichungen zugrunde:



Die zu untersuchenden Zellen wurden für vier Tage in 175 cm² großen Zellkulturflaschen kultiviert und anschließend durch Trypsinieren geerntet. Das gewonnene Zellpellet wurde in Homogenisationspuffer (100 mM Tris, 300 mM KCl, 0,1% Triton X-100, pH 7,6) resuspendiert und mittels Ultraschallbehandlung lysiert. Das durch Zentrifugation gewonnene klare Lysat wurde nach Erfassung des Proteingehaltes zur Messung der Enzymaktivitäten eingesetzt. Hierfür wurden 100 µl des Lysates mit 890 µl Testmix, bestehend aus 100 mM Tris, 5 mM EDTA, 1 mM NaN₃, 3 mM GSH, 0,1 mM NADPH, 0,1% Triton X-100 und 600 mU Glutathionreduktase (Sigma, Taufkirchen), bei einem pH von 7,6 für 10 min bei 37°C inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µM Substrat (H₂O₂ zur Bestimmung der Gesamt-GPx-Aktivität, Phosphatidylcholinhydroperoxid (PCOOH) zur Bestimmung der PHGPx-Aktivität) gestartet. Die Umsetzung von NADPH wurde für 5 min bei 340 nm aufgezeichnet und diente zur Berechnung der Enzymaktivität in mU/mg Protein nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ($\epsilon_{[\text{NADPH}]}$: 6,3 mM⁻¹cm⁻¹). Das verwendete PCOOH wurde aus Phosphatidylcholin nach der Methode von Ursini et al. hergestellt [16].

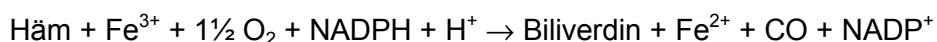
2.15.2 PHGPx-Aktivität im Kernlysate

Die Bestimmung der PHGPx-Aktivität im Kernlysate erfolgte im Prinzip wie unter 2.15.1 beschrieben, allerdings mussten die Kernlysate zuvor mittels Gelfiltration entsalzt werden. Hierfür wurden die Kernlysate für 10 min bei 4°C mit einem Volumenanteil Solubilisierungspuffer (0,2 M Tris, 0,2 M β-Mercaptoethanol, pH 7,5) inkubiert und anschließend, zur Entfernung niedermolekularer Bestandteile, für 30 min bei 105.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf zuvor mit Equilibrierungspuffer (0,01 M Tris, 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% Triton X-100, pH 7,5) vorbehandelte NAP-5-Säulen (Amersham Biosciences, Freiburg) gegeben und für 2 min bei 600 g und 4°C zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde mit einer weiteren NAP-5-Säule wiederholt, das gewonnene Filtrat

mit Equilibrierungspuffer auf ein Volumen von 600 µl eingestellt und die Enzymaktivität wie unter 2.15.1 gemessen.

2.15.3 Hämoxygenaseaktivität

Der Test zur Erfassung der Hämoxygenaseaktivität beruht auf deren Fähigkeit, ihr Substrat Häm gemäß der folgenden Reaktion zu Biliverdin umzusetzen:



Biliverdin wird dann in Gegenwart von Biliverdinreduktase zu Bilirubin konvertiert.

Die Gewinnung der für die Messung benötigten Zelllysate erfolgte wie bereits für die GPx-Bestimmung beschrieben (siehe 2.15.1), mit dem Unterschied, dass sich der zur Homogenisation verwendete Puffer (HO-1-Puffer) aus 100 mM Kaliumphosphat, 2 mM MgCl₂, pH 7,4 zusammensetzte. Die gewonnenen Lysate wurden ohne vorheriges Einfrieren noch am selben Tag vermessen, da infolge eines zwischenzeitlichen Einfrierens der Proben ein vollständiger Aktivitätsverlust der HO-1 zu verzeichnen war. Zur Messung wurden 200 µl Zelllysate mit 800 µl Testmix, bestehend aus HO-1-Puffer mit zusätzlich 2 mM Glucose-6-Phosphat, 0,8 mM NADPH, 0,25 U Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (alle von Sigma, Taufkirchen) und 1 mg Rattenlebercytosol (als Lieferant der Biliverdinreduktase), in einem Reaktionsgefäß gemischt und die Reaktion durch Zugabe von 5 µl Hämin (5 mM in 10 mM NaOH; Sigma) gestartet. Nach Ablauf einer 1-stündigen Inkubationsphase bei 37°C in einem abgedunkelten Wasserbad wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Chloroform gestoppt. Nach Zentrifugation (2 min, 20.800 g, 4°C) wurde die Absorption bei 464 nm (Absorptionsmaximum von Bilirubin) und 530 nm (Referenzwellenlänge) bestimmt und die Hämoxygenaseaktivität als pmol entstandenes Bilirubin pro Stunde pro mg Protein mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnet ($\epsilon_{[\text{Bilirubin}]}$: 40 mM⁻¹cm⁻¹)

2.16 Glutathionbestimmung

Die Probenaufarbeitung zur Bestimmung des Gehaltes an zellulärem Gesamtglutathion, d.h. der Summe aus reduziertem Glutathion (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG), wurde nach [153] durchgeführt. Hierfür wurden die entsprechenden Zellen für vier Tage in 175 cm² großen Zellkulturflaschen kultiviert, durch Trypsinieren geerntet und in PBS aufgenommen. Die erhaltene Zellsuspension wurde vor der weiteren Verarbeitung in zwei Fraktionen (25% für die Bestimmung von Gesamtglutathion und 75% für die Bestimmung von GSSG) aufgeteilt. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Ultraschallbehandlung in eiskaltem Homogenisationspuffer (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, pH 7,4), welcher für den Teil der Probe, der für die Bestimmung von GSSG verwendet wurde,

noch frisch mit 25 mM N-Ethylmaleimid (NEM; Sigma, Taufkirchen) versetzt wurde. Nach Zentrifugation (2 min, 10.000 g, 4°C) wurde ein Aliquot für die Proteinbestimmung abgenommen und das verbleibende Lysat einer 30-minütigen Proteinfällung mit Perchlorsäure (1 M finale Konzentration) auf Eis unterzogen. Präzipitiertes Protein wurde durch Zentrifugation (10 min, 10.000 g, 4°C) abgetrennt und der Überstand mit 0,6 M MOPS, 4 M KOH neutralisiert. Durch erneute Zentrifugation (10 min, 10.000 g, 4°C) wurde ausgefallenes KClO_4 entfernt. Überschüssiges NEM wurde durch 4-malige Extraktion mit wassergesättigtem Ethylacetat entfernt, die Proben abschließend mit Stickstoff begast und bis zur Messung bei -80°C gelagert.

Die Glutathionbestimmung erfolgte nach der Methode von Akerboom und Sies [153] mittels eines kinetischen Glutathionreduktase-gekoppelten Ellmann-Tests, der darauf basiert, dass GSH die 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellmann's Reagenz) zu dem gelben Farbstoff Thionitrobenzoat reduziert. Das bei der Reaktion entstehende GSSG wird von der Glutathionreduktase in Gegenwart von NADPH reduziert, wodurch eine kontinuierliche Reduktion des DTNB aufrechterhalten wird, die photometrisch durch einen stetigen Anstieg der Extinktion bei 412 nm messbar ist. Die Geschwindigkeit der Reaktion ist abhängig von der GSH- bzw. GSSG-Konzentration und von der Menge an Glutathionreduktase.

Für die Messung wurden je 50 μl Probe mit 835 μl Puffer (100 mM Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,0), 100 μl DTNB-Lösung (1 mM in 0,5% NaHCO_3) und 15 μl NADPH (10,2 mM in 0,5% NaHCO_3) in eine Küvette gegeben und die Reaktion durch Zugabe von 8 μl einer Glutathionreduktaselösung (19,4 U/ml in 0,5% NaHCO_3) gestartet. Zur Quantifizierung wurden, nach Ablauf von 4 min, 10 μl einer 50 μM GSSG-Lösung, welche als interner Standard diente, zugegeben und die Reaktion für weitere 2 min verfolgt. Die Menge an GSH wurde durch Subtraktion der zweifachen molaren Menge an GSSG vom Gesamtglutathiongehalt ermittelt.

2.17 Bestimmung von gemischten Disulfiden

Unter gemischten Disulfiden (GSSR) versteht man Proteine, welche an ihren Thiolgruppen glutathionyliert sind. Die Quantifizierung dieser Verbindungen geschah im Wesentlichen nach der von Brigelius et al. [154] beschriebenen Methode. Die Probengewinnung erfolgte bis zur Stufe der Proteinfällung wie unter 2.16, allerdings wurde für die weitere Aufarbeitung nicht der Überstand, sondern das durch Zentrifugation gewonnene Proteinpellet verwendet. Zur Abspaltung der proteingebundenen Glutathionreste wurden die Proteinpellets mit 650 μl einer 0,1 M Tris-HCl-Lösung, pH 7,4 in Gegenwart von 0,5% NaBH_4 für die Dauer von 30 min bei 40°C reduziert. Überschüssiges NaBH_4 wurde durch Neutralisierung mit HClO_4 und nachfolgender Zentrifugation (100.000

g, 15 min, 4°C) entfernt. Der GSH-Gehalt der gewonnenen Überstände wurde wie unter 2.16 bestimmt.

2.18 Erfassung des zellulären Thiolstatus

Die Erfassung des zellulären Thiolstatus erfolgte fluorographisch unter Verwendung von Monobromobimane (MBrB) als Fluoreszenzfarbstoff. Hierfür wurden die Zellen für vier Tage in 48-well-Platten kultiviert, anschließend für 5 h mit 5 mM des Reduktionsmittels Tris(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP; Sigma, Taufkirchen) in Zellkulturmedium behandelt und nach zweimaligem Waschen mit 1 x HBSS (Hank's balanced salt solution; Biochrom, Berlin) für 40 min bei 37°C mit 100 µM MBrB (Invitrogen, Karlsruhe) in 1 x HBSS inkubiert. Die Fluoreszenz wurde nach nochmaligem Waschen mit 1 x HBSS an einem Cytofluor II (Millipore, Eschborn) in 100 µl 1 x HBSS bei 390 nm Exzitation und 460 nm Emission erfasst. Die erhaltenen arbiträren Fluoreszenzeinheiten wurden auf 1×10^6 Zellen normiert.

2.19 Statistik

Alle Experimente wurden, soweit nicht anders angegeben, mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und aus den Einzelwerten bzw. den Mittelwerten eines einzelnen Versuches Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Signifikanzen wurden mittels ungepaartem, zweiseitigem *t*-Test kalkuliert (Microsoft Excel), wobei Unterschiede von $p \leq 0,05$ als signifikant angesehen wurden.

3 ERGEBNISSE

3.1 Identifizierung der GI-GPx als Ziel für Nrf2

Um nähere Einblicke in die Regulation der GI-GPx-Expression zu bekommen, wurde zunächst der Promotor der GI-GPx analysiert. Von besonderem Interesse war eine mögliche Beteiligung des Nrf2/Keap1-Transkriptionsfaktorsystemes. Von Nrf2-Knockout-Mäusen ist bekannt, dass diese eine verminderte GI-GPx-mRNA-Expression aufweisen [112, 113]. Da Nrf2 durch verschiedene, in der Nahrung vorkommende, Substanzen mit potentiell anticancerogenen Eigenschaften aktiviert wird, schloss sich die Frage nach einer möglichen Beeinflussung der GI-GPx-Expression durch diese Substanzen und der daraus für den Organismus resultierenden Folgen an.

3.1.1 Der GI-GPx-Promotor enthält ein funktionales ARE

Die Sequenz des humanen GI-GPx-Promotors (Genbank Nr. AF199441) wurde mit Hilfe des Computerprogrammes „MatInspector“ [147] hinsichtlich der möglicherweise darin vorhandenen Transkriptionsfaktorbindestellen untersucht. Auffallend war das Vorhandensein von zwei potentiellen „antioxidant response elements“ (ARE), bei welchen es sich um Bindestellen für den Transkriptionsfaktor Nrf2 handelt. Diese beiden Elemente befinden sich in Position -442 bis -450 (GI-ARE-1) bzw. -133 bis -141 (GI-ARE-2). Sequenzvergleiche mit dem murinen GI-GPx-Promotor (Genbank Nr. U62658) ergaben, dass das GI-ARE-2, jedoch nicht das GI-ARE-1, auch in der Maus vorzufinden ist. Die Sequenz des GI-ARE-1 weicht in einer Base von der publizierten ARE-Konsensussequenz ab [97], wohingegen die Sequenz des GI-ARE-2 mit der Konsensussequenz zu 100% übereinstimmt (siehe Abb. 5).

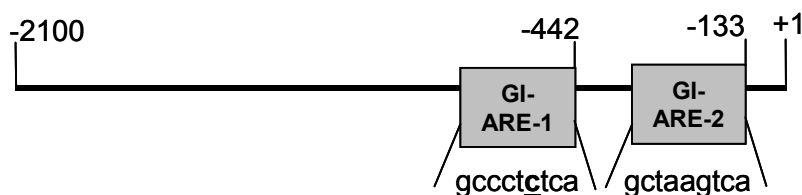


Abb. 5. Skizze des GI-GPx-Promotors und Position der potentiellen AREs

Der humane GI-GPx-Promotor enthält zwei mögliche AREs. Die Zahlen markieren die Position der Basen ausgehend vom ATG.

Darüber hinaus beinhalten beide AREs eine Bindestelle für Transkriptionsfaktoren die der AP-1-Familie (activator protein-1) angehören. Im allgemeinen weisen AREs und AP-1-Bindestellen eine sehr hohe Sequenzhomologie auf, jedoch ist die Sequenz des ARE länger und erfordert das Vorhandensein von weiteren Nukleotiden. So ist beispielsweise die Sequenz `-gc-` am 5'-Ende des ARE unerlässlich für die Erkennung und Bindung von Nrf2; für Proteine der AP-1-Familie ist diese Sequenz jedoch irrelevant [97].

Um zu entscheiden, ob es sich bei den beiden AREs um funktionale responsive Elemente handelt, wurden Oligonukleotide synthetisiert, die entweder das GI-ARE-1, GI-ARE-2 oder das ARE der murinen Hämoxxygenase (HO-1) enthalten. Bei der Hämoxxygenase handelt es sich um ein Gen, das nachweislich durch Nrf2 reguliert wird [155]. Um eine direkte Interaktion von Nrf2 mit den im GI-GPx-Promotor lokalisierten AREs nachzuweisen, wurden mit den verschiedenen Oligonukleotiden Gelshiftexperimente (EMSA) durchgeführt. Abb. 6 zeigt repräsentative Autoradiographien.

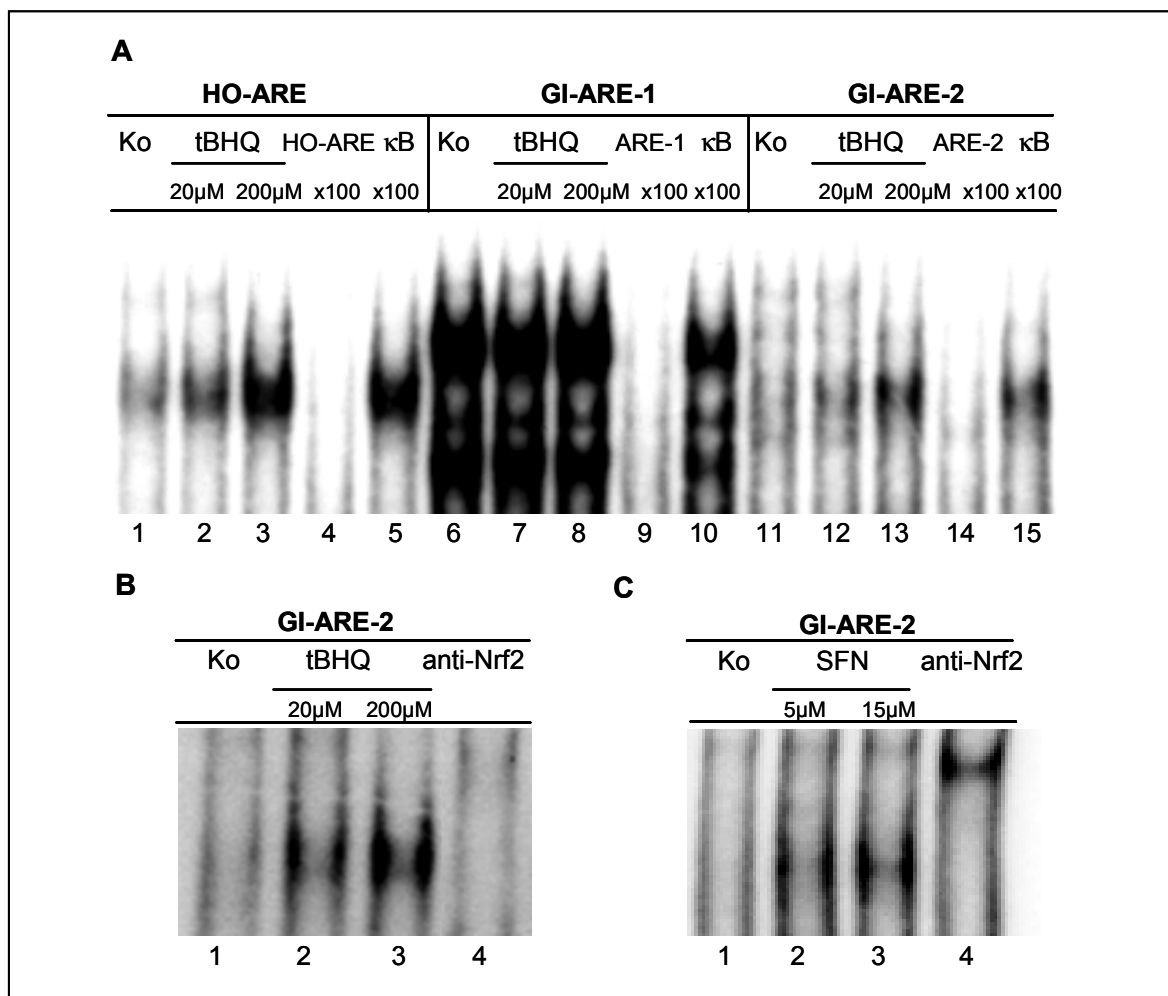


Abb. 6. tBHQ und SFN induzieren eine verstärkte Bindung von Nrf2 an das GI-ARE-2

HepG2-Zellen wurden für drei Tage in serumhaltigem Medium kultiviert und anschließend in serumfreiem Medium mit tBHQ (16 h; 20 bzw. 200 μM) oder SFN (4 h; 5 bzw. 15 μM) stimuliert. Die erhaltenen Kernlysate wurden für EMSAs mit den Oligonukleotiden HO-ARE, GI-ARE-1 bzw. GI-ARE-2 verwendet.

(A) Die radioaktiven Oligonukleotide HO-ARE (1-5), GI-ARE-1 (6-10) und GI-ARE-2 (11-15) wurden mit HepG2-Kernextrakten inkubiert. Zur Kontrolle wurde in den Proben Nr. 4, 9 und 14 ein 100-facher Überschuss des jeweiligen nicht-radioaktiven Oligonukleotids hinzugegeben. Die Proben 5, 10 und 15 wurden mit einem 100-fachen Überschuss eines unspezifischen NF-κB-Oligonukleotids versetzt.

(B), (C) Das GI-ARE-2 wurde mit Kernextrakten aus tBHQ-stimulierten **(B)** bzw. SFN-stimulierten **(C)** HepG2-Zellen inkubiert. Die direkte Bindung von Nrf2 wurde mittels eines Nrf2-Antikörpers überprüft (Spur Nr. 4).

Als Proben dienten HepG2-Kernlysate von unstimulierten bzw. von mit *tert*-Butylhydrochinon (tBHQ) oder Sulforaphan (SFN) stimulierten Zellen. Eine Stimulation der Zellen mit tBHQ resultierte in einer verstärkten DNA-Bindung. Dies war sowohl bei dem als Positivkontrolle verwendeten HO-ARE (Abb. 6A, 1-3) als auch beim GI-ARE-2 (Abb. 6A, 11-13; Abb. 6B, 1-3) zu beobachten, jedoch nicht bei dem GI-ARE-1 (Abb. 6A, 6-10). Die Spezifität der Bindung wurde durch einen 100-fachen Überschuss an nicht-radioaktivem spezifischen oder unspezifischen (NF- κ B) Oligonukleotid überprüft (Abb. 6A; 4, 5, 14, 15). Somit verhält sich das GI-ARE-2 wie das als Positivkontrolle verwendete HO-ARE, wohingegen an das GI-ARE-1 verschiedene Proteine unspezifisch binden können. Außer mit tBHQ, führte eine Stimulation der Zellen mit SFN ebenfalls zu einer verstärkten Bindung an das GI-ARE-2 (Abb. 6C, 1-3).

Zur weiteren Überprüfung der Spezifität wurden Supershiftreaktionen mit einem Nrf2-Antikörper durchgeführt. Die Verschiebung der an das Oligonukleotid gebundenen Nrf2-Komplexe beweist die Bindung von Nrf2 an das GI-ARE-2 (Abb. 6B, 4; Abb. 6C, 4).

Die für EMSA-Experimente eingesetzten Kernlysate wurden darüber hinaus mittels Western Blot hinsichtlich ihrer nukleären Lokalisation von Nrf2 untersucht. Wie in Abb. 7 zu erkennen ist, führte sowohl tBHQ- als auch SFN-Vorbehandlung zu einer verstärkten nukleären Akkumulation von Nrf2. Auffallend war das Vorhandensein von zwei unterschiedlich großen immunreaktiven Proteinen, deren beider Menge im Kern der mit tBHQ oder SFN behandelten Proben anstieg. Ein solches Phänomen wurde speziell für das Nrf2 bereits von anderen Autoren berichtet. Als Erklärung wird eine Komplexbildung zwischen Nrf2 und dem Aktincytoskelett diskutiert [156]. Im Cytosol war die größere der beiden Banden nicht nachweisbar (nicht gezeigt).

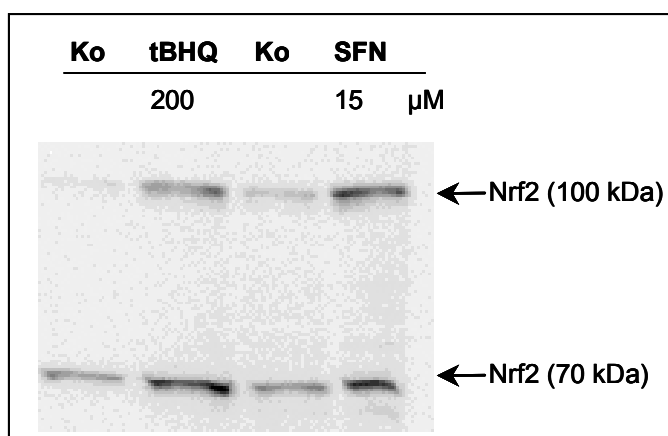


Abb. 7. Nukleäre Translokation von Nrf2 in Abhängigkeit von tBHQ und SFN

HepG2-Zellen wurden für drei Tage kultiviert und anschließend für 16 h in serumfreiem Medium in Gegenwart von tBHQ (200 μ M) oder SFN (15 μ M) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und Kernlysate gewonnen. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot.

Um die Funktionalität des GI-ARE-2 zu bestätigen, wurden die für EMSAs eingesetzten ARE-Oligonukleotide (HO-ARE, GI-ARE-1, GI-ARE-2) in den Reportergenvektor pGL3-promoter kloniert und zusammen mit pcDNA3-mNrf2 oder leerem pcDNA3 transient in

HepG2-Zellen transfiziert. Wie in Abb. 8 zu sehen ist, wird von den beiden potentiellen Nrf2-Bindestellen des GI-GPx-Promotors nur das GI-ARE-2 von Nrf2 aktiviert, da nur mit diesem Fragment eine Induktion des Reportergens durch Cotransfektion mit pcDNA3-mNrf2 zu beobachten war. Das GI-ARE-2 verhielt sich somit ähnlich zu dem als Positivkontrolle verwendeten HO-ARE, wohingegen das GI-ARE-1 nicht durch Nrf2 reguliert werden konnte und deshalb von weiteren Experimenten ausgeschlossen wurde.

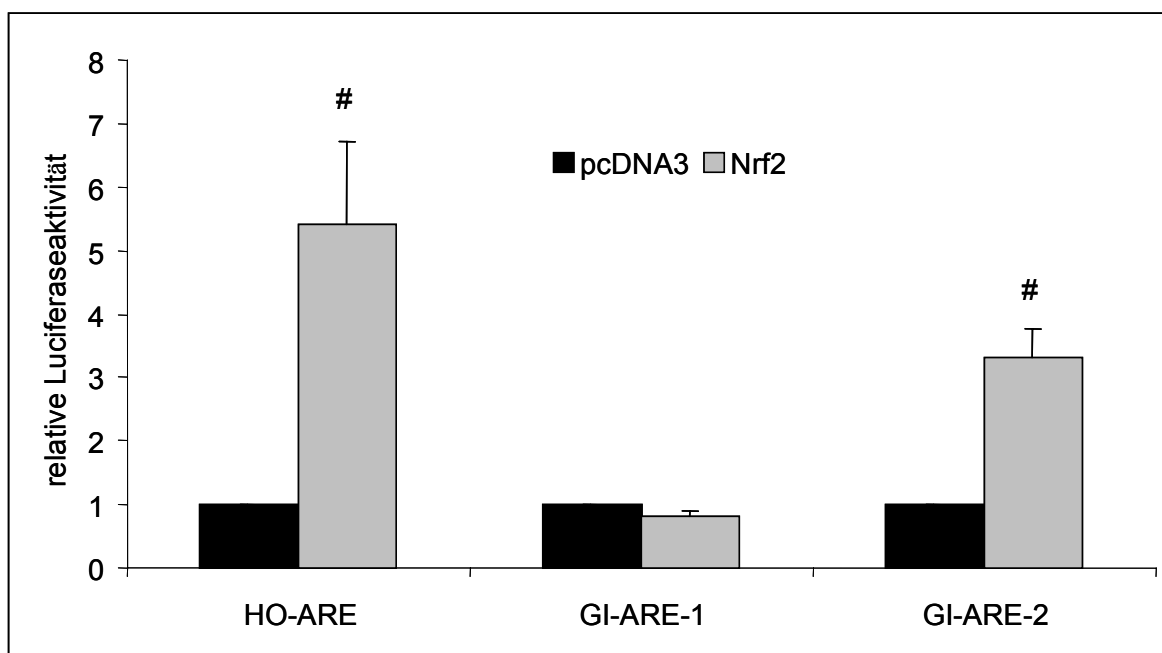


Abb. 8. Aktivierung der im GI-GPx-Promotor vorhandenen AREs durch Nrf2

HepG2-Zellen wurden transient mit Reportergenkonstrukten, die die „antioxidant responsive elements“ (ARE) des GI-GPx-Promotors (GI-ARE-1, GI-ARE-2) oder des Hämoxigenase-Promotors (HO-ARE) enthalten, bzw. mit dem leeren Reportergenplasmid pGL3-promoter in Gegenwart des Expressionsplasmides pcDNA3-mNrf2 oder pcDNA3 transfiziert. Die Ernte der Zellen erfolgte 48 h nach Transfektion. Die relativen Luciferaseaktivitäten wurden auf die Reportergenaktivität des leeren Plasmides pGL3-promoter bezogen und anschließend die Aktivität der jeweiligen mit pcDNA3 cotransfizierten Ansätze auf 1 gesetzt. #p < 0,05 vs. pcDNA3.

Die Erhöhung der Reportergenaktivität konnte ebenfalls von Nrf2-aktivierenden Substanzen (tBHQ, SFN, CUR), zwar in geringerem Ausmaß, aber dennoch signifikant, erzielt werden (Abb. 9). Es kann also festgehalten werden, dass der Promotor der GI-GPx zwei AREs enthält, wovon GI-ARE-2 den Transkriptionsfaktor Nrf2 binden und durch Nrf2 selbst oder durch Nrf2-Induktoren aktiviert werden kann.

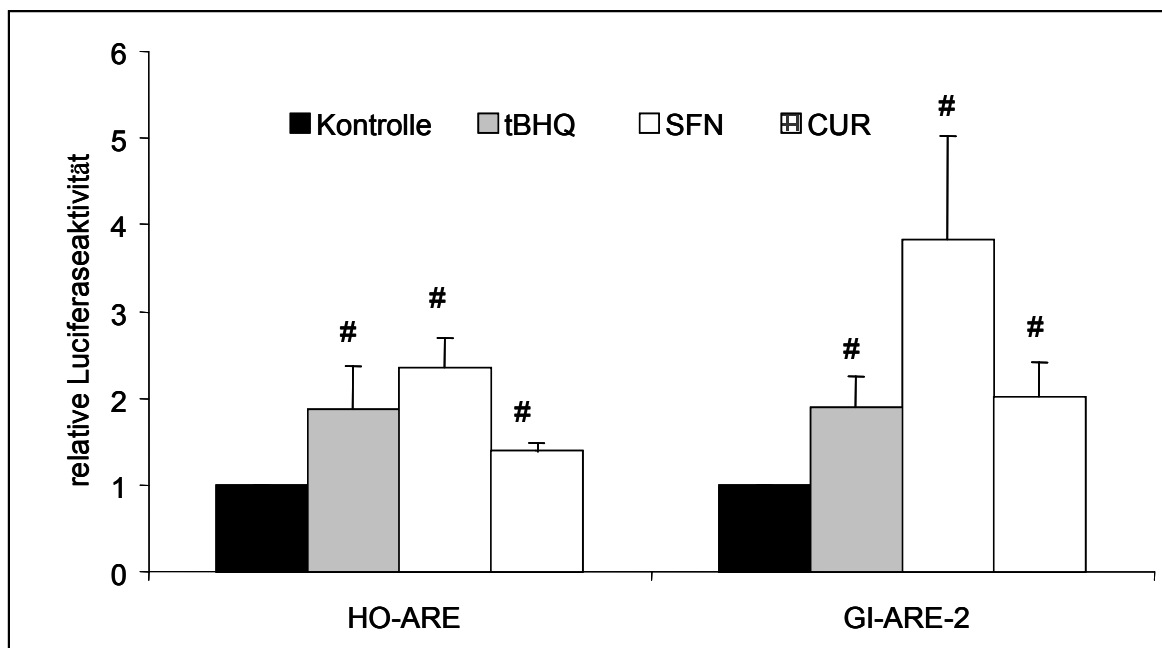


Abb. 9. Aktivierung der im GI-GPx-Promotor vorhandenen AREs durch Nrf2-Induktoren

HepG2-Zellen wurden transient mit den Reportergenkonstrukten HO-ARE-pGL bzw. GI-ARE-2-pGL transfiziert. Als Kontrolle diente das leere Reporterplasmid pGL3-promoter. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit tBHQ (20 μ M), SFN (5 μ M) oder CUR (25 μ M) für 24 h in serumfreiem Medium stimuliert und anschließend die relative Luciferaseaktivität ermittelt und zur jeweiligen relativen Luciferaseaktivität des leeren Vektors ins Verhältnis gesetzt. Die unstimulierten Konstrukte (Kontrolle) wurden auf 1 normiert und alle anderen Werte im Verhältnis hierzu ausgedrückt. #p < 0,05 vs. Kontrolle.

3.1.2 Das GI-ARE-2 ist essentiell für die Aktivität des GI-GPx-Promotors

Nachdem das GI-ARE-2 als ein transkriptional aktives ARE identifiziert wurde, sollte nachfolgend getestet werden, ob dieses ARE auch im Kontext des gesamten GI-GPx-Promotors von Relevanz ist. Ausgehend von der bekannten Promotorsequenz wurden insgesamt sechs Deletionskonstrukte mittels PCR und anschließender Klonierung in den Reporter-genvektor pGL3-basic generiert (Dr. Z. Zhou, DIFE, Abt. BIM) und für Reporter-genanalysen eingesetzt. Die Konstrukte GI-prom-I bis -IV verfügen noch über beide der potentiellen AREs, wohingegen Konstrukte V und VI nur noch das GI-ARE-2 enthalten. Zusätzlich wurde ein Promotorkonstrukt, welches eine zwei Basen umfassende Punktmutation im Bereich des GI-ARE-2 trägt, generiert (GI-prom-I-mut). Der Einfluss des Nrf2/Keap1-Transkriptionsfaktorsystems auf die Promotoraktivität wurde mittels Cotransfektion des Nrf2-Expressionsplasmides pcDNA3-mNrf2 untersucht und ist in Abb. 10 zusammengefasst. Zunächst wurden Transfektionsexperimente nur in HepG2-Zellen durchgeführt, da von dieser Zelllinie bekannt war, dass sie die GI-GPx auf hohem Niveau exprimieren kann. Alle sechs Promotorkonstrukte wiesen im Vergleich zum leeren Reporter-genvektor pGL3-basic eine deutliche basale Promotoraktivität auf, deren Höhe zwischen den einzelnen Konstrukten schwankte und für das kürzeste Konstrukt (GI-prom-

VI) am niedrigsten war. Die Ursache für die unterschiedlich hohe basale Promotoraktivität der einzelnen Konstrukte ist nicht bekannt, jedoch ließ sich die Aktivität aller sechs Promotorkonstrukte durch Cotransfektion von pcDNA3-mNrf2 deutlich steigern, wobei der Faktor der Induktion für das kürzeste Konstrukt (GI-prom-VI) am höchsten war. Da alle untersuchten Konstrukte das GI-ARE-2 enthielten, wurde dieser Bereich mutiert (Änderung der Sequenz von: gctaagtca in attaagtca) und die Reporter-genversuche mit dem mutierten Konstrukt wiederholt. Eine derartige Mutation im Bereich des GI-ARE-2 führte zu einem völligen Verlust der basalen und der durch Nrf2 induzierten Promotoraktivität (Abb. 10). Da durch die eingefügte Mutation nur die Erkennungssequenz für Nrf2 verändert wurde, hingegen nicht die, für das außerdem innerhalb der ARE-Region liegende AP-1-Element, ist in der Tat von einer entscheidenden Funktion des Nrf2 auszugehen. Dies gilt sowohl für die basale als auch für die induzierbare Promotoraktivität. Des Weiteren wurde durch die Mutation deutlich, dass das GI-ARE-1 das fehlende GI-ARE-2 nicht ersetzen kann, was die Frage nach der Funktion des GI-ARE-1 unbeantwortet lässt.

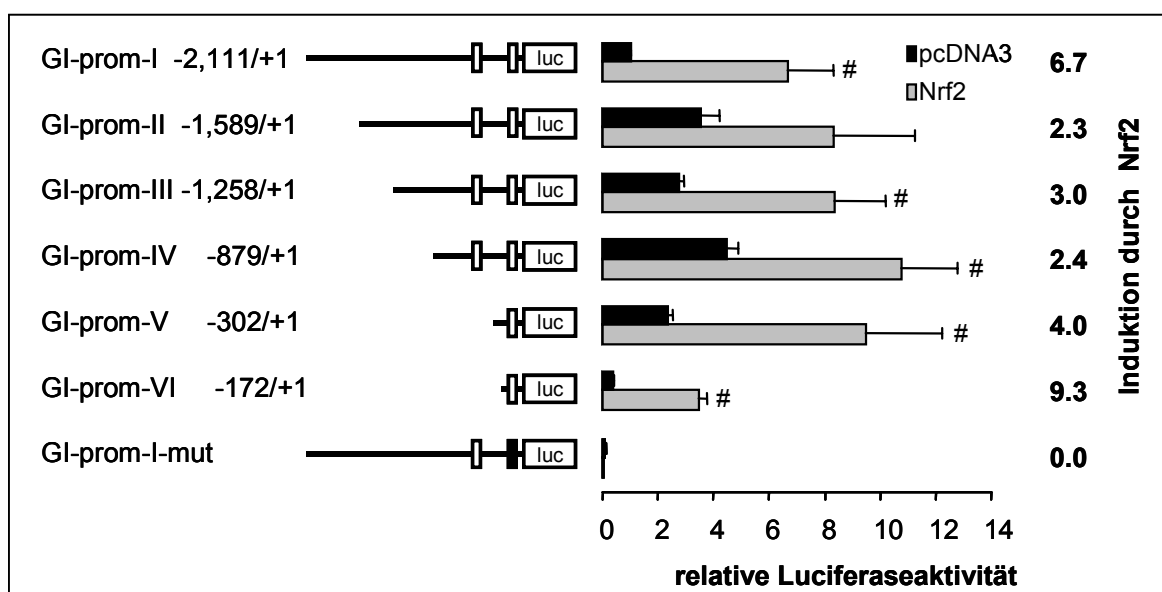


Abb. 10. Regulation der GI-GPx-Promotoraktivität durch Nrf2

HepG2-Zellen wurden transient mit den Promotorkonstrukten GI-prom-I bis -VI bzw. mit dem mutierten Promotor GI-prom-I-mut in Gegenwart des Nrf2-Expressionsplasmides pcDNA3-mNrf2 transfiziert. Als Kontrolle diente das leere Expressionsplasmid pcDNA3. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. Die relative Luciferaseaktivität des Konstruktes GI-prom-I pcDNA3 wurde auf 1 gesetzt und alle anderen Werte im Verhältnis hierzu ausgedrückt. Der Faktor der Induktion durch Nrf2 wurde für jedes Konstrukt berechnet und ist auf der rechten Seite dargestellt. Die potentiellen AREs sind mit Vierecken angedeutet (für Mutation: schwarzes Viereck). #p < 0,05 vs. pcDNA3.

3.1.3 Die Aktivität des GI-GPx-Promotors wird dosisabhängig durch das Nrf2/Keap1-System reguliert

Nachdem eine Beeinflussung der GI-GPx-Promotoraktivität durch Nrf2 gezeigt werden konnte, wurde untersucht, ob auch Nrf2-aktivierende Substanzen den Promotor stimulieren können. Hierfür wurden die mit dem GI-GPx-Promotorfragment Nr. I (GI-prom-I) transfizierten Zellen mit tBHQ (20 μ M), SFN (5 μ M) oder CUR (25 μ M) behandelt. Der stimulatorische Effekt von tBHQ, SFN und CUR war im Vergleich zu einer direkten Cotransfektion mit Nrf2 geringer ausgeprägt, aber dennoch auf signifikantem Niveau vorhanden.

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 erfordert dessen Dissoziation von Keap1, welches das Nrf2 im Cytoplasma zurückhält [157]. Demzufolge ist davon auszugehen, dass ein Überschuss an Keap1 eine Aktivierung des Nrf2 verhindert. Eine derartige Wechselbeziehung zeigte sich auch für die Promotoraktivität der GI-GPx. Eine Cotransfektion von geringen Mengen an pcDNA3-mKeap1 senkte die basale Promotoraktivität. Der Faktor der Stimulierbarkeit wurde hierdurch zwar erhöht, die Aktivität blieb jedoch generell unter der, die ohne Keap1 zu verzeichnen war (Abb. 11).

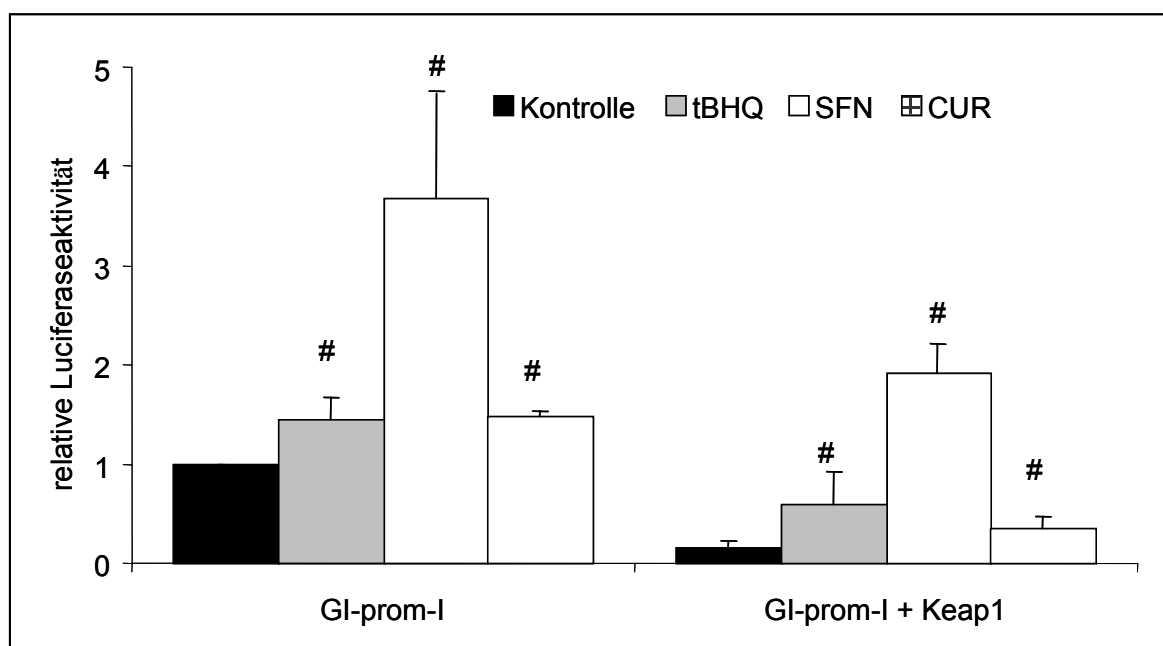


Abb. 11. Regulation der GI-GPx-Promotoraktivität durch Nrf2-Induktoren

HepG2-Zellen wurden transient mit dem längsten GI-GPx-Promotorkonstrukt GI-prom-I sowie mit 10 ng pcDNA3-mKeap1 bzw. mit leerem pcDNA3-Expressionsvektor transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte eine Stimulation der Zellen mit tBHQ (20 μ M), SFN (5 μ M) bzw. CUR (25 μ M) für 24 h in serumfreiem Medium. Die relative Luciferaseaktivität des Ansatzes ohne Stimulation und ohne pcDNA3-mKeap1 wurde auf 1 gesetzt. #p < 0,05 vs. Kontrolle.

Eine Cotransfektion des Promotorkonstruktes GI-prom-I mit pcDNA3-mNrf2 resultierte in der bereits beschriebenen Erhöhung der Promotoraktivität, etwa um den Faktor 7 (siehe Abb. 10). Dieser Effekt konnte durch eine steigende Menge an cotransfiziertem pcDNA3-

mKeap1 dosisabhängig unterdrückt werden (Abb. 12A). Umgekehrt ließ sich die basale GI-GPx-Promotoraktivität durch Überexpression von Keap1 hemmen. Diese Hemmung wiederum wurde durch gleichzeitige Überexpression von Nrf2 dosisabhängig unterbunden (Abb. 12B).

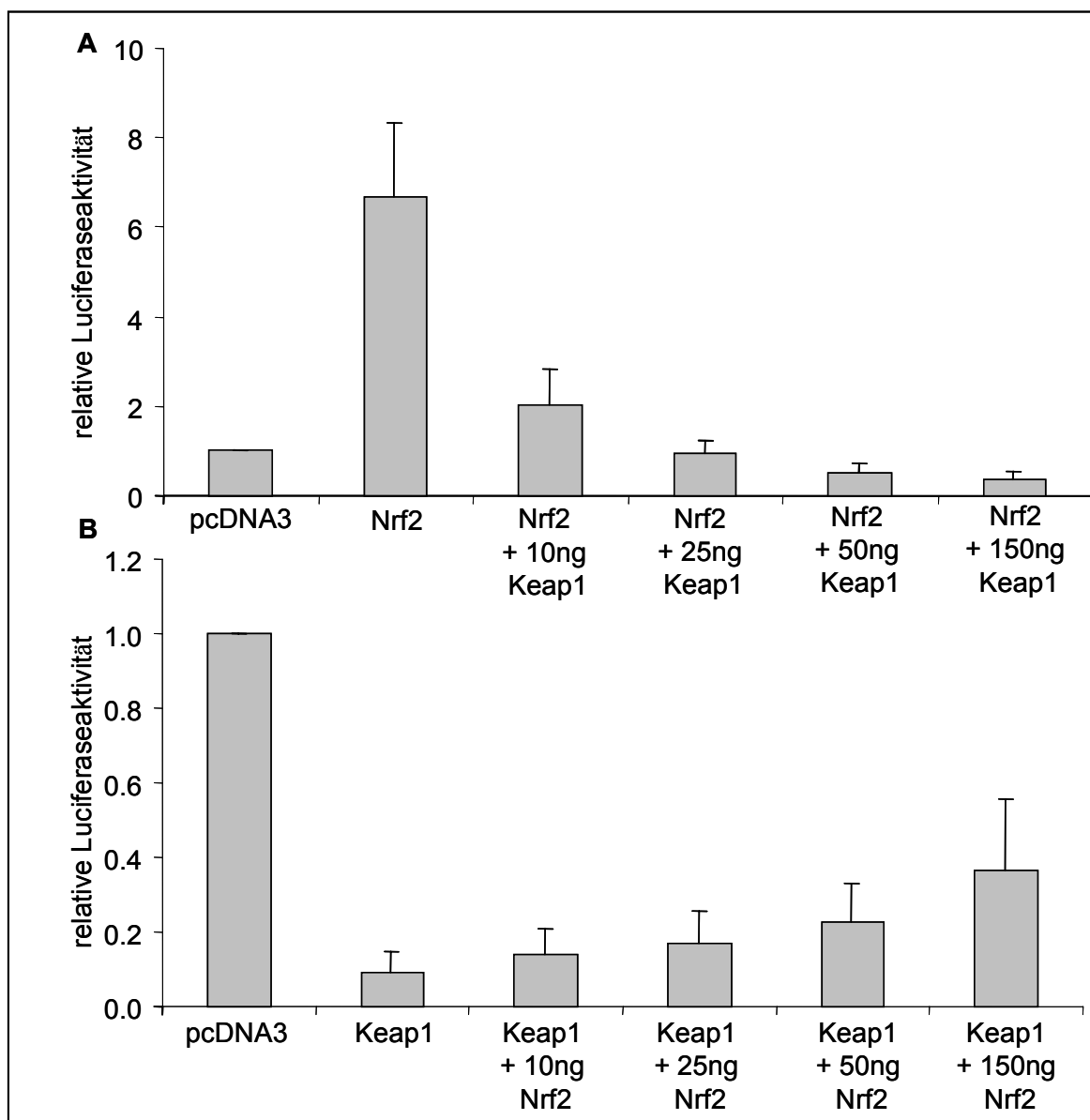


Abb. 12. Dosisabhängige Regulation des GI-GPx-Promotors durch Nrf2 und Keap1

Hemmung der Promotoraktivität durch Keap1 (**A**) und Umkehrung des Keap1-Effektes mit Nrf2 (**B**): HepG2-Zellen wurden transient mit dem Konstrukt GI-prom-I sowie mit unterschiedlichen Mengen an pcDNA3-mNrf2 bzw. pcDNA3-mKeap1 transfiziert und nach 48 h geerntet. Die pro Ansatz transfizierte DNA-Menge wurde durch den leeren Vektor pcDNA3 auf ein einheitliches Niveau gebracht. Die relative Luciferaseaktivität der Ansätze ohne Nrf2 bzw. Keap1 wurde auf 1 gesetzt. Der Versuch wurde zweimal mit je 3 Proben durchgeführt.

3.1.4 Regulation des GI-GPx-Promotors durch das Nrf2/Keap1-System in CaCo-2-Zellen

Von HepG2-Zellen ist bekannt, dass sie relativ große Mengen an GI-GPx exprimieren. Nachdem eine eindeutige Regulation des GI-GPx-Promotors durch das Nrf2/Keap1-System für HepG2-Zellen nachgewiesen werden konnte, war es von Interesse zu untersuchen, ob eine solche Abhängigkeit von Nrf2 auf HepG2 beschränkt oder auch in Zellen mit allgemein niedrigerer GI-GPx-Expression vorzufinden ist. Hierfür wurden einige der bereits für HepG2-Zellen beschriebenen Transfektionen mit CaCo-2-Zellen durchgeführt. Wie in Abb. 13 zu sehen ist, wird der Promotor der GI-GPx in CaCo-2-Zellen ebenfalls durch Nrf2 und Keap1 reguliert. Des Weiteren konnte die in HepG2-Zellen gezeigte Stimulierung durch tBHQ, SFN und CUR in CaCo-2-Zellen in ähnlichem Ausmaß beobachtet werden.

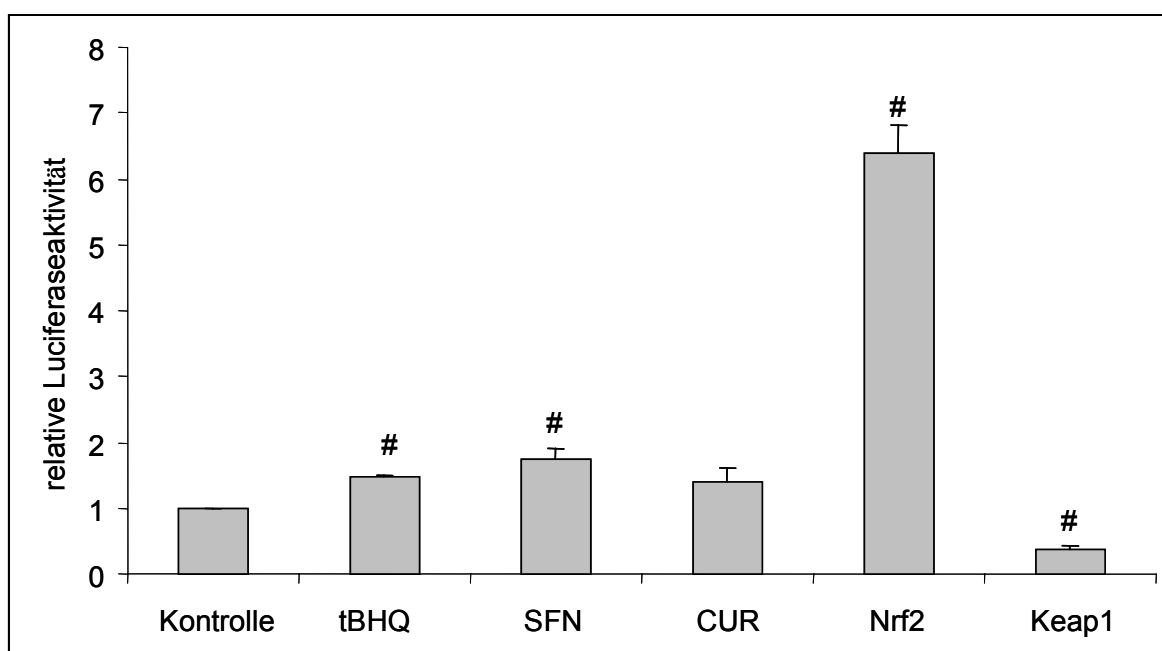


Abb. 13. Regulation der GI-GPx-Promotoraktivität in CaCo-2-Zellen

CaCo-2-Zellen wurden transient mit dem Konstrukt GI-prom-I in Gegenwart von pcDNA3-mNrf2 oder pcDNA3-mKeap1 transfiziert. Als Kontrolle diente das leere Expressionsplasmid pcDNA3. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit tBHQ (20 μ M), SFN (5 μ M) oder CUR (25 μ M) für 24 h in serumfreiem Medium stimuliert. Die relative Luciferaseaktivität des unstimulierten Konstruktes (Kontrolle) wurde auf 1 gesetzt und alle anderen Werte im Verhältnis hierzu ausgedrückt. #p < 0,05 vs. Kontrolle.

3.1.5 Induktion der endogenen GI-GPx durch Nrf2-Induktoren

Eine Induktion der Transkription ist nicht notwendigerweise auch mit einer erhöhten Translation verbunden, insbesondere nicht, wenn wie im Fall von Selenoproteinen, die Translation von anderen Faktoren, hier von der Verfügbarkeit von Selen, abhängt. Deshalb war es essentiell, eine Induktion auch auf Proteinebene zu untersuchen.

In HepG2-Zellen war weder auf mRNA- noch auf Proteinebene eine eindeutige Erhöhung der endogenen GI-GPx durch tBHQ bzw. SFN zu beobachten (Abb. 14). Dies ist wahrscheinlich auf das hohe Expressionsniveau der GI-GPx in diesen Zellen zurückzuführen. Offensichtlich befand sich die Expression der GI-GPx in adäquat mit Selen versorgten HepG2-Zellen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene bereits auf einem maximalen Niveau, das durch exogene Stimuli nur unwesentlich erhöht werden konnte (Abb. 14B). In selendefizienten HepG2-Zellen wird nur wenig GI-GPx-Protein exprimiert, doch auch hier war es nicht möglich, eine signifikante Steigerung der GI-GPx-Menge durch SFN oder tBHQ zu erzielen (nicht gezeigt). Da während eines Selenmangels das nötige Selen für die Protein-Neusynthese fehlt, sind diese Ergebnisse nicht überraschend. Insgesamt scheint das in der Zellkultur verwendete Natriumselenit die größere Rolle bei der GI-GPx-Expression in HepG2-Zellen zu spielen.

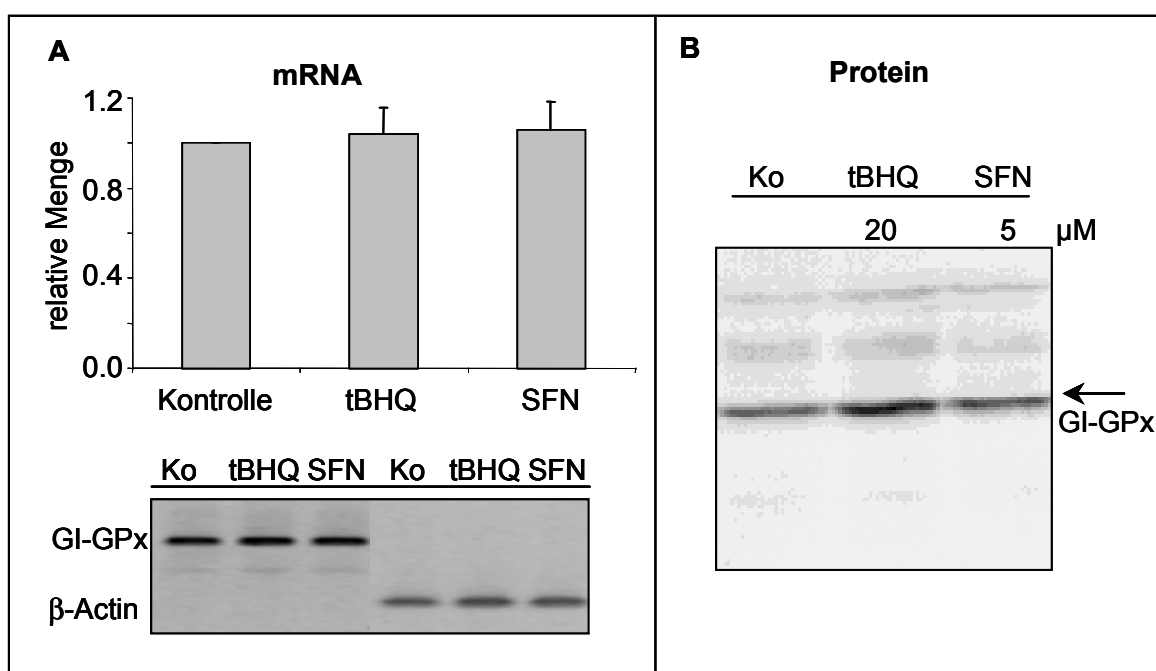


Abb. 14. GI-GPx-Expression in HepG2-Zellen in Abhängigkeit von tBHQ und SFN

(A) GI-GPx mRNA-Expression in HepG2-Zellen: Selensupplementierte (50 nM) HepG2-Zellen wurden für 8 h in serumfreiem Medium in Gegenwart von Natriumselenit (50 nM) und tBHQ (20 μ M) bzw. SFN (5 μ M) kultiviert, anschließend die RNA isoliert, revers transkribiert und die cDNA der GI-GPx mittels PCR amplifiziert. Als Referenzgen diente β -Actin. Die Auswertung erfolgte densitometrisch. Das in der Abbildung dargestellte Gel ist repräsentativ für zwei unabhängige Versuche.

(B) GI-GPx Protein-Expression in HepG2-Zellen: Selensupplementierte (50 nM) HepG2-Zellen wurden für 48 h in serumfreiem Medium in Gegenwart von Natriumselenit (50 nM) und tBHQ (20 μ M) bzw. SFN (5 μ M) kultiviert und anschließend mit RIPA-Puffer lysiert. Die erhaltenen Gesamtllysate wurden mittels Western Blot hinsichtlich ihres Gehaltes an GI-GPx untersucht. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot.

Deshalb wurden die selben Versuche auch mit CaCo-2-Zellen durchgeführt, da diese zwar GI-GPx exprimieren, jedoch auf weitaus geringerem Niveau als HepG2-Zellen. Somit könnte eine Induktion durch Nrf2-Aktivatoren in dieser Zelllinie besser detektierbar sein. Im Gegensatz zu den HepG2-Zellen war es hier möglich, die GI-GPx-Expression durch tBHQ und SFN sowohl auf mRNA-Ebene (Abb. 15A) als auch auf Proteinebene (Abb. 15B), zu steigern. GI-GPx-Protein konnte nur in selensupplementierten CaCo-2-Zellen nachgewiesen werden. Hiermit wird deutlich, dass tBHQ und SFN tatsächlich in der Lage sind, endogene GI-GPx zu induzieren. Weiterhin wird deutlich, dass die Effekte von tBHQ und SFN von einer ausgewogenen Selenversorgung abhängen. Demzufolge wirken tBHQ bzw. SFN mit dem vorhandenen Selen in einer synergistischen Weise, jedoch nur so lange, wie die GI-GPx-Expression ihr maximales Level noch nicht erreicht hat.

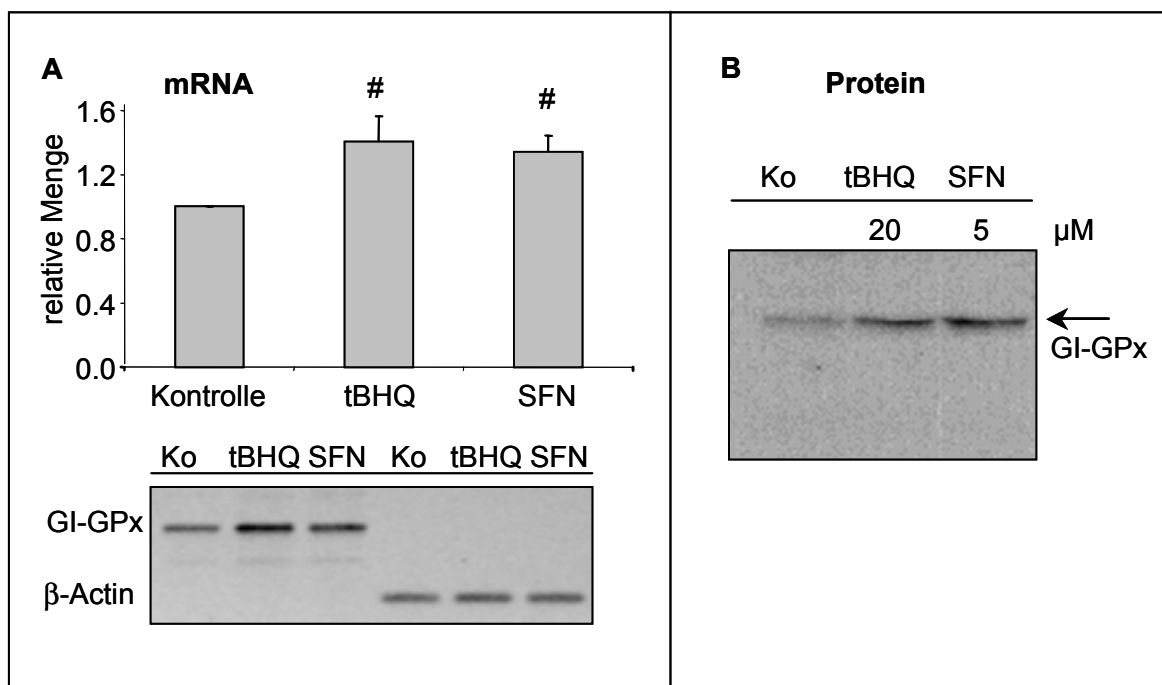


Abb. 15. Stimulation der GI-GPx-Expression in CaCo-2-Zellen durch tBHQ und SFN

(A) GI-GPx mRNA-Expression in CaCo-2-Zellen: Die Behandlung der Zellen erfolgte wie für HepG2-Zellen (Abb. 14A). Das in der Abbildung dargestellte Gel ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche. # $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

(B) GI-GPx Protein-Expression in CaCo-2-Zellen: Die Behandlung der Zellen erfolgte wie für HepG2-Zellen (Abb. 14B). Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot.

3.2 Die PHGPx als Regulator redoxsensitiver Signalkaskaden

3.2.1 Charakterisierung von SMC und SMC^{PHGPx}

Die hier verwendeten PHGPx-überexprimierenden glatten Muskelzellen (SMC^{PHGPx}) wurden in Kooperation mit der Universität Kuopio (Finnland) mittels retroviraler Transfektion generiert [82]. Ziel war es, ein Modell zu schaffen, mit dem eine mögliche Beeinflussung redoxsensitiver atheroskleroserelevanter Signalkaskaden durch die PHGPx unabhängig von anderen Glutathionperoxidasen untersucht werden könnte. Um eine Eignung der transfizierten Zelllinie festzustellen, wurde diese zunächst im direkten Vergleich mit den Wildtyp-Zellen charakterisiert.

3.2.1.1 GPx-Aktivitäten

Die Gesamt-GPx-Aktivität wurde mit H₂O₂ als Substrat bestimmt, die Aktivität der PHGPx selektiv durch Verwendung von PCOOH als Substrat. Die gemessene Gesamt-GPx-Aktivität war in beiden Zelllinien vergleichbar und ließ sich durch eine Selensupplementation deutlich steigern. Die Aktivität der PHGPx ließ sich ebenfalls in allen Zellen durch Selensupplementation steigern, jedoch wiesen SMC^{PHGPx} grundsätzlich eine ca. 2 – 2,5-fach höhere PHGPx-Aktivität als SMC auf (Abb. 16A). Diese Erhöhung der PHGPx-Aktivität war auch im Kernlysat sichtbar, allerdings nicht auf signifikantem Niveau ($p < 0,06$) (Abb. 16B). Damit war sichergestellt, dass in selensupplementierten SMC^{PHGPx} im Vergleich zu den selensupplementierten Kontrollzellen lediglich die PHGPx-Aktivität erhöht war und deshalb alle Effekte auf diese zurückgeführt werden können.

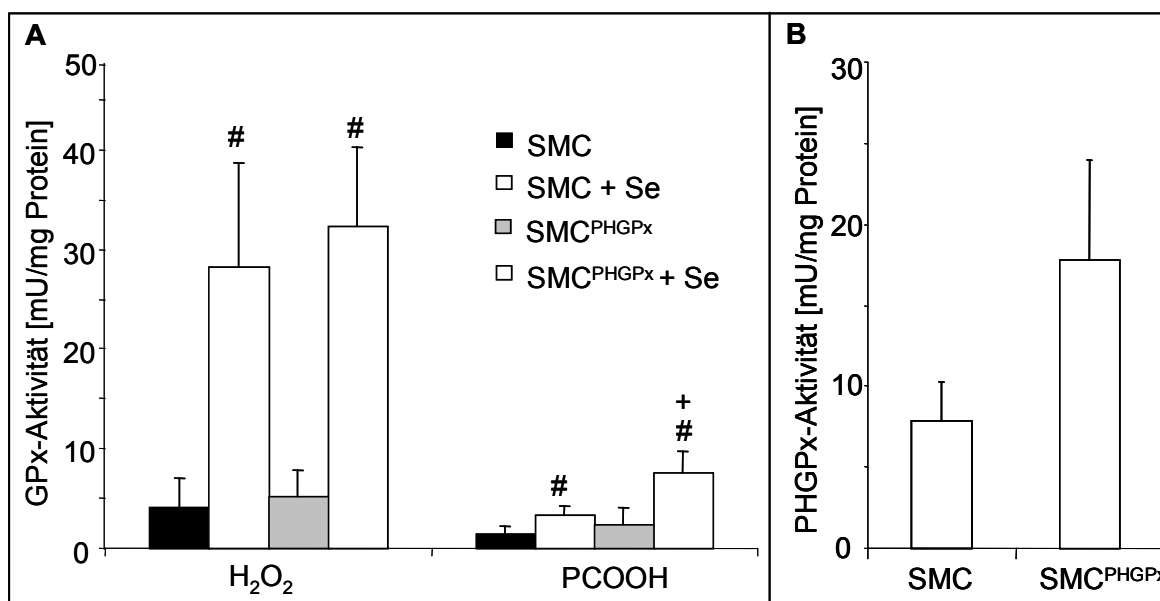


Abb. 16. Gesamt-GPx- und PHGPx-Aktivitäten in SMC und SMC^{PHGPx}

Enzymaktivitäten wurden in Gesamtlysaten (A) oder in Kernlysaten (B) von zuvor für vier Tage gewachsenen Zellen mit oder ohne (A) bzw. nur mit Selensupplementation (100 nM) (B) erfasst. Als Substrat für die Gesamt-GPx-Aktivität diente H₂O₂; die Aktivität der PHGPx wurde selektiv mit PCOOH als Substrat bestimmt. # $p < 0,05$ vs. Zellen ohne Selen, + $p < 0,05$ vs. SMC.

3.2.1.2 Proliferationsrate

Die Proliferationsrate der Zellen wurde mittels MTT-Test erfasst (Abb. 17). Insgesamt wiesen SMC eine im Vergleich zu SMC^{PHGPx} erhöhte Proliferationsrate auf.

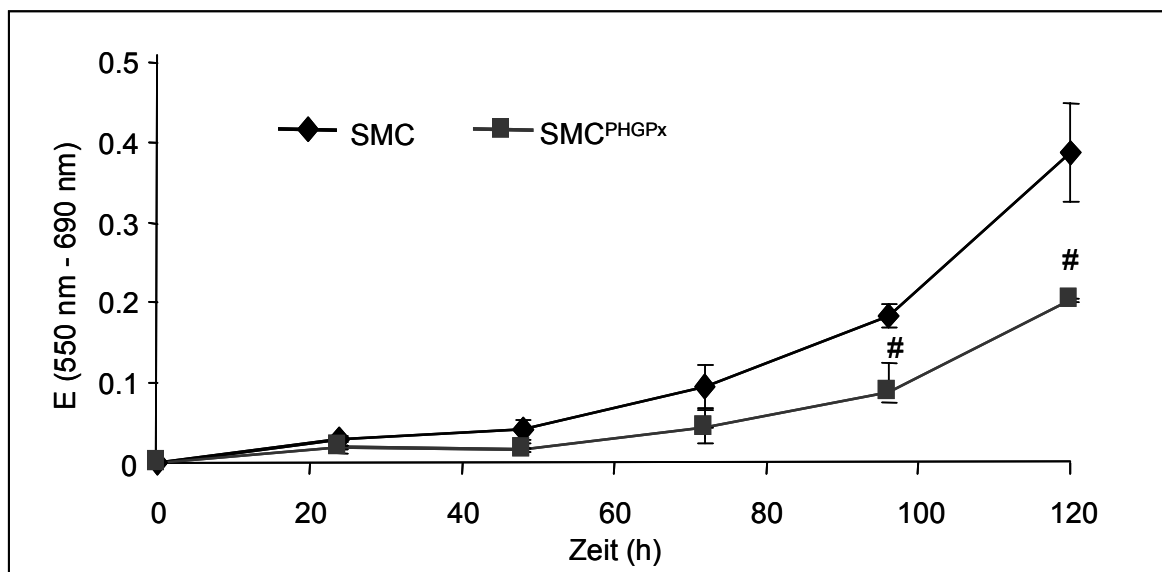


Abb. 17. Proliferationsrate von SMC und SMC^{PHGPx}

Identische Mengen an SMC bzw. SMC^{PHGPx} wurden in 96-well-Platten kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Zellmenge mittels MTT-Test erfasst. # $p < 0,05$ vs. SMC.

3.2.1.3 Glutathionstatus

SMC und SMC^{PHGPx} wurden hinsichtlich ihres Gehaltes an GSH, GSSG und an gemischten Disulfiden (GSSR) charakterisiert. Hierfür wurde der an Glutathionreduktase gekoppelte Ellmann-Test durchgeführt. SMC^{PHGPx} wiesen einen niedrigeren GSSG-, aber einen höheren GSH-Gehalt und somit ein höheres Verhältnis von GSH zu GSSG auf. Des Weiteren war die Menge an GSSR leicht erhöht (Tabelle 6).

Tabelle 6. Glutathionstatus in SMC und SMC^{PHGPx}

	GSH (nmol/mg Protein)	GSSG (nmol/mg Protein)	Verhältnis GSH zu GSSG	GSSR (nmol/mg Protein)
SMC	8,74 ± 1,10	0,16 ± 0,06	64,1	0,494 ± 0,065
SMC ^{PHGPx}	13,31 ± 4,75	0,08 ± 0,01	168,32 #	0,595 ± 0,170

Die Zellen wurden für vier Tage kultiviert und dabei mit 100 nM Natriumselenit supplementiert. Die Menge an Gesamtglutathion, Glutathiondisulfid (GSSG) und gemischten Disulfiden (GSSR) wurde mit Hilfe des an Glutathionreduktase gekoppelten Ellmann-Tests bestimmt. Die Menge an GSH ergab sich durch Subtraktion von 2 x GSSG vom Gesamtglutathion. # $p < 0,05$ vs. SMC.

3.2.1.4 Thiolstatus

Die leichte Erhöhung des Gehaltes an gemischten Disulfiden war überraschend. Deshalb wurde der Gesamt-Thiolstatus der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Monobromobimane (MBrB) erfasst. Tatsächlich war der Gehalt an verfügbaren Proteinthiolen in SMC^{PHGPx} gegenüber den SMC reduziert (Abb. 18). Durch Vorbehandlung der Zellen mit dem Reduktionsmittel TCEP konnte der Proteinthiolgehalt von SMC^{PHGPx} jedoch fast auf das Niveau der SMC angehoben werden. Dies zeigt klar, dass in den PHGPx-überexprimierenden Zellen Proteinthiole oxidiert sind.

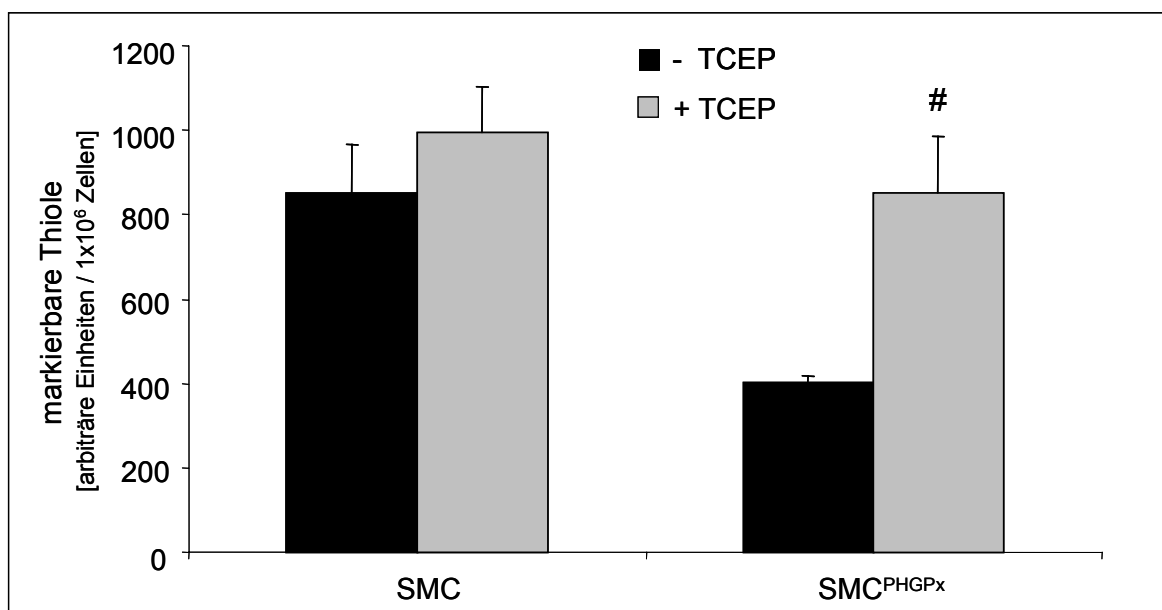


Abb. 18. Intrazellulärer Oxidationsstatus von SMC und SMC^{PHGPx}

Die zellulären Proteinthiole wurden in für vier Tage mit 100 nM Natriumselenit kultivierten Zellen nach 5-stündiger Vorinkubation mit oder ohne TCEP (5 mM) fluorographisch unter Zuhilfenahme des Fluoreszenzfarbstoffes MBrB (100 µM) erfasst. Zur Quantifizierung wurden die gemessenen arbiträren Fluoreszenzintensitäten auf 1×10^6 Zellen normiert. # $p < 0,01$ vs. Zellen ohne TCEP-Vorbehandlung.

3.2.2 VCAM-1-Expression in Kaninchen-SMC

3.2.2.1 Isolierung und Sequenzierung der VCAM-1 cDNA

Als atheroskleroserelevanter Prozess wurde die Expression von VCAM-1 ausgewählt. Da die hier verwendeten Zellen Kaninchenzellen waren, musste zunächst das VCAM-1 dieser Spezies sequenziert werden.

Die Isolierung der VCAM-1 cDNA aus SMC erfolgte mit Hilfe der RACE-Methode und wurde separat für die 5'- und für die 3'-gelegene cDNA Region durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden unter der Genbanknummer AY212510 veröffentlicht. Die 5'-RACE ergab ein PCR-Produkt mit einer Länge von 1615 bp. Bei der 3'-RACE wurden

zwei unterschiedlich lange PCR-Produkte detektiert (1795 bp und 1525 bp; Abb. 19), was schlussfolgern lässt, dass es mindestens zwei unterschiedliche VCAM-1 cDNAs mit einer Gesamtlänge von 3140 bp bzw. 3410 bp gibt.

Sequenzvergleiche mit der bereits bekannten humanen VCAM-1 cDNA (Genbanknummer X53051) ergaben, dass die codierende Region des kürzeren der beiden identifizierten RACE-Produkte die gleiche Länge wie die codierende Region der humanen cDNA aufweist und zu deren Sequenz zu 80% identisch ist. Dies entspricht einer Länge von 739 Aminosäuren und einer etwa 85%-igen Übereinstimmung. Für das humane VCAM-1 wurde eine Struktur, bestehend aus sieben extrazellulären Immunglobulindomänen, einer Transmembrandomäne und einem kurzen cytosolischen Teil, beschrieben [119]. Aufgrund der hohen Homologie zwischen humaner und Kaninchen-Sequenz ist von einem sehr ähnlichen Aufbau des Kaninchen-VCAM-1-Proteins auszugehen. Die längere der beiden detektierten cDNAs enthält eine 270 bp lange Sequenz zwischen Basenpaar 2201 und 2202 der kürzeren cDNA, d.h. zwischen der postulierten siebenten Immunglobulindomäne und der Transmembranregion. Die mögliche Existenz einer solchen zusätzlichen achten Immunglobulindomäne wurde für das Kaninchen-VCAM-1 bereits 1991 von Cybulsky et al. [119] erwähnt, der Nachweis eines derartigen Proteins wurde bisher jedoch nicht erbracht.

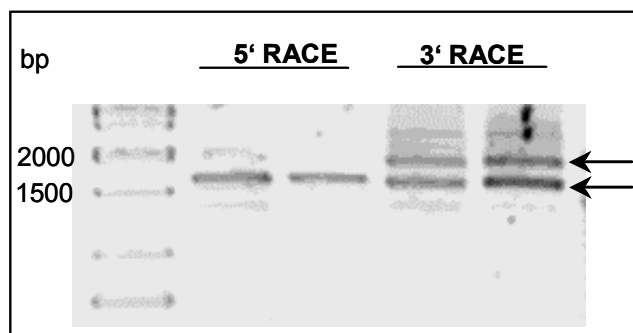


Abb. 19. Kaninchen VCAM-1 cDNA

Ausgehend von der aus Kaninchen-SMC isolierten Gesamt-RNA wurden 5'- und 3'-RACE-Experimente durchgeführt. Für die PCR-Reaktionen wurden jeweils zwei Proben verwendet. Mit der 5'-RACE wurde ein 1615 bp langes Fragment isoliert; die 3'-RACE ergab zwei unterschiedlich lange Fragmente (oberer Pfeil: 1795 bp; unterer Pfeil: 1525 bp)

3.2.2.2 IL-1-induzierte VCAM-1-Expression in SMC und SMC^{PHGPx}

(i) mRNA:

Zunächst wurde die VCAM-1 mRNA-Expression in unstimulierten Zellen in Abhängigkeit vom zellulären Selenstatus mittels Real Time PCR untersucht. Eine Selensupplementation blieb in Wildtyp-SMC ohne Einfluss, resultierte jedoch in SMC^{PHGPx} in einer Reduktion der VCAM-1 mRNA-Menge (Abb. 20). Somit kann davon ausgegangen werden, dass keines der anderen in der Zelle vorkommenden Selenoproteine einen nennenswerten Einfluss auf die VCAM-1-Expression ausübt. Andernfalls wäre in den selensupplementierten Wildtyp-Zellen ein Effekt zu beobachten gewesen. Die infolge einer Selensupplementation beobachtete Reduktion der VCAM-1 mRNA-Menge in

SMC^{PHGPx} korrelierte mit der gesteigerten PHGPx-Aktivität in diesen Zellen. Deshalb wurden alle nachfolgenden Untersuchungen in selensupplementierten Zellen durchgeführt. Eine Stimulation der Zellen mit IL-1 bewirkte einen Anstieg der VCAM-1 mRNA sowohl in SMC als auch in SMC^{PHGPx}. Der Faktor der Induktion war in SMC^{PHGPx} deutlich höher als in SMC, jedoch erreichten die Absolutwerte niemals die in den Wildtyp-Zellen vorgefundenen RNA-Mengen (Abb. 20B).

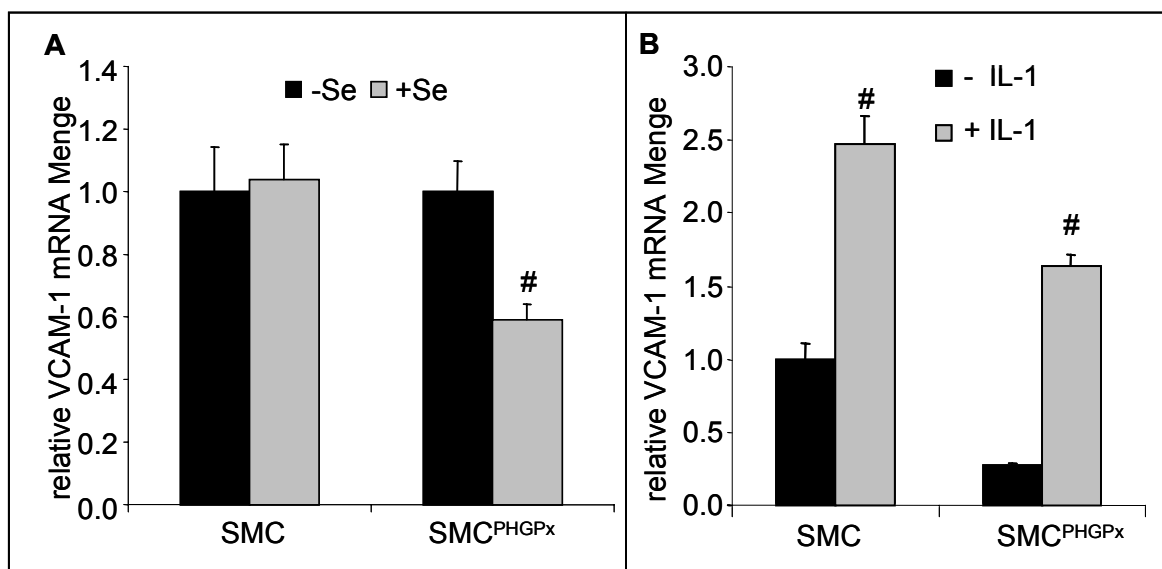


Abb. 20. VCAM-1 mRNA in SMC und SMC^{PHGPx}

(A) Basale VCAM-1 mRNA-Expression in Abhängigkeit von der Selenversorgung: Aus vier Tage in An- oder Abwesenheit von 100 nM Natriumselenit kultivierten Zellen wurde die mRNA revers transkribiert und für Real Time PCR zum Nachweis von VCAM-1 verwendet. Als Kontrollgen diente GAPDH. Die Auswertung erfolgte nach der komparativen Methode, wobei SMC ohne Selensupplementation als Kalibrator dienten. # $p < 0,01$ vs. SMC \pm Selen und vs. SMC^{PHGPx} ohne Selen.

(B) VCAM-1 mRNA-Expression in Abhängigkeit von IL-1: Die Zellen wurden für vier Tage mit 100 nM Natriumselenit kultiviert. Anschließend erfolgte eine 24-stündige Inkubation in serumfreiem Medium bevor die Zellen für 4 h mit IL-1 (1 ng/ml) stimuliert wurden. Weiter wurde vorgegangen wie in (A). SMC ohne IL-1 dienten als Kalibrator. # $p < 0,01$ vs. Zellen ohne IL-1.

(ii) Protein:

Erste Untersuchungen zur VCAM-1-Proteinexpression erfolgten mittels Durchflusszytometrie. Als primärer Antikörper diente der VCAM-1-Antikörper Rb1/9, dessen Tauglichkeit an Kaninchen-Gewebe bereits demonstriert wurde [149]. Während der Messung wurden jeweils 10.000 Zellen erfasst, deren Fluoreszenz anhand des mit Fluorescein markierten Sekundärantikörpers bei einer Wellenlänge von 530 nm ermittelt wurde. Als Referenz dienten Zellen, die keiner Antikörperbehandlung unterzogen wurden. In Abb. 21 sind repräsentative Kurvenverläufe dargestellt. Wildtyp-SMC wiesen im Vergleich zu SMC^{PHGPx} eine deutlich höhere VCAM-1-Expression, sowohl im unstimulierten als auch im mit IL-1

stimulierten Zustand, auf. In beiden Zelllinien konnte die VCAM-1-Expression durch 24-stündige Vorbehandlung der Zellen mit IL-1 (1 ng/ml) erhöht werden.

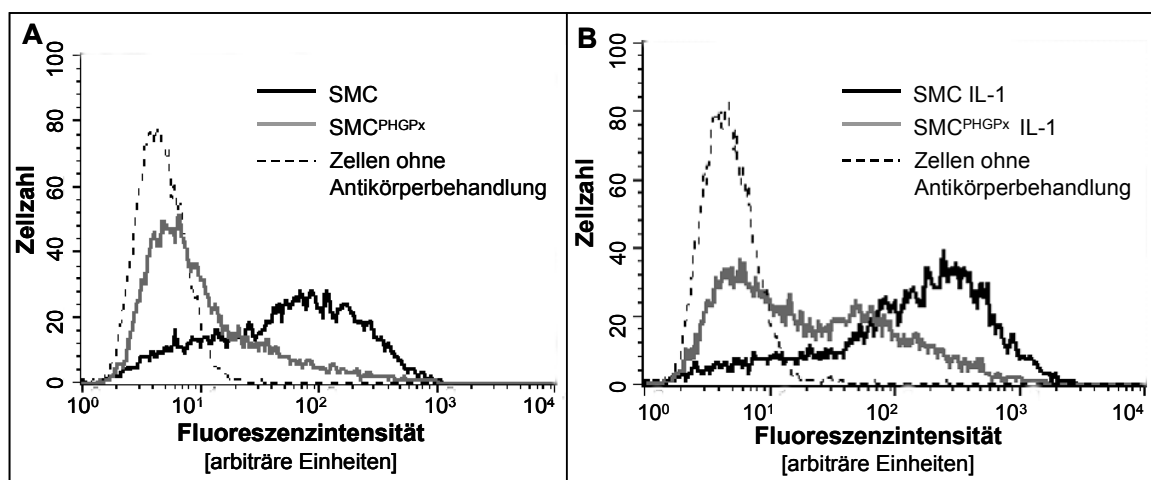


Abb. 21. Durchflusscytometrische Analyse der IL-1-induzierten VCAM-1-Expression in SMC und SMC^{PHGPx}

Die Zellen wurden für drei Tage in Gegenwart von 100 nM Natriumselenit kultiviert und anschließend für 24 h ohne (A) oder mit (B) IL-1 (1 ng/ml) in serumfreiem Medium stimuliert. Die Antikörperbehandlung sowie die anschließende Fixierung der Zellen erfolgten wie unter 2.8 beschrieben. Insgesamt wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Abbildung zeigt repräsentative Kurvenverläufe.

Um die genaue zelluläre Lokalisation von VCAM-1 zu ermitteln, wurde der selbe VCAM-1-Antikörper auch für die immunocytochemische Detektion von VCAM-1 verwendet. Hierfür wurden die entsprechenden Zellen auf Objektträgern kultiviert und für 24 h mit IL-1 (1 ng/ml) stimuliert. Abb. 22 zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen. Anhand der Braunfärbung ist zu sehen, dass VCAM-1 ausschließlich auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Die Verteilung des Proteins auf der Oberfläche ist keineswegs homogen, sondern lässt Bereiche mit unterschiedlich starker Expression erkennen. Wie sich bereits in den Ergebnissen der Durchflusscytometrie angedeutet hat, wiesen SMC eine deutlich höhere VCAM-1-Expression als SMC^{PHGPx} auf. Diese Expression konnte durch Vorbehandlung mit IL-1 nochmals gesteigert werden. Wie schon auf mRNA-Ebene war in SMC^{PHGPx} der IL-1-Effekt ebenfalls deutlich erkennbar, jedoch erreichte die VCAM-1-Expression niemals das in SMC beobachtete Niveau.

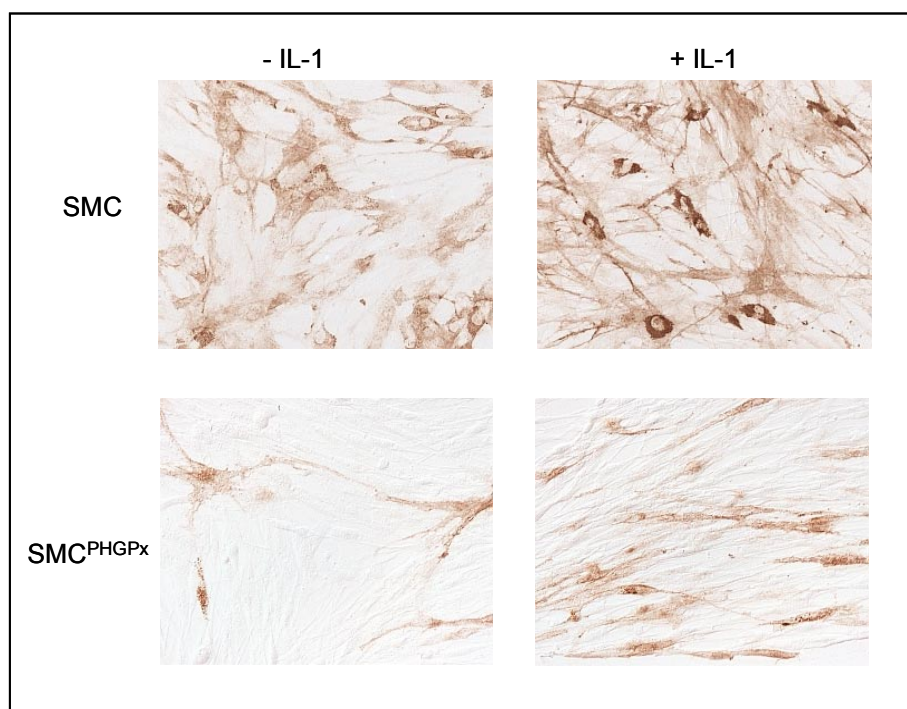


Abb. 22. Immunocytochemischer Nachweis der IL-1-induzierten VCAM-1-Expression auf SMC und SMC^{PHGPx}

SMC und SMC^{PHGPx} wurden für vier Tage in selensupplementiertem (100 nM) Medium auf Objektträgern kultiviert, anschließend für 24 h in serumfreiem Medium (mit 100 nM Selenit) inkubiert und nachfolgend für 24 h mit IL-1 (1 ng/ml) in serumfreiem Medium (mit 100 nM Selenit) stimuliert. Der Nachweis von VCAM-1 erfolgte nach vorheriger Fixierung der Zellen in Methanol und ist anhand der Braunfärbung zu erkennen. Dargestellt sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen.

Da weder Durchflusscytometrie noch Immunocytochemie eine Aussage über das Molekulargewicht des untersuchten Proteins zulassen, wurde die VCAM-1-Expression zusätzlich im Western Blot untersucht. Als Antikörper wurde hierfür der Ziege-anti-Kaninchen-VCAM-1-Antikörper (Pineda, Berlin) verwendet, da der Antikörper Rb1/9 für die Detektion von denaturiertem Protein nicht geeignet war. Auch mit diesem Ansatz konnte die Hemmung der VCAM-1-Expression durch PHGPx bestätigt werden (Abb. 23).

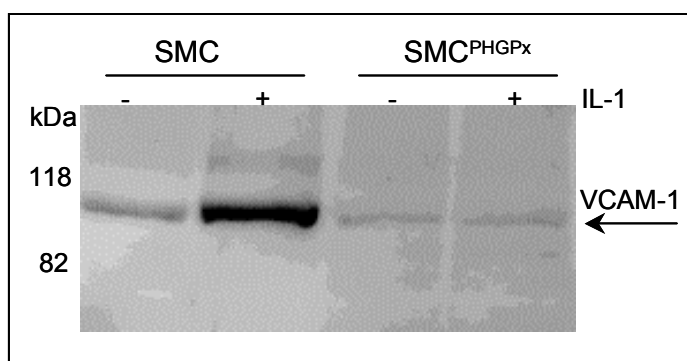


Abb. 23. VCAM-1-Expression in SMC und SMC^{PHGPx}: Western Blot

Je 70 µg Protein aus Gesamtlisaten von für 24 h mit IL-1 (1 ng/ml) in serumfreiem Medium stimulierten Zellen wurde mittels Western Blot auf die Expression von VCAM-1 untersucht. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot.

Das im Western Blot detektierte Protein wies allerdings ein Molekulargewicht auf, welches höher als das für VCAM-1 errechnete Molekulargewicht von 82 kDa war. Bei auf der Zelloberfläche lokalisierten Proteinen ist eine posttranslationale Proteinmodifikation durch Glycosylierung weit verbreitet. Auch für VCAM-1 geht man von einer derartigen Proteinmodifikation aus. Um dies nachzuweisen, wurden die für Western Blots eingesetzten Zelllysate zusätzlich mit einer N-Glycosidase (PNGase F) behandelt. Diese Vorbehandlung der Proben bewirkte eine Verringerung des Molekulargewichtes des im Western Blot detektierten Proteins auf das errechnete Molekulargewicht von 82 kDa (Abb. 24). Des Weiteren resultierte eine derartige Behandlung im Vorhandensein von nur einer Proteinbande, was vermuten lässt, dass die zuvor erwähnte VCAM-1-Variante mit acht Immunglobulin-domänen nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß in Kaninchen-SMC vorkommt.

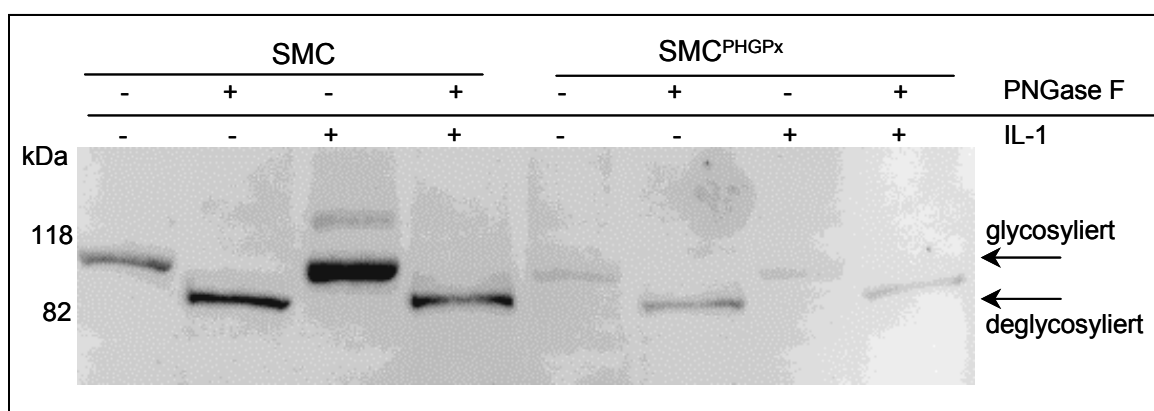


Abb. 24. Nachweis von glycosyliertem VCAM-1

Je 70 µg Protein aus Gesamtlysaten von für 24 h mit IL-1 (1 ng/ml) in serumfreiem Medium stimulierten oder unbehandelten Zellen wurde mittels Western Blot auf die Expression von VCAM-1 untersucht. Die Hälfte der Proben wurde zuvor über Nacht mit 0,5 U PNGase F bei 37°C inkubiert.

3.2.3 Charakterisierung des Kaninchen-VCAM-1-Promotors

3.2.3.1 Isolierung des VCAM-1-Promotors mittels „Genome Walking“

Die Sequenz des Kaninchen-VCAM-1-Promotors ist nicht bekannt, weshalb dieser mittels „Genome Walking“ isoliert wurde. Das längste der erhaltenen Fragmente stammt aus dem *Hinc II*-Spaltansatz (siehe 2.5.2) und weist eine Länge von 1934 bp auf. Die Sequenz wurde unter der Genbanknummer AY699272 veröffentlicht. Der Transkriptionsstart wurde mittels 5'-RACE ermittelt und ist dem ATG um 107 bp vorgeschaltet. Die Sequenz des erhaltenen DNA-Fragmentes wurde mit den bereits bekannten humanen und murinen VCAM-1-Promotorsequenzen (Genbanknummern M92431 und L22301) verglichen und weist zu diesen eine sehr hohe Übereinstimmung, vor allem im Bereich zwischen -112

und -350 bp, auf. Es kann also davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem isolierten DNA-Fragment in der Tat um den VCAM-1-Promotor handelt.

Die Sequenz des Kaninchen-VCAM-1-Promotors wurde auf potentiell vorhandene Transkriptionsfaktorbindestellen untersucht. Die Analyse ergab eine Vielzahl möglicher Transkriptionsfaktoren. Von besonderem Interesse waren zwei Bindestellen für den Transkriptionsfaktor NF- κ B, welche sich in einem hochkonservierten Abschnitt des Promotors befinden (Position -212 bis -162: 5'-GGGTTTCCCTTGAAGGGATTTCCTCC-3'), und deren Existenz bereits für die humane und die murine Promotorsequenz beschrieben wurde [120, 128].

Ausgehend von dem 1934 bp langen Fragment wurden fünf weitere Deletionskonstrukte generiert. Von den insgesamt sechs zur Verfügung stehenden Promotorkonstrukten besitzen die Konstrukte I – IV noch beide der potentiellen NF- κ B-Bindestellen, wohingegen Konstrukt V nur noch eine und Konstrukt VI keine NF- κ B-Bindestelle enthält (Abb. 25).

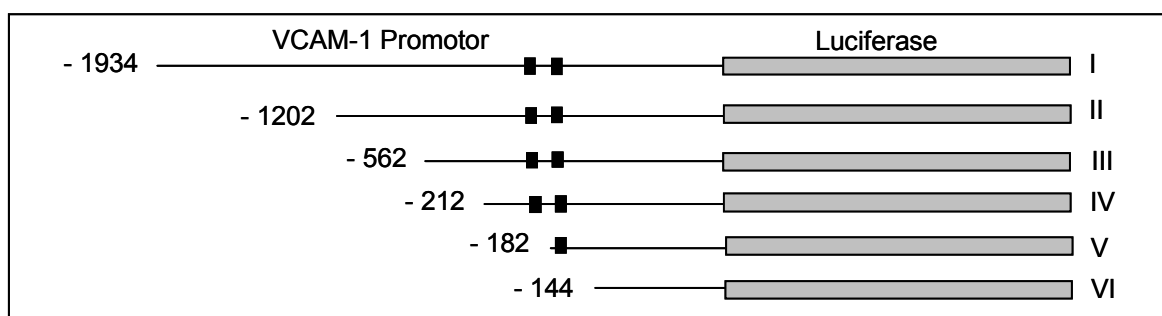


Abb. 25. Skizze des Kaninchen VCAM-1-Promotors

Das 1934 bp lange Fragment des VCAM-1-Promotors wurde mittels „Genome Walking“ aus Kaninchen-SMC isoliert und in den Reportergenvektor pGL3-basic kloniert. Ausgehend von Konstrukt I wurden fünf weitere Reportergenkonstrukte generiert. Die im VCAM-1-Promotor enthaltenen potentiellen NF- κ B-Bindestellen sind durch schwarze Rechtecke angedeutet. Die Zahlen markieren die Position ausgehend vom ATG.

3.2.3.2 Untersuchung der IL-1-abhängigen VCAM-1-Promotoraktivität

Die VCAM-1-Promotoraktivität wurde in unstimulierten und in zuvor mit IL-1 stimulierten Zellen verglichen (Abb. 26). Die Stimulationszeit von 3 h wurde in einer zuvor durchgeführten Zeitreihe als optimal erkannt. Die Aktivität des VCAM-1-Promotors war sowohl in SMC als auch in SMC^{PHGPx} durch IL-1 stimulierbar. Der IL-1-Effekt war jedoch nur in den Konstrukten I – IV erkennbar. Weiterhin fiel auf, dass die Promotoraktivität in SMC^{PHGPx} deutlich niedriger war als in SMC. Somit korrelierten die auf mRNA- und Proteinebene gemachten Beobachtungen mit den Promotoraktivitäten.

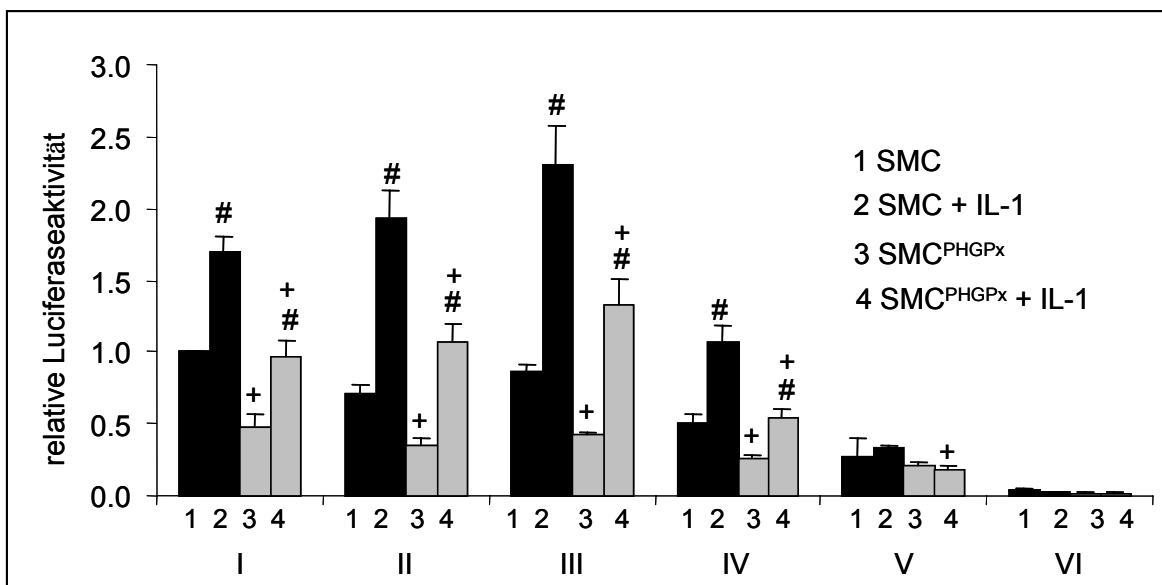


Abb. 26. VCAM-1-Promotoraktivität in SMC und SMC^{PHGPx} in Abhängigkeit von IL-1

SMC und SMC^{PHGPx} wurden transient mit den in Abb. 25 beschriebenen Konstrukten des VCAM-1-Promotors transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde für 3 h mit IL-1 (1 ng/ml) in serumfreiem Medium stimuliert. Die relative Luciferaseaktivität von Konstrukt I in SMC ohne IL-1-Behandlung wurde auf 1 gesetzt und alle anderen darauf bezogen. # $p < 0,05$ vs. unstimulierte Probe, + $p < 0,05$ vs. respektive Wildtypzelle.

Die beschriebenen Reporter-genuntersuchungen wurden außer in SMC auch in PHGPx-überexprimierenden ECV304 durchgeführt, um zu überprüfen, ob der PHGPx-Effekt auch in einem anderen Zellsystem zu finden ist. Eine Inkubation mit IL-1 bewirkte auch in diesem Zellsystem einen Anstieg der Promotoraktivität (Abb. 27).

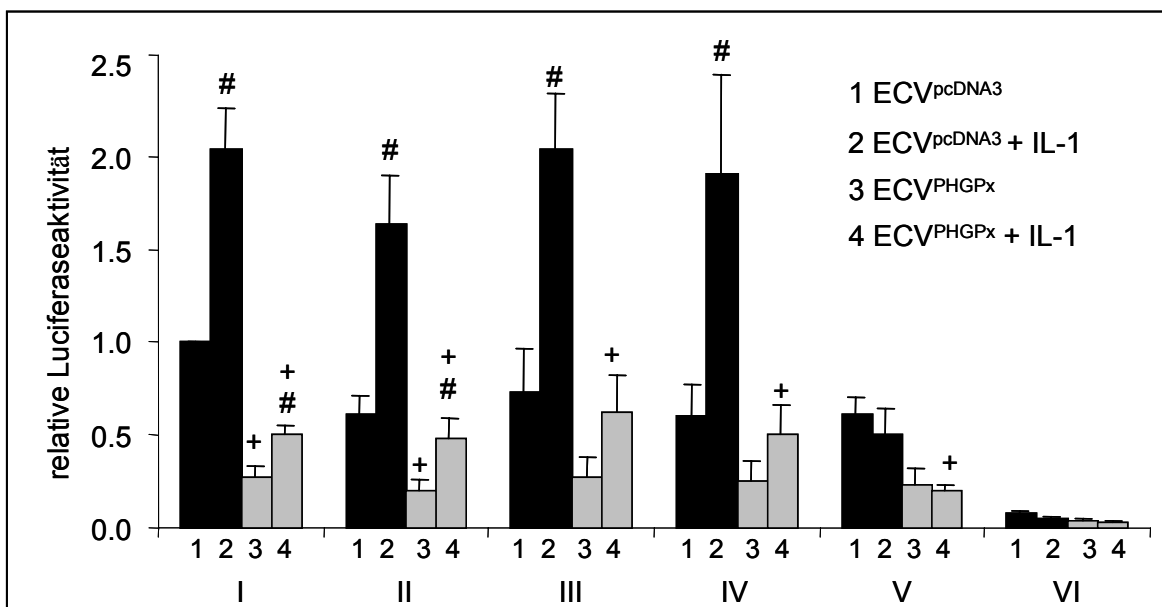


Abb. 27. VCAM-1 Promotoraktivität in ECV^{pcDNA3} und ECV^{PHGPx} in Abhängigkeit von IL-1

ECV^{pcDNA3} und ECV^{PHGPx} wurden transient mit den in Abb. 25 dargestellten Konstrukten des VCAM-1-Promotors transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde für 3 h mit IL-1 (1 ng/ml) in serumfreiem Medium stimuliert. Die relative Luciferaseaktivität von Konstrukt I in ECV^{pcDNA3} ohne IL-1-Behandlung wurde auf 1 gesetzt und alle anderen darauf bezogen. # $p < 0,05$ vs. unstimulierte Probe, + $p < 0,05$ vs. respektive Wildtypzelle.

Wie schon in den SMC-Zellen war eine Stimulierbarkeit auch hier nur in den Konstrukten I – IV zu finden. Eine weitere Parallele zwischen den beiden Zellsystemen war die im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypzellen deutlich niedrigere Promotoraktivität in den PHGPx-überexprimierenden Zellen.

Um die Bedeutung der beiden im VCAM-1-Promotor vorhandenen NF- κ B-responsiven Elemente auf die basale und die induzierbare Promotoraktivität zu ermitteln, wurden diese im Konstrukt I mutiert. Hierfür wurde die Sequenz des 5'-gelegenen Elementes von GGGTTTCCC in GAGTCTCGC und die des 3'-gelegenen Elementes von GGGATTCCC in GAGATCTCGC geändert. Jegliche Mutation in der NF- κ B-DNA-Bindestelle führte sowohl in SMC als auch in ECV304 zu einem völligen Verlust des IL-1-Effektes (Abb. 28).

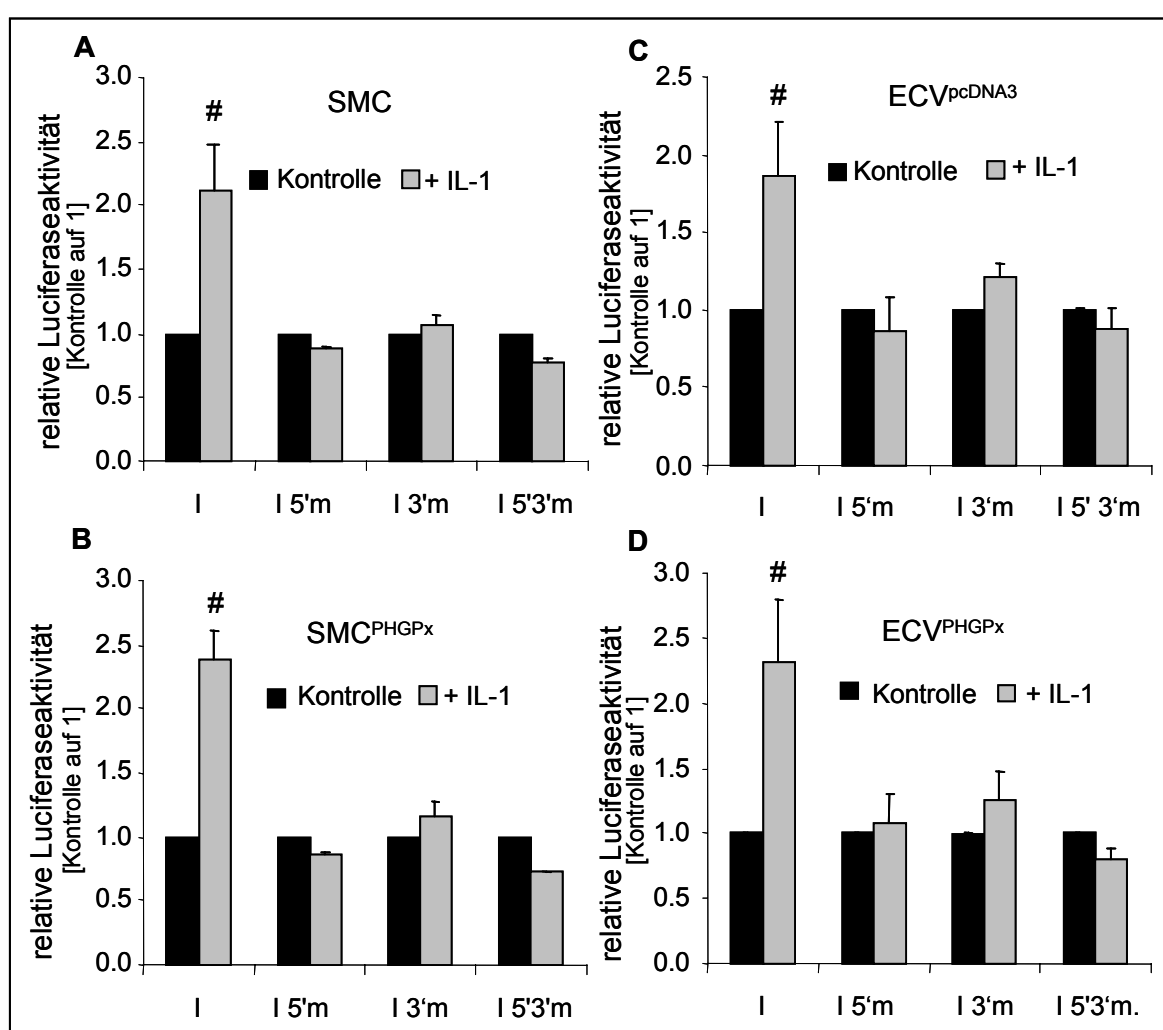


Abb. 28. Einfluss der NF- κ B-Bindestellen auf die IL-1-induzierte VCAM-1-Promotoraktivität in SMC und ECV304

Ausgehend vom VCAM-1-Promotorkonstrukt I wurden entweder die 5'-gelegene, die 3'-gelegene oder beide NF- κ B-Bindestellen mutiert. SMC (A), SMC^{PHGPx} (B), ECV^{pcDNA3} (C) und ECV^{PHGPx} (D) wurden transient mit dem VCAM-1-Promotorkonstrukt I oder den mutierten Konstrukten 15'm, 13'm oder 15'3'm transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde für 3 h mit IL-1 (1 ng/ml) in serumfreiem Medium stimuliert. Die relative Luciferaseaktivität der jeweiligen Kontrollen wurde auf 1 gesetzt. # p < 0,05 vs. unstimulierte Probe.

Hieran wird deutlich, dass NF- κ B für die IL-1-induzierte VCAM-1-Expression erforderlich ist. Nachfolgend sollte getestet werden, ob und auf welcher Stufe die PHGPx die NF- κ B-Aktivierungskaskade hemmen kann.

3.2.4 NF- κ B-Aktivierung in SMC und ECV304

3.2.4.1 Nukleäre Translokation von NF- κ B

Die Menge der NF- κ B-Untereinheiten p50 und p65 wurde im Kernlysate von unstimulierten und von mit IL-1-stimulierten Zellen mittels Western Blot verglichen. In allen untersuchten Proben war nach IL-1-Stimulation eine deutliche Steigerung von im Kern vorhandenen NF- κ B zu verzeichnen, jedoch waren keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und PHGPx-überexprimierenden Zellen erkennbar (Abb. 29A: SMC; Abb. 29B: ECV). Somit scheint die PHGPx den Transport in den Kern sowie vorangegangene cytosolische Prozesse nicht zu beeinflussen. In SMC kann über den Gehalt an p50 keine Aussage getroffen werden, da derzeit kein Antikörper zur Detektion des Kaninchen-p50 zur Verfügung steht.

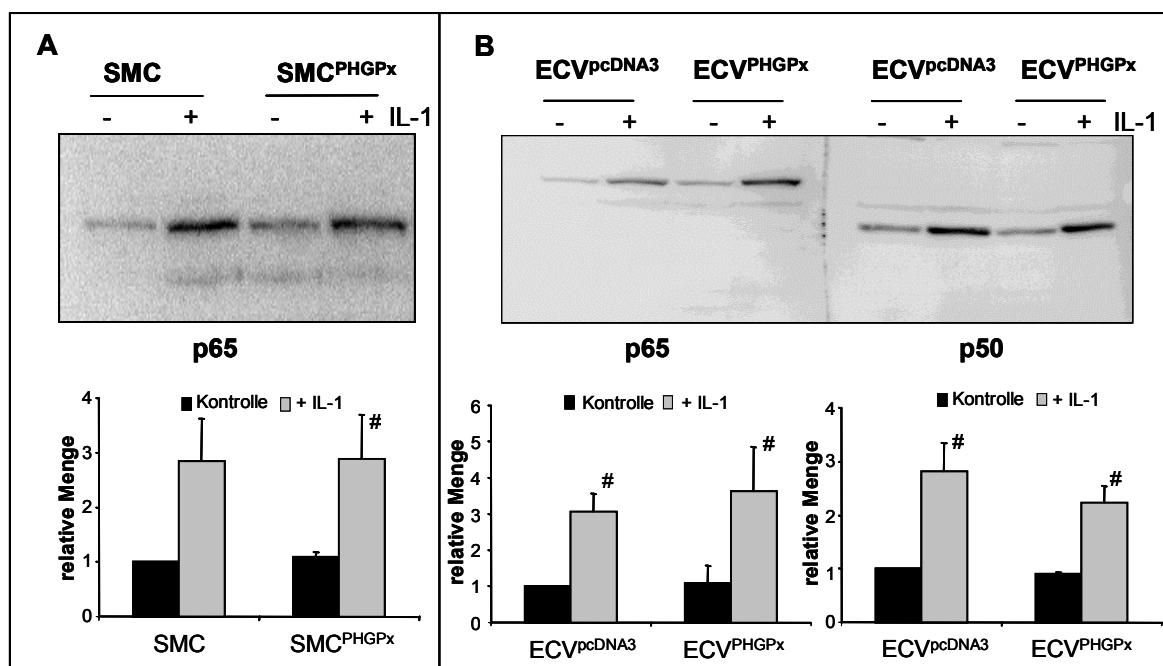


Abb. 29. Nukleäre Translokation von NF- κ B in Abhängigkeit von IL-1

SMC, SMC^{PHGPx} (A) sowie ECV^{pcDNA3} und ECV^{PHGPx} (B) wurden für 30 min mit IL-1 (0,5 ng/ml) in serumfreiem Medium stimuliert. Die Menge an p65 und p50 im Kernlysate (je 30 μ g Protein) wurde mittels Western Blot bestimmt. Drei unabhängige Blots wurden densitometrisch ausgewertet. Die Ergebnisse sind in den Balkendiagrammen dargestellt. #p < 0,05 vs. Kontrolle.

3.2.4.2 NF- κ B-DNA-Bindefähigkeit

Mit Hilfe von EMSA-Experimenten sollte die DNA-Bindefähigkeit von NF- κ B in Wildtyp- und in PHGPx-überexprimierenden Zellen verglichen werden. Eine Vorbehandlung der Zellen mit IL-1 führte zu einer deutlichen Verstärkung der DNA-Bindung (Abb. 30). Dies war sowohl nach 10- als auch nach 30-minütiger Stimulation feststellbar. Die DNA-Bindung war in ECV^{PHGPx} im Vergleich zu den Wildtypzellen sichtbar vermindert. Dieser Unterschied zwischen ECV^{pcDNA3} und ECV^{PHGPx} war jedoch nur dann feststellbar, wenn die eingesetzten Kernlysate ohne DTT hergestellt wurden. DTT reduziert eventuell modifiziert vorliegende SH-Gruppen, die die DNA-Bindefähigkeit beeinflussen können, und würde so eine Modifikation unsichtbar machen. Der PHGPx-Effekt war im SMC-Modell wesentlich geringer ausgeprägt.

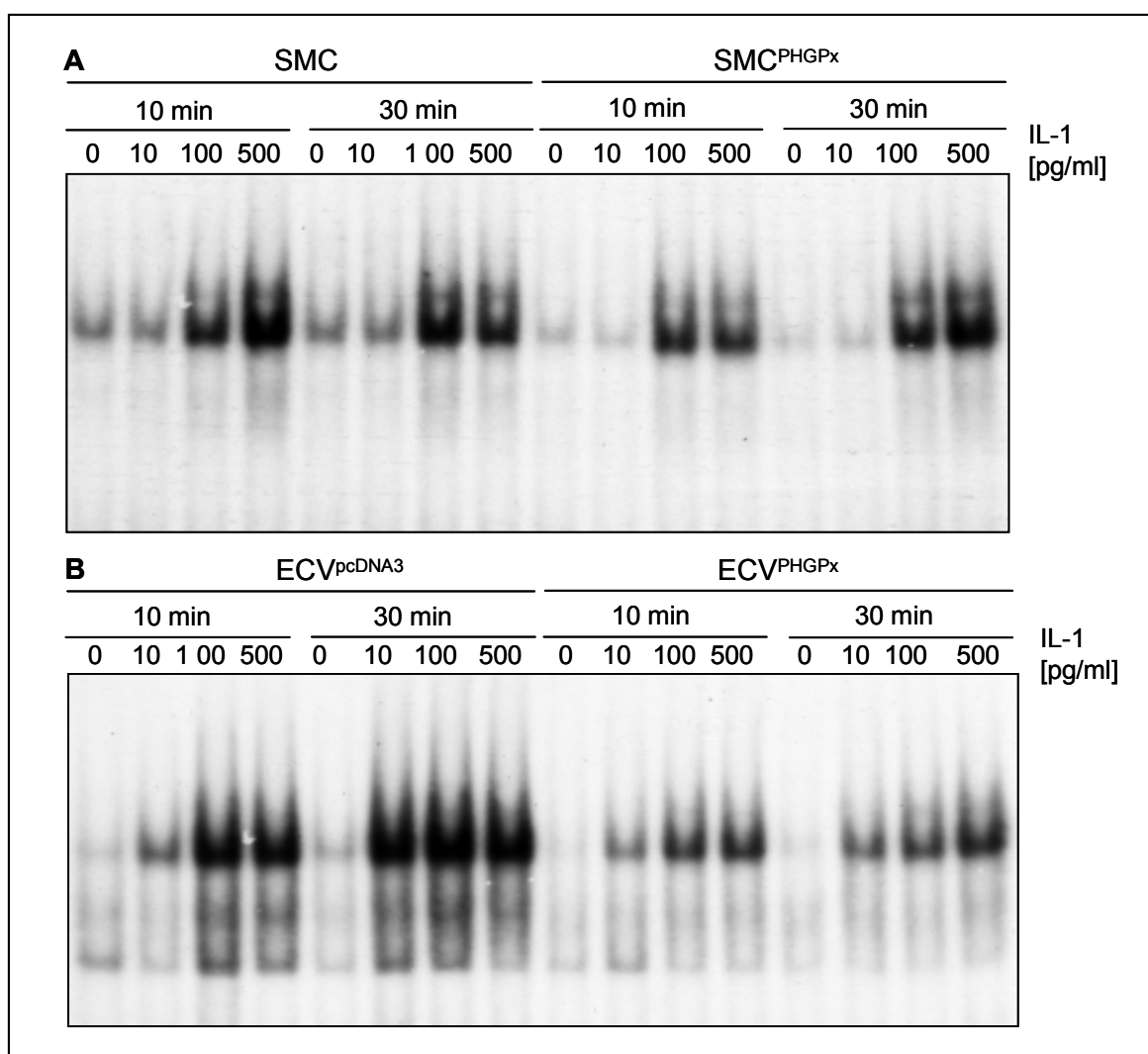


Abb. 30. NF- κ B-DNA-Bindung in Abhängigkeit von IL-1 in SMC und ECV304

SMC, SMC^{PHGPx} (A) sowie ECV^{pcDNA3} und ECV^{PHGPx} (B) wurden mit steigenden Konzentrationen an IL-1 für 10 bzw. 30 min inkubiert. Die erhaltenen Kernlysate wurden für EMSAs mit einem DNA-Oligonukleotid, welches die NF- κ B-Konsensussequenz enthielt, eingesetzt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Die Spezifität der Bindung wurde mit Hilfe von Antikörpern gegen die NF- κ B-Untereinheiten p50 und p65 überprüft. Mit Hilfe des p50-Antikörpers konnte, im Gegensatz zu p65, keine deutliche Supershiftreaktion beobachtet werden. Dies ist wahrscheinlich auf die Qualität des Antikörpers zurückzuführen (Abb. 31). Des Weiteren wurde die Spezifität der Bindung durch 100-fachen Überschuss an nicht-radioaktivem spezifischen oder unspezifischen Oligonukleotid bestätigt (nicht dargestellt).

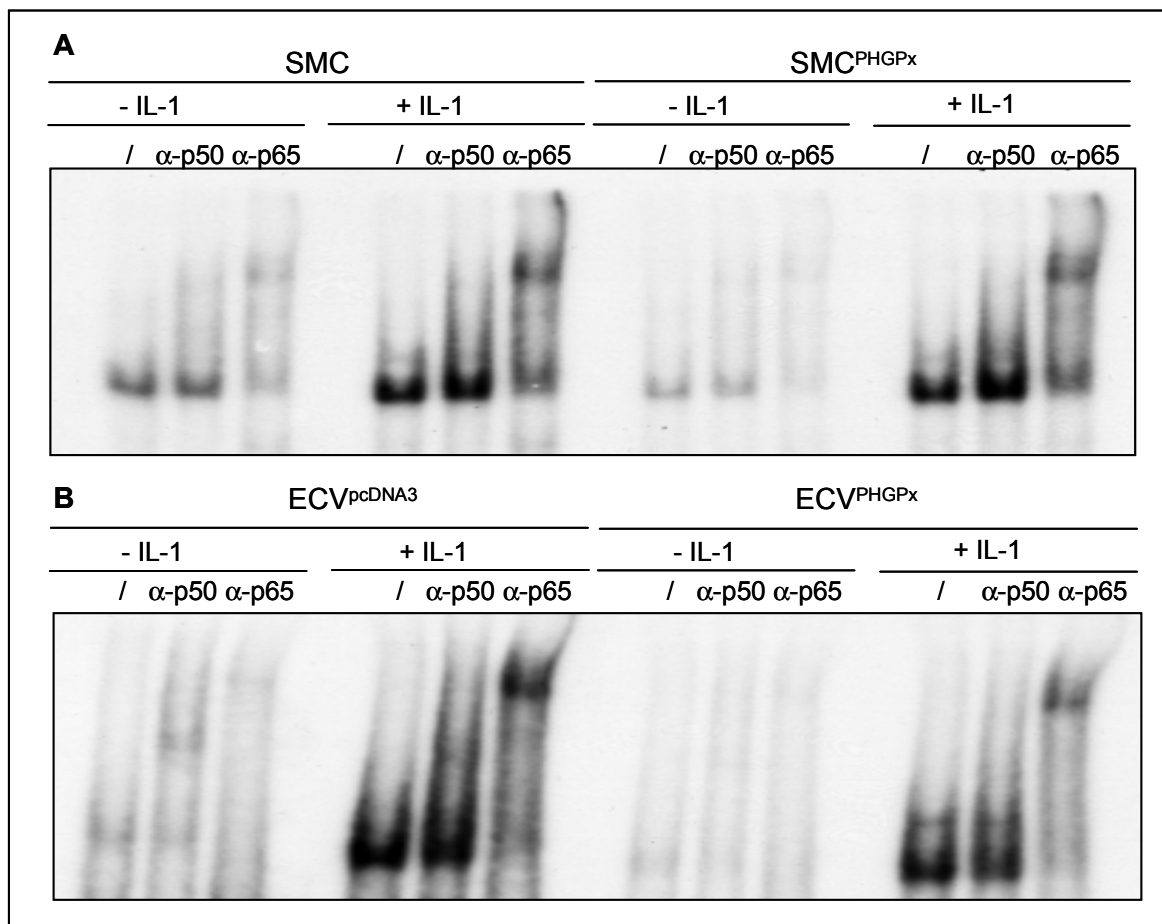


Abb. 31. NF- κ B-Supershift

Die Zellen wurden wie für Abb. 30 beschrieben behandelt. Vor Durchführung der EMSAs wurden die Kernlysate für 15 min mit je 1 μ g p50- oder p65-Antikörper inkubiert (mit α -p50 bzw. α -p65 bezeichnet).

3.2.4.3 Transaktivierungsaktivität von NF- κ B

Weder EMSA noch Western Blot lassen eine Aussage über die durch NF- κ B regulierte Genexpression zu. Deshalb wurde die Transaktivierungsaktivität von NF- κ B getestet. Das bereits für die EMSA-Experimente verwendete Oligonukleotid wurde in den Reporter-genvektor tk-Luc kloniert und für Reporter-genanalysen eingesetzt. Eine PHGPx-Überexpression verminderte die NF- κ B-Transaktivierungsaktivität deutlich (Abb. 32). Dies zeigte sich sowohl in SMC als auch in ECV-Zellen. In SMC und SMC^{PHGPx} lag die basale Reporter-

genaktivität unterhalb der Nachweisgrenze und kann deswegen hier nicht angegeben werden.

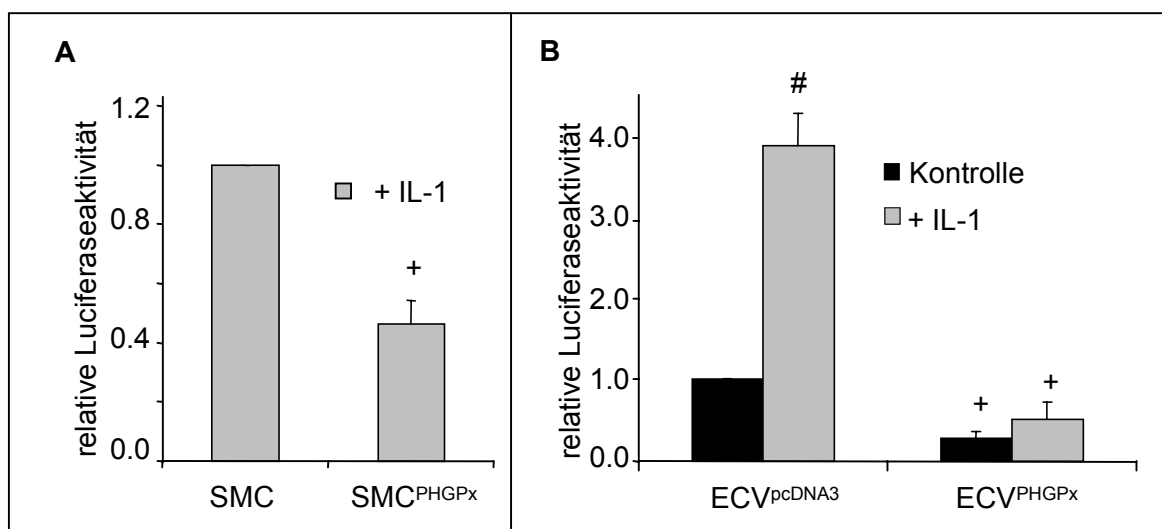


Abb. 32. PHGPx-Überexpression hemmt die Transaktivierungsaktivität von NF- κ B

SMC, SMC^{PHGPx} (A) sowie ECV^{pcDNA3} und ECV^{PHGPx} (B) wurden transient mit dem NF- κ B Reportergenkonstrukt κ B-tk-Luc transfiziert und für 10 h mit IL-1 (1 ng/ml) stimuliert. Da in SMC und SMC^{PHGPx} die basale Reportergenaktivität unterhalb der Nachweisgrenze lag, wurde der für die mit IL-1 stimulierten SMC erhaltene Wert auf 1 gesetzt und die SMC^{PHGPx} hierauf bezogen. In ECV-Zellen wurde die basale Reportergenaktivität auf 1 gesetzt. #p < 0,05 vs. Kontrolle, +p < 0,05 vs. Wildtyp.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass PHGPx die Transaktivierungsaktivität von NF- κ B herabsetzt, dies aber nicht auf einer Verhinderung des Transportes in den Kern basiert und auch nicht entscheidend durch eine Verminderung der DNA-Bindung (zumindest nicht in SMC) bewirkt wird.

3.2.4.4 Phosphorylierung von p65

Von p65 ist bekannt, dass es an einigen Serinresten phosphoryliert werden kann und dass eine solche Phosphorylierung die Aktivität des Transkriptionsfaktors erhöht. Deshalb wurde die NF- κ B-Untereinheit p65 hinsichtlich ihres Phosphorylierungszustandes mittels [³²P]-in vivo Labeling untersucht. Eine Stimulation mit IL-1 führte zu einer verstärkten Phosphorylierung des p65, die in PHGPx-überexprimierenden und in Wildtyp-Zellen gleich war (Abb. 33). Daraus wird erkennbar, dass die verminderte NF- κ B-DNA-Bindefähigkeit in den PHGPx-überexprimierenden Zellen (Abb. 30) nicht auf einen niedrigeren Phosphorylierungsstatus zurückzuführen ist.

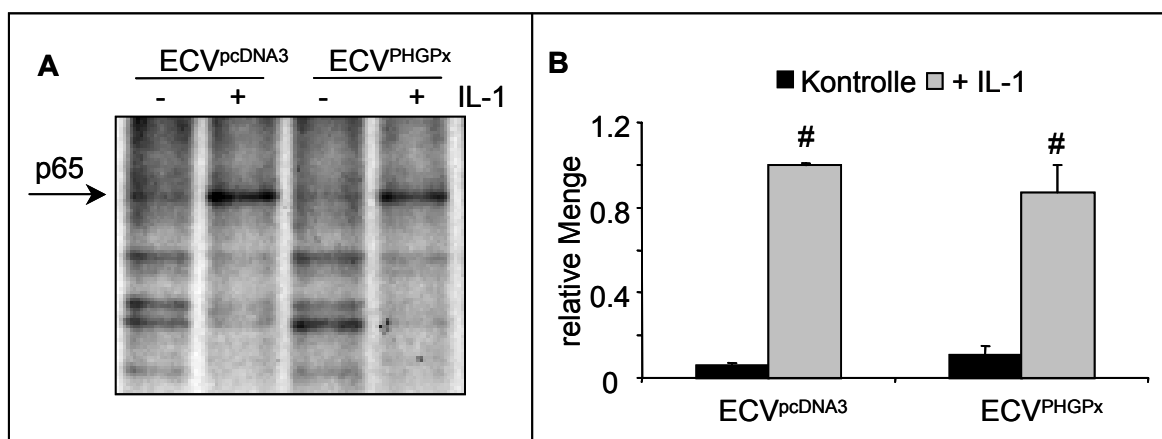


Abb. 33. Einfluss der PHGPx auf den Phosphorylierungszustand der NF- κ B-Untereinheit p65

ECV^{pcDNA3} und ECV^{PHGPx} wurden mit [³²P]-Orthophosphat (100 μ Ci/ml) markiert und anschließend für 30 min mit IL-1 (1 ng/ml) stimuliert. Die NF- κ B-Untereinheit p65 wurde immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Dargestellt sind eine repräsentative Autoradiographie (**A**) sowie die densitometrische Auswertung von drei unabhängigen Experimenten (**B**). #p < 0,05 vs. Kontrolle.

3.2.5 Nrf2-Aktivierung und Expression der Hämoxxygenase-1 in SMC und SMC^{PHGPx}

Nachdem eine Hemmung der NF- κ B-Aktivität als Folge einer erhöhten PHGPx-Aktivität gezeigt werden konnte (siehe Abb. 32), wurde nachfolgend untersucht, ob sich eine PHGPx-Überexpression auch auf die Aktivität eines weiteren redoxsensitiven Transkriptionsfaktors, für dessen Regulation der zelluläre Thiolstatus ebenfalls eine entscheidende Rolle spielt, auswirken kann. Deshalb wurden die Aktivität des Transkriptionsfaktors Nrf2 und die Expression der Nrf2-regulierten Hämoxxygenase-1 (HO-1) in SMC und SMC^{PHGPx} verglichen.

3.2.5.1 Transaktivierungsaktivität von Nrf2

Um zu klären, ob die Zellen unterschiedliche Nrf2- bzw. Keap1-Aktivitäten aufweisen, wurden Reporterassays mit dem im HO-1-Promotor vorkommenden ARE und dem Expressionsplasmid pcDNA3-mNrf2 durchgeführt. Die HO-1 ist ein gut untersuchtes Nrf2-abhängiges Gen. Nrf2 bindet an das HO-1-ARE und induziert so die Expression der HO-1 [158]. Sowohl in SMC als auch in SMC^{PHGPx} führte Cotransfektion mit pcDNA3-mNrf2 zu einer Steigerung der Reporteraktivität. Dieser Effekt war in SMC^{PHGPx} deutlicher ausgeprägt (Abb. 34A). Das zeigt, dass Nrf2 möglicherweise weniger durch Keap1 im Cytosol zurückgehalten werden kann.

3.2.5.2 Hämoxxygenaseaktivität und –expression

Die Expression der Hämoxxygenase-1 (HO-1) wurde sowohl auf mRNA- als auch auf Enzymaktivitätsebene untersucht. SMC^{PHGPx} zeigten im Vergleich zu SMC eine leicht erhöhte HO-1-Expression, wobei die gemessenen HO-1 mRNA-Werte (siehe Abb. 34B) mit denen der Enzymaktivitäten (SMC: 197 ± 62 ; SMC^{PHGPx}: 250 ± 100 pmol Bilirubin / h x mg Protein) korrelierten. Dies zeigt, dass eine erhöhte Nrf2-Transaktivierungsaktivität auch in einer erhöhten Expression der Nrf2-abhängigen HO-1 resultiert.

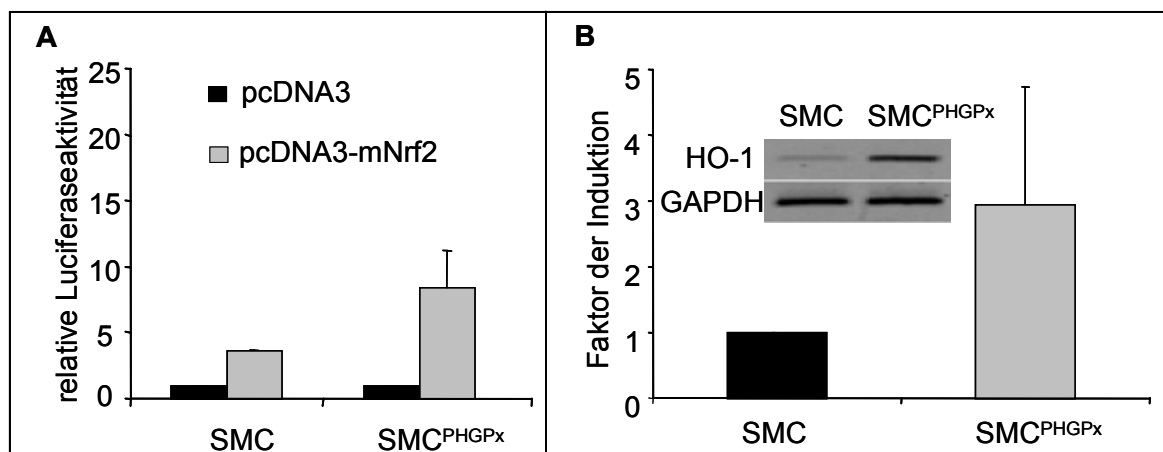


Abb. 34. Nrf2-Aktivität und Expression der HO-1 mRNA in SMC und SMC^{PHGPx}

(A) Nrf2-Transaktivierungsaktivität: SMC und SMC^{PHGPx} wurden transient mit dem Reportergenkonstrukt HO-ARE-pGL und den Expressionsplasmiden pcDNA3-mNrf2 oder pcDNA3 transfiziert und nach 24 h geerntet. Die Reportergenaktivität der jeweiligen mit pcDNA3 transfizierten Proben wurde auf 1 gesetzt.

(B) HO-1 mRNA-Expression: RNA aus zuvor für vier Tage kultivierten selensupplementierten (100 nM) Zellen wurde revers transkribiert und die cDNA der HO-1 mit human-spezifischen Primern, die auch die Kaninchen-Sequenz erkennen, amplifiziert. Als Referenzgen diente GAPDH. Das in der Abb. dargestellte Gel ist repräsentativ für sechs unabhängige Versuche, deren Auswertung densitometrisch erfolgte.

3.2.5.3 Regulation der VCAM-1-Expression durch Nrf2

Da sowohl eine erhöhte Nrf2- als auch HO-1-Aktivität in den PHGPx-überexprimierenden Zellen feststellbar war, wurde getestet, ob das Nrf2/Keap1-System an der Regulation der VCAM-1-Expression beteiligt ist und ob man die VCAM-1-Expression durch direkte Aktivierung der HO-1 hemmen kann.

Die HO-1 kann direkt durch ihr Substrat Häm induziert werden. Deshalb wurde untersucht, inwiefern sich eine Vorbehandlung der Zellen mit Häm auf die endogene VCAM-1-Expression auswirkt. In mit Häm vorinkubierten Zellen war VCAM-1 tatsächlich kaum noch nachzuweisen (Abb. 35). Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass die HO-1 in die Regulation der VCAM-1-Expression eingreift.

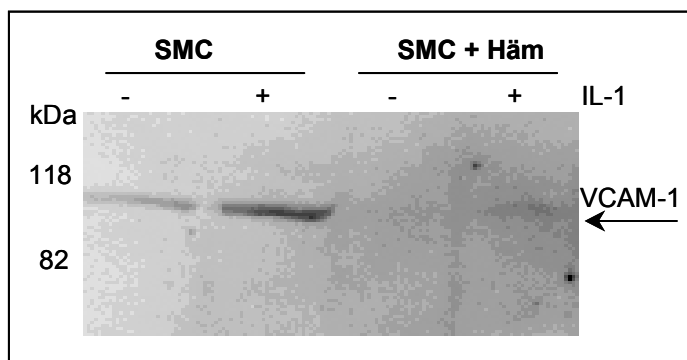


Abb. 35. VCAM-1-Expression in SMC mit und ohne Hämvorbehandlung

SMC wurden für drei Tage kultiviert, anschließend für 24 h mit Häm (10 μ M) vorinkubiert und dann für 24 h mit IL-1 (1 ng/ml) in serumfreiem Medium in Anwesenheit von Häm (10 μ M) stimuliert. Je 60 μ g Protein wurden mittels Western Blot auf die Expression von VCAM-1 untersucht. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot.

Auch war sowohl die basale VCAM-1-Promotoraktivität als auch die Induzierbarkeit des Promotors durch gleichzeitige Transfektion mit dem Nrf2-Expressionsplasmid pcDNA3-mNrf2 unterdrückt. Cotransfektion mit pcDNA3-mKeap1 machte den Nrf2-Effekt teilweise rückgängig. Demzufolge kann Nrf2 die basale und die IL-1-induzierte VCAM-1-Promotoraktivität hemmen und hat somit eine ähnliche Auswirkung wie eine PHGPx-Überexpression.

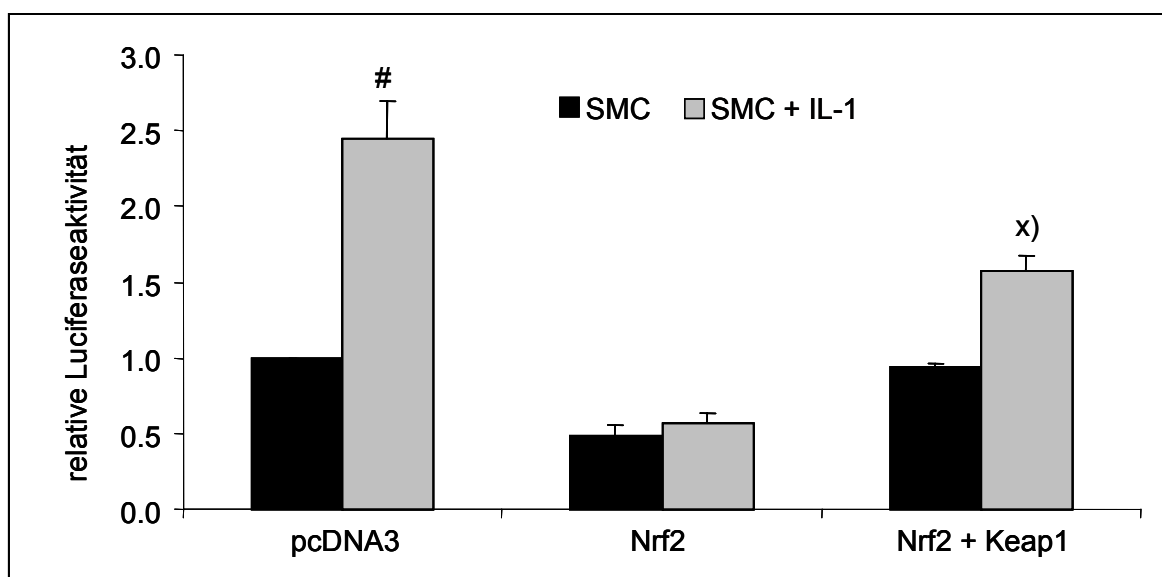


Abb. 36. Modulation der VCAM-1-Promotoraktivität durch das Nrf2/Keap1-System

SMC wurden transient mit dem VCAM-1-Promotorkonstrukt I in Gegenwart der Expressionsplasmide pcDNA3, pcDNA3-mNrf2 oder pcDNA3-mKeap1 transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde für 3 h mit IL-1 (1 ng/ml) in serumfreiem Medium stimuliert. Die relative Luciferaseaktivität der unstimulierten Probe mit pcDNA3 wurde auf 1 gesetzt und alle anderen darauf bezogen. # $p < 0,05$ vs. unstimulierte Probe. x): nur ein Experiment mit drei Proben durchgeführt.

4 DISKUSSION

4.1 Die Regulation der GI-GPx-Expression durch das Nrf2/Keap1-System

Die GI-GPx wurde im Vergleich zu den übrigen Glutathionperoxidase bislang nur wenig analysiert. Vor allem über die Regulation der Expression der GI-GPx ist bis dato kaum etwas bekannt. Aufgrund ihres sehr speziellen Expressionsmusters ist von einem komplizierten Regulationsmechanismus, der sich von dem der anderen Glutathionperoxidase unterscheidet, auszugehen. Der Promotor der humanen GI-GPx wurde von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander isoliert [159, 160]. Chu et al. berichteten vom Vorhandensein eines potentiellen Retinsäure-responsiven Elementes und waren weiterhin in der Lage, die Expression der GI-GPx auf mRNA-Ebene durch *all-trans*-Retinsäure in MCF-7-Brustkrebszellen, jedoch nicht in HT29-Duodenalkrebszellen zu induzieren. Ob das im Promotor lokalisierte Retinsäure-responsive Element für diese Effekte verantwortlich war, wurde jedoch nicht untersucht [159].

Glutathionperoxidase haben gemeinsam, dass sie die selbe Reaktion, nämlich den Abbau von Hydroperoxiden zu den entsprechenden Alkoholen, katalysieren. Jedoch üben sie, auch bedingt durch ihre unterschiedliche Lokalisation und Substratspezifität, sehr unterschiedliche Funktionen aus [46, 47, 161]. Aufgrund dieser Diversität ist nicht von einem gemeinsamen transkriptionalen Regulationsmechanismus für Glutathionperoxidase auszugehen. Die Promotoren der einzelnen Glutathionperoxidase weisen keinerlei auffällige Parallelen auf. Der Promotor der cGPx, beispielsweise, verfügt als einziger über zwei Sauerstoff-responsive Elemente („oxygen response elements“, ORE) und lässt sich durch Erhöhung des Sauerstoffpartialdruckes aktivieren [162]. Oxidativer Stress scheint jedoch nicht der einzige Regulator der cGPx zu sein. Die cGPx-Promotoraktivität konnte in humanen osteogenen Sarkomzellen auch durch den Tumorsuppressor p53 [163] und in Neutrophilen durch den Transkriptionsfaktor PU.1 [164] aktiviert werden. Die extrazelluläre pGPx wird wahrscheinlich hinsichtlich des Sauerstoffpartialdruckes im Vergleich zur cGPx entgegengesetzt reguliert. Der Promotor der pGPx verfügt nämlich über ein responsives Element, das spezifisch für den Hypoxie-induzierten Faktor (HIF-1) ist, und lässt sich unter hypoxischen Bedingungen aktivieren [165]. Im Promotor der pGPx befindet sich auch ein potentielles ARE, allerdings wurde dessen Funktionalität bislang nicht untersucht [165]. Über die Regulation der PHGPx ist ebenfalls wenig bekannt. Das PHGPx-Gen enthält acht Exons und zwei alternative Promotoren und codiert für drei verschiedene PHGPx-Varianten: die cytosolische, die mitochondriale und die Spermienkern-PHGPx. Der Promotor, der die Expression der cytosolischen und der mitochondrialen PHGPx reguliert, verfügt über ein funktionales NF-Y-Element [166, 167] sowie über Erkennungssequenzen der Transkriptionsfaktoren

SP1/SP3 und SMAD [167]. Das erste Intron enthält einen alternativen Promotor mit Bindestellen für EGR1 und SREBP1 [168]. Dieser Promotor reguliert die Expression der kernständigen PHGPx [169].

Die Computeranalyse des humanen GI-GPx-Promotors mit dem Programm MatInspector [147] identifizierte neben einer Vielzahl anderer Transkriptionsfaktorbindestellen zwei mögliche Bindestellen für den Transkriptionsfaktor Nrf2. Eines dieser beiden Elemente (GI-ARE-2) stimmte mit der veröffentlichten ARE-Konsensussequenz [99] zu 100% überein und ist spezieübergreifend konserviert. Das GI-ARE-2 wurde hier als funktionales responsives Element charakterisiert, welches sowohl allein als auch im Kontext des mehr als 2000 bp umfassenden GI-GPx-Promotors auf Nrf2 und auf die Nrf2-aktivierenden Substanzen tBHQ, SFN und CUR anspricht (siehe Abb. 6 - 13). Alle Effekte konnten durch Überexpression von Keap1 unterdrückt werden (Abb. 11 - 13). Diese Beobachtungen wurden sowohl in HepG2- als auch in CaCo-2-Zellen gemacht, so dass von einer generellen Regulation des GI-GPx-Promotors durch das Nrf2/Keap1-System ausgegangen werden kann. Eine Mutation innerhalb des GI-ARE-2 resultierte in einem völligen Verlust der GI-GPx-Promotoraktivität, woran deutlich wird, dass Nrf2 nicht nur eine Rolle für die Induzierbarkeit spielt, sondern auch für die basale Promotoraktivität der GI-GPx unersetzbar ist. Aufgrund der beschriebenen drastischen Effekte wurde auf eine Untersuchung von weiteren potentiellen Transkriptionsfaktoren verzichtet. Dennoch ist davon auszugehen, dass Nrf2 sicherlich nicht der alleinige Regulator der GI-GPx-Transkription ist. Da Nrf2 als ubiquitärer Transkriptionsfaktor beschrieben wird, lässt sich mit diesem die gewebespezifische Expression der GI-GPx nicht erklären und macht die Beteiligung anderer Transkriptionsfaktoren wahrscheinlich.

Die hier beschriebenen Experimente wurden nur an humanen Zellen durchgeführt. Da das responsive Element GI-ARE-2 jedoch auch in der GI-GPx-Promotorsequenz der Maus vorzufinden ist, kann angenommen werden, dass die beobachteten Effekte nicht auf den Menschen beschränkt, sondern spezieübergreifend gültig sind. Um dies allerdings mit Sicherheit sagen zu können, müssten die Promotorsequenzen weiterer Spezies analysiert werden. Derzeit sind jedoch keine weiteren GI-GPx-Promotorsequenzen bekannt.

Die verwendeten Nrf2-aktivierenden Substanzen aktivierten nicht nur den isolierten GI-GPx-Promotor vor einem Reporter gen, sondern induzierten auch die endogene GI-GPx. Die Translation der GI-GPx-mRNA war hierbei abhängig vom Vorhandensein von Selenit als Selenquelle für die Selenoproteinsynthese. Die Verfügbarkeit von Selen ist bislang der am besten untersuchte Regulator der Selenoproteinsynthese. Eine vermehrte Transkription muss sich, bedingt durch den komplexen Mechanismus der Selenoproteinbiosynthese, nicht unbedingt auf Proteinebene widerspiegeln. Wie bereits unter 1.1.2.2 geschildert, ist der Einbau von Selenocystein ein cotranslationaler Prozess (siehe Abb. 1),

der das Vorhandensein der mit Selenocystein beladenen tRNA^{Sec} erfordert. Im Selenmangel wird die mRNA der Selenoproteine entsprechend ihrer hierarchischen Stellung abgebaut. Was letztendlich die Stabilität der mRNA reguliert ist nicht genau bekannt, möglicherweise ist es die Stabilität des Translationskomplexes, in dem als einzige selenabhängige Komponente die mit Se-Cys beladene tRNA vorhanden ist. Auch spielt die Sekundärstruktur in der 3'UTR der mRNA eine entscheidende Rolle [48-50]. Eine Erhöhung der mRNA-Konzentration macht bei limitiertem Selenangebot daher nur für Selenoproteine mit stabiler mRNA Sinn. Die GI-GPx ist in der Hierarchie der Selenoproteine sehr weit oben angesiedelt, was aus der Stabilität der mRNA, auch unter Selenmangelbedingungen, deutlich wird [13, 49]. Eine Nrf2-Aktivierung führte im Selenmangel weder in HepG2- noch in CaCo-2-Zellen zu einer vermehrten Expression von GI-GPx-Protein. Auch in selensupplementierten HepG2-Zellen, welche als Krebszellen GI-GPx auf vergleichsweise hohem Niveau exprimieren, konnte keine eindeutige zusätzliche Erhöhung der endogenen GI-GPx durch tBHQ bzw. SFN gezeigt werden. Die GI-GPx-Expression lief in solchen adäquat mit Selen versorgten Zellen wahrscheinlich bereits auf maximalem Niveau (Abb. 14). In selensupplementierten CaCo-2-Zellen dagegen, die GI-GPx auf vergleichsweise niedrigem Niveau exprimieren, war ein deutlicher Anstieg der endogenen GI-GPx-Expression nach tBHQ- oder SFN-Behandlung zu beobachten (Abb. 15). Es ist also möglich, eine anfänglich niedrige GI-GPx-Proteinexpression bei ausgewogener Selenversorgung durch Nrf2-aktivierende Substanzen zu erhöhen.

4.1.1 Konsequenzen einer Nrf2-abhängigen GI-GPx-Expression

Die GI-GPx ist nicht das erste durch Nrf2-Aktivatoren regulierte Selenoprotein. Für die Thioredoxinreduktase-1 konnte ebenfalls eine Induktion mit SFN sowohl auf Promotorebene [170] als auch auf Proteinebene [171] gezeigt werden. Ein Nachweis für die direkte Beteiligung von Nrf2 wurde jedoch nicht erbracht. Die bislang identifizierten Nrf2-Zielgene sind Phase-II-Enzyme und gehören in die Gruppe der antioxidativen und/oder detoxifizierenden Enzyme. Die natürlich vorkommenden Nrf2-aktivierenden Substanzen, wie z.B. SFN, CUR oder β -Naphthoflavon, wurden als chemopräventive Substanzen beschrieben [97, 108]. Besonders für das in Cruciferen (z.B. Broccoli, Rosenkohl) vorkommende Isothiocyanat SFN, bei welchem es sich um ein Hydrolyseprodukt des Glucosinolates Glucoraphanin handelt, sind vielfältige gesundheitsförderliche Eigenschaften bekannt [172]. Zahlreiche Studien berichten von einer inversen Korrelation zwischen dem Verzehr von Cruciferen und dem Risiko für verschiedene Krebserkrankungen, jedoch hauptsächlich für Lungen-, Magen- sowie Colon- und Rektumkrebs (Übersicht in: [173]). Viele Nrf2-regulierte Enzyme werden

aufgrund ihrer detoxifizierenden Eigenschaften als anticancerogen klassifiziert, was durch die Tatsache, dass Nrf2-Knockout-Mäuse nach Behandlung mit Benzo[*a*]pyren eine erhöhte Tumorzinzidenz im Magen aufwiesen, untermauert wird [101]. Die Gruppe der unbehandelten Nrf2-Knockout-Mäuse unterschied sich hinsichtlich des Auftretens von spontanen Tumoren bis zum Ende der Untersuchung (Alter der Mäuse: 37 – 40 Wochen) nicht von den Wildtypmäusen. Nach Behandlung der Mäuse mit der chemopräventiven, Nrf2-induzierenden Substanz Oltipraz war jedoch eine Verminderung der spontanen Tumorzinzidenz im Magen von Wildtypmäusen, jedoch nicht in Nrf2-Knockout-Mäusen zu beobachten [101].

Die Konsequenzen einer erhöhten GI-GPx-Expression sind vielfältig. In Frage kommen:

(i) Reduktion von ROOH:

Alle Glutathionperoxidasen reduzieren ROOH zu den entsprechenden Alkoholen und verhindern so ROOH-vermittelte oxidative Schädigungen. Besonders im GIT können von einem Übermaß alimentärer oder von gastrointestinalen Mikroorganismen gebildeter ROOH toxische Wirkungen auf die Zellen der Darmmukosa ausgehen und das Entstehen verschiedener chronischer Erkrankungen (z.B. chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Krebs) begünstigen. Membranlipide, aber auch Proteine und Nukleinsäuren sind anfällig gegenüber oxidativen Einflüssen. Die bislang am besten untersuchte Funktion der GI-GPx im Darm besteht in der Bildung einer physiologischen Barriere gegen die Resorption von ROOH, vor allem von Lipid-ROOH. Winkler et al. beschrieben eine selenabhängige Hemmung des Transportes von Lipidhydroperoxiden von der apikalen auf die basolaterale Seite von polarisierten CaCo-2-Zellen. Diese Hemmung war auch unter Selenmangelbedingungen, bei welchen die cGPx nicht mehr, die GI-GPx jedoch noch auf geringem Niveau (20%) exprimiert wurde, nachweisbar [56]. Bei ausreichender Selenversorgung wird die GI-GPx in dieser Funktion von den anderen Glutathionperoxidasen, vor allem aber von der cGPx, unterstützt. Erst das Ausschalten von sowohl cGPx als auch GI-GPx in Doppelknockout-Mäusen resultierte in sichtbaren Veränderungen im GIT (z.B. Colitis), die mit einer Akkumulation von Lipid-ROOH einhergingen [64].

(ii) Beeinflussung der Apoptoserate:

Von der PHGPx und der cGPx ist bekannt, dass sie antiapoptotische Eigenschaften besitzen [76, 77, 174]. Für die GI-GPx liegen derartige Untersuchungen noch nicht vor. Die cGPx/GI-GPx-Doppelknockout-Mäuse zeigten in den ilealen Krypten eine erhöhte Apoptoserate [65]. Das gastrointestinale Epithel weist normalerweise ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Proliferation und Apoptose auf. Eine erhöhte Apoptoserate im Falle eines GI-GPx-Mangels würde dieses Verhältnis aus dem Gleichgewicht bringen, ebenso

wie eine verminderte Apoptoserate. Die möglicherweise antiapoptotischen Eigenschaften der GI-GPx wären antiinflammatorisch, aber eher nicht anticancerogen. Die Rolle der GI-GPx in Entzündungsprozessen und während der Cancerogenese wurde kürzlich in einem Übersichtsartikel erörtert [62]. Hierin wurde der Schluss gezogen, dass die GI-GPx wahrscheinlich nicht direkt in die Cancerogenese eingreift, sondern vorangehende Entzündungsreaktionen hemmt, und somit einen eher indirekten Einfluss auf die Cancerogenese nehmen könnte. Auch hierfür fehlen experimentelle Daten, die dies belegen könnten. Ein solcher Zusammenhang erscheint vor dem Hintergrund, dass chronische Entzündungen die Entstehung von Krebserkrankungen begünstigen können [175], jedoch denkbar.

(iii) Hemmung von COX und LOX:

Glutathionperoxidasen hemmen die Aktivität von Cyclooxygenasen (COX) sowie von Lipoxygenasen (LOX) [72, 176-178], da sowohl COX als auch LOX für ihre Aktivität einen gewissen Hydroperoxidtonus benötigen. Im Gegensatz zur konstitutiv exprimierten COX-1 handelt es sich bei COX-2 um ein induzierbares Enzym, dessen Expression in vielen Fällen von Darm-, Magen- oder Brustkrebs stark erhöht ist [179]. Eine medikamentöse Hemmung der COX-2-Aktivität ist mit einer verminderten Tumorzinzidenz verbunden. Dies zeigte sich sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen [180]. Die Produkte der Lipoxygenasen sind in proinflammatorische Kaskaden involviert. Da sie ungesättigte Fettsäuren zu den entsprechenden Hydroperoxy-Fettsäuren oxidieren, geht man davon aus, dass Lipoxygenasen an der Entstehung und Progression verschiedener Erkrankungen (z.B. Atherosklerose) beteiligt sind [181]. Welche der Glutathionperoxidasen der Hauptregulator von COX bzw. LOX ist, ist nicht klar, es gibt jedoch Hinweise, dass die PHGPx hierfür verantwortlich zu machen ist [73-75, 182]. Über eine Beteiligung der GI-GPx an der Regulation von COX und LOX ist derzeit nichts bekannt. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass die GI-GPx ebenfalls über antiinflammatorische Eigenschaften verfügt. Diese Indizien stammen aus Beobachtungen an cGPx/GI-GPx-Doppelknockout-Mäusen [64, 65]. Im Gegensatz zu cGPx- [183] oder GI-GPx-Knockout-Mäusen [63], welche beide keinen auffälligen Phänotyp besitzen, entwickeln die Doppelknockout-Mäuse Colitis [64] sowie Tumoren in den unteren Darmabschnitten [65]. Diese Beobachtungen konnten jedoch nur dann gemacht werden, wenn der Gastrointestinaltrakt der Mäuse normal mit Mikroorganismen besiedelt war.

Verschiedenen Berichten zufolge findet man in colorektalen Adenomen eine erhöhte GI-GPx-Expression [57-59], es ist jedoch unklar, ob dies nur zu beobachten ist, wenn dem Auftreten des Tumors eine Entzündungsreaktion vorangegangen ist. Florian et al. konnten zeigen, dass die Expression der GI-GPx vor allem in frühen Adenomen stark erhöht ist.

Hierbei war auffällig, dass die GI-GPx dort in sehr geordneten, membrangebundenen Strukturen apikal vom Zellkern, aber nicht im Kern selbst, vorkam [57]. Die GI-GPx colokalisierte mit dem exklusiv im endoplasmatischen Retikulum exprimierten Calnexin, was andeutet, dass die GI-GPx an das endoplasmatische Retikulum assoziiert ist. Weiterhin wurde dargelegt, dass die erhöhte GI-GPx-Expression in den frühen Adenomen immer mit einer ebenfalls stark erhöhten Expression der COX-2 einherging [184]. Ähnliche Befunde zeigten sich bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, wobei die Höhe der GI-GPx-Expression hier mit dem Entzündungsgrad korrelierte. Eine derartige Erhöhung der GI-GPx-Spiegel mit fortschreitender Entzündung wurde als protektiver Mechanismus interpretiert [184]. Von Krebszellen weiß man, dass diese einen erhöhten oxidativen Status aufweisen [185]. Aufgrund dieser Beobachtungen wäre es denkbar, dass die GI-GPx in den frühen Adenomen, bedingt durch den dort vorhandenen oxidativen Status, als eine Art natürliche Abwehr vermehrt exprimiert wird und versucht, der Aktivität der COX-2 entgegenzuwirken. Somit könnten die von einer erhöhten COX-2-Expression resultierenden negativen Auswirkungen unterdrückt werden. Ein derartiger kausaler Zusammenhang zwischen COX-2- und GI-GPx-Expression wurde bislang noch nicht mit experimentellen Daten belegt, ist aber aufgrund der bereits bekannten COX-hemmenden Eigenschaften der PHGPx denkbar.

4.2 Regulation atheroskleroserelevanter Prozesse durch die PHGPx

4.2.1 Modulation des zellulären Redoxstatus durch die PHGPx

Eine erhöhte Expression der ebenfalls als antioxidatives Enzym angesehenen PHGPx wird als günstig betrachtet, da man allgemein davon ausgeht, dass die PHGPx aufgrund der von ihr katalysierten Reaktionen in der Lage sei, Krankheiten, die mit oxidativem Stress assoziiert sind, verhindern oder zumindest verzögern zu können. In der vorliegenden Arbeit ging es vorrangig um die Auswirkungen einer PHGPx-Überexpression auf atheroskleroserelevante Prozesse in glatten Muskelzellen. Die verwendeten Zellen unterschieden sich in ihrer PHGPx-Aktivität deutlich von den als Kontrolle verwendeten Wildtypzellen (Abb. 16). Basierend auf ihrer Aktivität ist von einer 2 – 2,5-fachen Überexpression der PHGPx auszugehen. Eine Erhöhung der PHGPx-Aktivität war auch im Kern sichtbar. Das zur Herstellung der stabil transfizierten SMC^{PHGPx} verwendete Plasmid [82] codiert für die cytosolische Form der PHGPx. Demzufolge wäre eine nukleäre Akkumulation der PHGPx nicht zu erwarten gewesen. Dennoch ist es denkbar, dass die PHGPx, bedingt durch ihr niedriges Molekulargewicht von 19 kDa, auch ohne regulierten Transport in den Kern gelangen könnte. Ein derartiges Verhalten wurde bereits für die cGPx beschrieben [186]. Es ist also damit zu rechnen, dass die PHGPx ebenfalls

in redoxregulierte nukleäre Prozesse eingreifen kann, wie hier für die NF- κ B-DNA-Bindung gezeigt wurde.

Eine Erhöhung der PHGPx-Aktivität resultierte bei den hier untersuchten Zellen in Veränderungen des zellulären Glutathion- und Proteinthiolstatus (Tabelle 6, Abb. 18). SMC^{PHGPx} wiesen, bedingt durch einen verminderten Gehalt an GSSG, ein deutlich erhöhtes Verhältnis von GSH zu GSSG auf, was zum Teil mit der GSSG-reduzierenden Eigenschaft der PHGPx [187] erklärt werden kann. Daneben ist denkbar, dass ein Teil des zellulären GSSG zur Synthese von Glutathion-gemischten Disulfiden (GSSR) genutzt worden ist, deren Gehalt in SMC^{PHGPx} ebenfalls erhöht war. Die PHGPx kann reversibel mit Proteinthiolen interagieren und diese modifizieren [46], was sich in einer verminderten Markierbarkeit freier SH-Gruppen widerspiegelte (Abb. 18). Die PHGPx-überexprimierenden Zellen wiesen im Vergleich zu den Wildtypzellen also einen erhöhten Oxidationsstatus, zumindest in Bezug auf die Markierbarkeit von Proteinthiolen, auf.

Die nachfolgend diskutierten Auswirkungen eines derartig modifizierten Redoxstatus auf den Ablauf redoxsensitiver Signalkaskaden und die daraus resultierenden Änderungen im Expressionsmuster waren vielfältig und entsprachen nicht immer den Erwartungen.

4.2.2 Einfluss der PHGPx auf die Expression von zellulären Adhäsionsmolekülen

(i) VCAM-1:

Die Überexpression der PHGPx verminderte sowohl die basale als auch die IL-1-induzierte Expression von VCAM-1 in Kaninchen SMC. VCAM-1 wurde ausgewählt, weil man dessen induzierter Expression eine Schlüsselstellung in der Atherogenese zuschreibt.

Die hier verwendeten SMC stammen aus der abdominalen Aorta eines Kaninchens [142] und existieren als etablierte Zelllinie. Kaninchen gelten als anerkannte Modelle zur Untersuchung von Atherosklerose und deren Folgeerscheinungen, da es in Kaninchen, im Gegensatz zu Maus oder Ratte, leicht möglich ist, Atherosklerose durch hyperlipidämische Ernährung zu induzieren. Die Nukleotidsequenz des Kaninchen-VCAM-1 war zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht bekannt. Deshalb war es notwendig, die Sequenz der VCAM-1 cDNA zu ermitteln, um, darauf basierend, spezifische Antikörper synthetisieren zu können. Die Sequenzierung der erhaltenen und unter 3.2.2.1 beschriebenen cDNA-Fragmente schuf die Grundlage für die nachfolgenden Expressionsuntersuchungen auf mRNA- und Proteinebene. Des Weiteren wurde der Promotor des Kaninchen-VCAM-1 isoliert und sequenziert und für Promotorstudien in einen Reportergenvektor kloniert.

Die verminderte Expression von VCAM-1 in SMC^{PHGPx} sowohl auf mRNA-, Protein- und Promotorebene (Abb. 21 – 26) legt die Vermutung nahe, dass eine erhöhte PHGPx-Aktivität eine oder mehrere Signalkaskaden der für die VCAM-1-Expression benötigten Transkriptionsfaktoren moduliert. Um sicherzugehen, dass die beobachteten Effekte tatsächlich auf die überexprimierte PHGPx zurückzuführen sind, wurden die Promotorstudien außerdem in einem anderen, in der Arbeitsgruppe etablierten, PHGPx-überexprimierenden Zellmodell wiederholt. Bei den zu diesem Zweck verwendeten ECV304-Zellen handelt es sich um Nierenepithelzellen, die, im Gegensatz zu den retroviral transfizierten SMC^{PHGPx}, stabil mit dem Dendrimer SuperFect® transfiziert wurden. ECV304-Zellen exprimieren VCAM-1 nicht, dennoch war es möglich, VCAM-1-Promotoraktivitäten in Reporterassays zu messen und die Promotoraktivität, ähnlich wie in SMC, durch das Cytokin IL-1 zu steigern. Wie in Abb. 27 zu sehen ist, zeigten die PHGPx-überexprimierenden Zellen (ECV^{PHGPx}) eine im Vergleich zu den Wildtypzellen deutlich verminderte Promotoraktivität. Der hemmende Einfluss der PHGPx auf die VCAM-1-Promotoraktivität war in ECV304 sogar deutlicher ausgeprägt als in SMC. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass sowohl der Faktor der PHGPx-Überexpression (Faktor 3,1 in ECV304, Faktor 2,2 in SMC) als auch die absolute, im Western Blot detektierbare Menge PHGPx pro mg Protein in ECV304 größer ist als in SMC. Ein weiterer Unterschied zwischen SMC^{PHGPx} und ECV^{PHGPx} besteht darin, dass bei der Herstellung der ECV^{PHGPx} (D. Kupper, DIFE, Abt. BIM) ein Expressionsplasmid verwendet wurde, das die codierende Sequenz und das erste Intron unter Kontrolle des CMV-Promotors enthielt. Somit codiert das Plasmid sowohl für die cytosolische als auch für die nukleäre Form der PHGPx, was damals aber noch nicht bekannt war. Demzufolge ist es denkbar, dass in ECV^{PHGPx} ein größerer Anteil der gebildeten PHGPx im Kern lokalisiert ist. Eine solche nukleäre Lokalisation der PHGPx in ECV^{PHGPx} konnte mittels Western Blot und PHGPx-Enzymaktivitätsmessungen bestätigt werden (Daten hier nicht gezeigt). Da die PHGPx in beiden hier untersuchten Zelllinien in der Lage war, die VCAM-1-Promotoraktivität zu hemmen, ist zu vermuten, dass die beobachteten Effekte in der Tat auf die überexprimierte PHGPx zurückzuführen sind.

Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass Selenoproteine die Expression von Adhäsionsmolekülen hemmen können. Beispielsweise zeigte sich in selendefizienten Endothelzellen eine erhöhte Fähigkeit zur Adhäsion von Neutrophilen, jedoch wurde das verantwortliche Selenoprotein nicht benannt [133]. Umgekehrt fand sich in Lungenzellen von mit Ovalbumin behandelten Mäusen nach Selensupplementation eine insgesamt verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen [188]. Ähnlicherweise resultierte eine Supplementation von Endothelzellen mit Selen in einer verminderten Cytokin-induzierten Expression

der Adhäsionsmoleküle VCAM-1, ICAM-1 und E-Selectin [123]. Eine potentielle Beteiligung von Glutathionperoxidasen an der Regulation von Adhäsionsmolekülen wurde von d'Alessio et al. aufgezeigt. Durch die synthetische Substanz BXT-51072, bei der es sich um ein Glutathionperoxidasemimetikum handelt, konnte die Cytokin-induzierte Expression von VCAM-1 und ICAM-1 in Endothelzellen unterdrückt werden [134].

Allgemein wird davon ausgegangen, dass die Adhäsionsmolekülexpression durch einen erhöhten zellulären Oxidationsstatus begünstigt wird. Der hier beobachtete Effekt der PHGPx wäre somit, zumindest teilweise, mit deren Fähigkeit, den zellulären Hydroperoxidtonus zu senken, erklärbar und erscheint vor dem Hintergrund der Befunde anderer Arbeitsgruppen einleuchtend. Aufgrund ihrer Eigenschaft, die Expression des atheroskleroserelevanten VCAM-1 zu reduzieren und die von oxidierten LDL stimulierte Zellproliferation zu verlangsamen [82], sind der PHGPx antiatherogene oder zumindest atheroskleroseverzögernde Eigenschaften nachzusagen.

(ii) ICAM-1:

Nachdem eine Beeinflussung der VCAM-1-Expression durch PHGPx gezeigt werden konnte, wurde die Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküles (ICAM-1) untersucht. Die Expression von ICAM-1 war in dem hier verwendeten Zellmodell durch PHGPx-Überexpression nicht zu beeinflussen (Daten hier nicht gezeigt), weshalb die Untersuchungen diesbezüglich nicht weiter verfolgt wurden. Die gemachten Beobachtungen deuten auf unterschiedliche Regulationsmechanismen für VCAM-1 und ICAM-1 hin. Im Gegensatz zu VCAM-1, dessen Expression auf den Bereich der atherosklerotischen Läsionen und auf Bereiche, die für die Entstehung von Läsionen prädisponiert sind, beschränkt ist, findet man ICAM-1 auch in gesunden Regionen des Blutgefäßes [189]. Eine unterschiedliche Regulation von VCAM-1 und ICAM-1 wurde deshalb bereits von anderen Arbeitsgruppen vermutet [189]. Eine der oben zitierten Arbeiten, die von einer selen- bzw. selenoproteinabhängigen Hemmung von sowohl VCAM-1 als auch ICAM-1 berichtet [123], zeigte weiterhin, dass die beobachteten Effekte für VCAM-1 weitaus deutlicher ausgeprägt waren als für ICAM-1. Dies deutet an, dass die Abhängigkeit der ICAM-1-Expression vom zellulären Redoxstatus im Vergleich zum VCAM-1 weniger stringent ist.

4.2.3 PHGPx und die Aktivität der redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren NF- κ B und Nrf2

Der Promotor des Kaninchen-VCAM-1 wurde hinsichtlich der darin vorkommenden potentiellen Transkriptionsfaktorbindestellen untersucht. Wie bereits für den humanen [128] als auch für den murinen [120] VCAM-1-Promotor beschrieben wurde, verfügt die

Kaninchen-Sequenz ebenfalls über zwei NF- κ B-Erkennungssequenzen, die sich in einem, bei allen bisher untersuchten Spezies (Mensch, Maus, Kaninchen), konservierten Abschnitt des Promotors befinden. Anhand der Reporterogenaktivitäten der VCAM-1-Promotor-Deletionskonstrukte wurde deutlich, dass die Induzierbarkeit der Promotoraktivität durch IL-1 nur in den Konstrukten gegeben war, in welchen noch beide NF- κ B-Bindestellen vorhanden waren. Um die Relevanz des Transkriptionsfaktors NF- κ B für die IL-1-induzierte Aktivität des Kaninchen-VCAM-1-Promotors aufzuzeigen, wurden beide NF- κ B-Erkennungssequenzen unabhängig voneinander bzw. beide gleichzeitig durch Austausch von drei Basen mutiert. Abb. 28 zeigt, dass jegliche Mutation in einer der beiden NF- κ B-Stellen zu einem vollständigen Verlust der Induzierbarkeit des Promotors durch IL-1 führte. Hieran wird deutlich, dass, ähnlich wie bei Mensch und Maus, die VCAM-1-Promotoraktivität des Kaninchens ebenfalls maßgeblich von der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B abhängt.

Wie unter 1.2.1 dargelegt, handelt es sich bei NF- κ B um einen redoxsensitiven Transkriptionsfaktor dessen Aktivität sich auf verschiedenen Ebenen regulieren lässt: (i) auf Ebene der nukleären Translokation, (ii) auf Ebene der DNA-Bindung und (iii) auf Ebene der Transaktivierung. Aufgrund dieses komplexen Regulationsmechanismus wurde eine Modulierung der NF- κ B-Aktivität durch PHGPx auf diesen drei Ebenen untersucht. Eine solche Vorgehensweise ist notwendig, da beispielsweise eine alleinige Messung der nukleären Translokation nichts über die tatsächliche Aktivität des Transkriptionsfaktors, welche unter anderem durch verschiedene posttranslationale Modifikationen beeinflusst werden kann, aussagt. Zur Verifizierung wurden alle Experimente sowohl mit SMC als auch mit ECV304-Zellen durchgeführt.

Eine Überexpression der PHGPx hatte keinen Einfluss auf die nukleäre Translokation der NF- κ B-Untereinheiten p65 und p50 (Abb. 29). Also ist eine Beeinflussung der I κ B-Degradation im Cytosol durch PHGPx auszuschließen. In PHGPx-überexprimierenden ECV304-Zellen war nach IL-1-Stimulation eine deutlich verminderte DNA-Bindfähigkeit im Vergleich zu den Wildtypzellen zu beobachten. In SMC^{PHGPx} zeigte sich dieser Effekt ebenfalls, jedoch war er hier geringer ausgeprägt. Für das unterschiedliche Ausmaß der Inhibierung der DNA-Bindung ist wahrscheinlich die Tatsache, dass ECV^{PHGPx} die PHGPx auf höherem Niveau überexprimieren als SMC^{PHGPx} und diese zudem vorrangig im Nukleus vorzufinden ist, verantwortlich zu machen. Die hier beschriebene Hemmung der DNA-Bindung konnte jedoch nur beobachtet werden, wenn die verwendeten Kernlysate ohne Einsatz des Reduktionsmittels DTT hergestellt wurden. Alle herkömmlichen experimentellen Anweisungen zur Gewinnung von Kernlysaten sehen einen Reduktionsschritt mit DTT vor. Hierdurch würden jedoch alle die DNA-Bindung beeinflussenden oxidativen Modifikationen von Proteinthiolen rückgängig gemacht

werden. Anhand dieser Beobachtungen wird deutlich, dass die verminderte NF- κ B-DNA-Bindefähigkeit in den PHGPx-überexprimierenden Zellen auf eine Veränderung eines oder mehrerer Thiole zurückzuführen ist. Es ist bekannt, dass für die Bindung von NF- κ B an dessen Konsensussequenz bestimmte Cysteinreste des p50 in reduzierter Form vorliegen müssen [85], und, dass eine Modifikation dieser Cysteine durch Glutathionylierung [86] bzw. durch Oxidation oder Alkylierung [87] zu einer Unterdrückung der DNA-Bindung führt. Eine Hemmung der NF- κ B-Aktivierung nach Cytokinstimulation konnte bereits früher in PHGPx-überexprimierenden [81] bzw. cGPx-überexprimierenden [80] Zellen gezeigt werden. Weiterhin war die NF- κ B-DNA-Bindung in T-Zellen durch Behandlung mit Selenit zu hemmen. Allerdings kamen dabei sehr hohe Selendosen (7 μ M) zum Einsatz, so dass als mögliche Erklärung eine direkte Interaktion von Selenverbindungen mit den SH-Gruppen des p50 in Betracht gezogen werden muss [190]. Auch Makropoulos et al. zeigten eine dosisabhängige Unterdrückung der NF- κ B-DNA-Bindefähigkeit durch Selensupplementation. Im Gegensatz zu Kim et al. [190] kamen hierbei aber deutlich geringere Selenmengen zum Einsatz (1 – 100 nM), was eine Beteiligung von Selenoproteinen und nicht eine direkte Wirkung der Selenverbindungen wahrscheinlich macht [191]. Umgekehrt resultierte ein Selenmangel in einer verstärkten NF- κ B-DNA-Bindung [192].

Wie bereits mehrfach erwähnt, verfügt die PHGPx über thiolmodifizierende Eigenschaften. Es wäre demnach denkbar, dass die durch PHGPx-Überexpression erzielte Hemmung der NF- κ B-DNA-Bindung aus einer Modifikation an Thiolen, z.B. von p50, resultiert. Hierbei erscheinen sowohl eine Glutathionylierung des p50, bedingt durch das in Tabelle 6 gezeigte erhöhte Vorkommen an Glutathion-gemischten Disulfiden (GSSR), als auch eine direkte Vernetzung von PHGPx mit p50 möglich.

Die deutlichste Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch PHGPx war auf Ebene der Transaktivierung zu messen (Abb. 32). Die zuvor beschriebene Hemmung der DNA-Bindefähigkeit kann wegen der deutlich verminderten Transaktivierungsaktivität in den PHGPx-überexprimierenden Zellen nicht der alleinige Grund für diesen Effekt sein. Da für NF- κ B, vor allem jedoch für das für die Transaktivierung verantwortliche p65, verschiedene posttranslationale Modifikationen bekannt sind, wurde der nach IL-1-Behandlung vorhandene Phosphorylierungsstatus des p65 untersucht. P65 kann an verschiedenen Serinresten phosphoryliert werden (Übersicht in: [89]). Da keine Hinweise existierten, welche Phosphorylierungsstelle durch PHGPx-Überexpression in ihrem Phosphorylierungsgrad beeinflusst sein könnte, wurde hier der gesamte Phosphorylierungsstatus erfasst, jedoch konnte keine Veränderung durch PHGPx aufgezeigt werden (Abb. 33). Dies muss jedoch nicht zwangsläufig bedeuten, dass die PHGPx keinen Einfluss auf die posttranslationale Cytokin-induzierte Phosphorylierung des p65 hat. Ebenso könnte die

Phosphorylierung von nur einem Serinrest betroffen sein und sich dies durch Messung des gesamten Phosphorylierungszustandes nicht erfassen lassen. In einem kürzlich erschienenen Artikel wurde von einer Hemmung der p65-Phosphorylierung an Serin276 in PHGPx-überexprimierenden Fibroblasten berichtet [193]. Die selben Autoren beschreiben eine Hemmung der NF- κ B-DNA-Bindung und der NF- κ B-Transaktivierung im Reporterassay und zeigen Parallelen zu den hier gemachten Befunden auf. Neben einer Phosphorylierung des p65 sind natürlich auch andere Modifikationen, entweder am NF- κ B selbst oder an einem mit NF- κ B interagierenden Cofaktor, als Resultat einer PHGPx-Überexpression denkbar, jedoch wurden derartige Untersuchungen bislang nicht durchgeführt.

Anhand der hier aufgezeigten Daten bezüglich VCAM-1-Expression und NF- κ B-Aktivität kann die beobachtete Hemmung der VCAM-1-Expression in SMC^{PHGPx} zumindest teilweise auf eine verminderte NF- κ B-Aktivität in diesen Zellen zurückgeführt werden. Dennoch ist davon auszugehen, dass NF- κ B nicht als alleiniger Transkriptionsfaktor für diese Effekte verantwortlich zu machen ist. Von NF- κ B weiß man, dass es vor allem für die Cytokin-induzierte VCAM-1-Expression von enormer Wichtigkeit ist, jedoch sind Unterschiede in der basalen VCAM-1-Expression damit nur unzureichend zu erklären. Anders als beim NF- κ B, für dessen Aktivität die Cysteine des p50 im Kern in reduzierter Form vorliegen müssen (siehe oben), wird Nrf2 durch oxidative Modifikationen von SH-Gruppen des Keap1 aktiviert. Alle bislang bekannten Nrf2-Aktivatoren haben gemeinsam, dass sie mit Proteinthiolen interagieren können. Nachdem gezeigt wurde, dass die PHGPx NF- κ B hemmt, lag, aufgrund der in diesem Punkt gegensätzlichen Regulation von NF- κ B und Nrf2, die Vermutung nahe, dass eine PHGPx-Überexpression sich in einer Erhöhung der Nrf2-Aktivität auswirken könnte. In SMC^{PHGPx} waren tatsächlich die HO-1-Expression und -Aktivität als auch die Nrf2-Aktivität erhöht (Abb. 34). Dies bestätigt die oben genannte Hypothese. Für glatte Muskelzellen konnte bereits gezeigt werden, dass HO-1 die Apoptose stimuliert [194] und die Proliferation hemmt [195]. Weiterhin ist bekannt, dass eine konstitutive NF- κ B-Aktivität Voraussetzung für die Proliferation von SMC ist [196]. Deshalb könnte sich eine verminderte NF- κ B-Aktivität, z.B. infolge einer erhöhten PHGPx-Expression, in einer verminderten Proliferationsrate widerspiegeln. Die Proliferationsrate der hier verwendeten SMC und SMC^{PHGPx} wurde mit Hilfe von MTT verglichen und war in SMC^{PHGPx} vermindert (Abb. 17).

Insgesamt zeigen die hier vorgelegten Ergebnisse, dass eine erhöhte Expression der HO-1, wahrscheinlich bedingt durch eine erhöhte Nrf2-Aktivität, mit einer verminderten VCAM-1-Expression, VCAM-1-Promotoraktivität sowie mit einer verminderten NF- κ B-Aktivität und einer niedrigeren Proliferationsrate korreliert. Dies wirft die Frage nach der

Verbindung zwischen Nrf2 und NF- κ B auf. Eine direkte Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren ist unwahrscheinlich. Die Erkennungssequenzen von Nrf2 und NF- κ B weisen keine Gemeinsamkeiten auf, so dass nicht von einer Konkurrenz um DNA-Bindestellen auszugehen ist. Weiterhin erscheint eine Konkurrenz um Bindungspartner ebenso unwahrscheinlich. Nrf2 bildet Heterodimere mit anderen basischen Leucinzipperproteinen, vor allem jedoch mit den kleinen Maf-Proteinen [107], wohingegen NF- κ B meist als p65/p50-Heterodimer vorkommt. Über eventuelle gemeinsame Cofaktoren, sei es Coaktivatoren oder -repressoren, liegen bislang keine Berichte vor. In der Literatur existieren Hinweise darauf, dass HO-1 eine wichtige Rolle innerhalb dieses Transkriptionsfaktorwechselspiels einnehmen könnte. Chen et al. berichteten von einer Hemmung der VCAM-1-Promotoraktivität durch Nrf2 [197]. Cotransfektion mit Nrf2 führte zu einer Hemmung der VCAM-1-Promotoraktivität, was durch gleichzeitige Cotransfektion mit Keap1 unterbunden werden konnte (Abb. 36).

Die Expression der HO-1 kann direkt durch Häm induziert werden. Deshalb wurde in diesem Zusammenhang untersucht, wie sich eine direkte Induktion der HO-1 auf die VCAM-1-Expression auswirkt. In mit Häm vorbehandelten Zellen war die VCAM-1-Expression stark vermindert (Abb. 35), woraus geschlossen werden kann, dass die Aktivität der HO-1 die Expression von VCAM-1 modulieren kann. Eine verminderte Adhäsionsmolekülexpression nach Hämvorbehandlung konnte bereits für die endothelialen Adhäsionsmoleküle P- und E-Selectin demonstriert werden [198]. Die Bedeutung der HO-1 für die Hemmung der NF- κ B-Aktivität sowie der Adhäsionsmolekülexpression wird außerdem durch die kürzlich erschienene Arbeit von Soares et al. untermauert [199]. Von den Autoren wird berichtet, dass eine Überexpression von HO-1 in humanen Aortenendothelzellen sowohl die Cytokin-induzierte NF- κ B-Aktivität als auch die VCAM-1-Expression hemmt. Der genaue Mechanismus konnte auch von Soares et al. nicht aufgeklärt werden, jedoch gehen die Autoren davon aus, dass die Hemmung von NF- κ B erst nach dessen nukleärer Translokation geschieht, da diese von einer HO-1-Überexpression nicht beeinflusst war [199].

Insgesamt betrachtet resultierte eine PHGPx-Überexpression in einer Veränderung des zellulären Redoxstatus, was einen Einfluss auf die Aktivität der redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren NF- κ B und Nrf2 und somit auf die NF- κ B- bzw. Nrf2-vermittelte Genexpression hatte. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass VCAM-1 in der vorliegenden Arbeit das einzige NF- κ B-regulierte Gen war, dessen Expression untersucht wurde. Ebenso war die HO-1 das einzige Nrf2-abhängige Gen. Ob generell ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten PHGPx-Expression und einer veränderten Expression von NF- κ B- bzw. Nrf2-regulierten Genen besteht, bleibt zu untersuchen.

4.3 Moderater oxidativer Stress als Auslöser zellulärer Verteidigungsmechanismen?

Die hier erhaltenen Ergebnisse machen deutlich, dass der Redoxstatus von Proteinthiolen als wichtiger Regulator für die Nrf2- sowie für die NF- κ B-vermittelte Genexpression angesehen werden kann. Nrf2-Aktivatoren werden oft als Antioxidanzien klassifiziert, sind es aber nicht. Die Aktivierung der Nrf2-vermittelten Genexpression wird von einer Modifizierung von SH-Gruppen eingeleitet, die oxidierend, alkylierend oder arylierend sein kann. Nrf2-Aktivatoren sind elektrophile Substanzen, die oft in einer Michael-Addition mit Thiolen reagieren (z.B. Curcumin) und so Keap1 an dessen SH-Gruppen modifizieren [108]: $R-CH=CH-CHO + R'SH \rightarrow R-CHSR'-CH_2-CHO$. Isothiocyanate (z.B. SFN) formen mit SH-Gruppen reversibel ein Dithiocarbamat [200]: $R-N=C=S + R'SH \rightarrow R-NH-CSR'=S$. Keap1-Thiolgruppen können auch oxidativ modifiziert werden: $R-SH \rightarrow R-SOH$ (reversibel) $\rightarrow R-SO_2H$ und $R-SO_3H$ (irreversibel). Keap1 fungiert also als eine Art Sensor für oxidativen bzw. elektrophilen Stress. Als Folge der Thiolmodifikation wird seine Konformation geändert und Nrf2 freigesetzt.

Die meisten der bislang charakterisierten Nrf2-Zielgene codieren für Phase-II-Enzyme, die für die Eliminierung von Elektrophilen und auch von cancerogenen Metaboliten sorgen. Einige gehören zu den antioxidativen Enzymen, wie z.B. die γ -Glutamylcystein-Synthetase, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym für die Synthese von GSH [201]. Die HO-1, eines der am besten untersuchten Nrf2-Zielgene, katalysiert die Umsetzung von Häm zu Bilirubin, das ebenfalls als wichtiges zelluläres Antioxidanz gilt. Die hier als Nrf2-Zielgen herausgestellte GI-GPx kann aufgrund ihrer hydroperoxidreduzierenden Eigenschaften auch als zelluläres Antioxidanz angesehen werden, obwohl diese Eigenschaft als Erklärung für ihre Funktion nicht befriedigend ist. Eine vorübergehende Modifikation von SH-Gruppen resultiert also in der Expression von Enzymen, die der endogenen Abwehr dienen. Diese können dann längerfristig Zellen vor weiteren Schädigungen schützen. Fahey et al. bezeichnen Nrf2-aktivierende Substanzen als „indirekte Antioxidanzien“ [202]. Die PHGPx lässt sich aufgrund ihrer thiolmodifizierenden, Nrf2-aktivierenden und NF- κ B-hemmenden Eigenschaften auch in diese Gruppe der „indirekten Antioxidanzien“ einordnen. Andererseits verfügt sie, wie auch die GI-GPx, über die Möglichkeit, Hydroperoxide zu reduzieren, was der Wirkung eines direkten Antioxidanzes gleichkommt.

Vielen Nrf2-aktivierenden Substanzen, vor allem dem Isothiocyanat SFN, werden antiinflammatorische und anticancerogene Eigenschaften nachgesagt, jedoch wird nur selten auf ihre zunächst hohe Reaktivität gegenüber nukleophilen Reaktionspartnern verwiesen. Zhang et al. sprechen von Isothiocyanaten in Bezug auf die Modulation des zellulären Redoxstatus als „zweischneidige Schwerter“ [200]. Auf der einen Seite

induzieren Isothiocyanate nachweislich die Expression von vielen verschiedenen antioxidativen und anticancerogenen Enzymen auf transkriptionaler Ebene, andererseits verursachen sie durch eine rasche Depletion der zellulären Thiole auch einen transienten oxidativen Stress, welcher unter Umständen auch Zellschädigungen nach sich ziehen kann. Allerdings ist gerade dieser oxidative Stress Auslöser für die Induktion der chemopräventiven Signalkaskaden. Hieran wird deutlich, dass die jeweils verabreichte Dosis an elektrophilen Substanzen berücksichtigt werden muss. Bei Mengen, die den physiologischen Rahmen übersteigen, wird wahrscheinlich die akute Stresswirkung dominieren, so dass möglicherweise eine chemopräventive Wirkung nicht mehr gegeben ist.

Aufgrund ihrer Elektrophilie regulieren Nrf2-aktivierende Substanzen nicht nur das Nrf2/Keap1-System, sondern auch andere redoxensitive Transkriptionsfaktorsysteme. So wurde für SFN [203], tBHQ [204] und CUR [205] bereits eine Inhibierung der NF- κ B-Aktivität als Folge einer verminderten DNA-Bindfähigkeit beschrieben. Für Curcumin wurde zudem von einer Hemmung der Cytokin-induzierten VCAM-1-Expression berichtet [206, 207]. Mit SFN und tBHQ wurden derartige Untersuchungen noch nicht angestellt. Ob die verschiedenen redoxsensitiven Signalwege alle mit gleicher Effizienz moduliert werden, kann derzeit noch nicht beantwortet werden.

Die Bezeichnung „oxidativer Stress“ wird meist mit Zellschädigungen, DNA-Schäden, Mutationen und daraus resultierenden pathologischen Veränderungen in Verbindung gebracht. Mittlerweile weiß man aber, dass ROS (z.B. Hydroperoxide) durchaus auch wichtige Funktionen bei der Modulation redoxsensitiver Signalkaskaden erfüllen können (Übersicht in [208]). Erst wenn das Vorhandensein von ROS ein natürliches Maß überschreitet, kann mit Schädigungen gerechnet werden. Ein moderater oxidativer Stress erscheint somit, entgegen früheren Vermutungen, eher günstige Auswirkungen zu haben, da der Zelle durch Veränderungen im zellulären Thiolstatus signalisiert wird, dass sie cytoprotektive Mechanismen in Gang setzt und zur gleichen Zeit inflammatorische Signalkaskaden hemmt. Offenbar hat die Zelle sehr viele komplizierte Mechanismen entwickelt, um auf den jeweils vorherrschenden Redoxstatus mit dem entsprechenden Proteinexpressionsmuster reagieren zu können. Die einzelnen Zellkompartimente können hierbei unabhängig voneinander beeinflusst sein.

Die Transkriptionsfaktoren Nrf2 und NF- κ B können somit nur als zwei von vielen Stellgliedern der zellulären Antwort auf Veränderungen des Sauerstoffpartialdruckes angesehen werden. Zur besseren Übersicht wurde in Abb. 37 versucht, alle in dieser Arbeit neu gewonnenen Erkenntnisse zu einem Bild zusammenzufügen und dieses in bereits bekannte Prozesse einzuordnen.

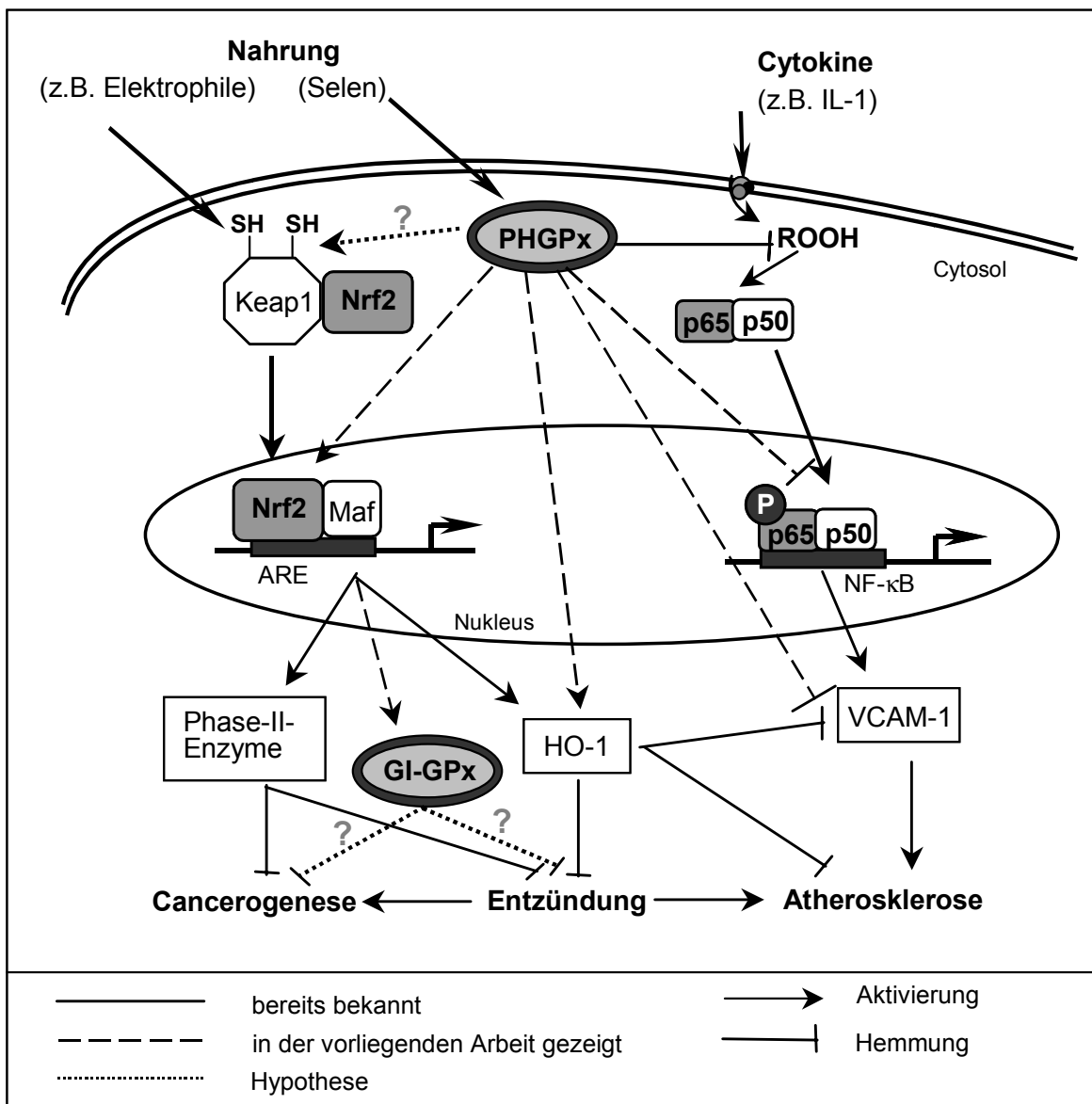


Abb. 37. Glutathionperoxidasen und redoxsensitive Transkriptionsfaktoren

In der vorliegenden Arbeit konnte die GI-GPx als ein Nrf2-Zielgen identifiziert werden, dessen Expression durch die thiolmodifizierenden Substanzen SFN, tBHQ und CUR erhöht wird. Somit wird die GI-GPx nach dem gleichen Mechanismus wie viele bekannte Phase-II-Enzyme induziert. Ob die GI-GPx, ebenso wie diese Phase-II-Enzyme, über antiinflammatorische und anticancerogene Eigenschaften verfügt bleibt zu untersuchen. Aufgrund der ebenfalls in dieser Arbeit gezeigten Modulation der Nrf2-Aktivität durch PHGPx, drängt sich die Frage auf, ob eine erhöhte PHGPx-Aktivität eine gesteigerte GI-GPx-Expression nach sich ziehen könnte. Es wurde noch nicht versucht, diese Fragestellung zu beantworten. Aufgrund des sehr speziellen Expressionsprofils der GI-GPx sind die hier verwendeten Zellmodelle zur Beantwortung dieser Frage nicht geeignet, da GI-GPx weder in SMC noch in ECV304 exprimiert wird. Dennoch legen die dargestellten Ergebnisse die Vermutung nahe, dass die Modifizierung von Proteinthiolen

einen Schlüssel zur Erklärung von Regulation und Funktion von Glutathionperoxidasen bildet.

4.4 Ausblick

Nach der Identifizierung der GI-GPx als Nrf2-Zielgen erscheint es vielversprechend, die Beeinflussung der GI-GPx-Expression durch verschiedene weitere elektrophile Substanzen zu untersuchen. Hierdurch würden zum einen detailliertere Einblicke in die Regulation der GI-GPx-Expression möglich, zum anderen könnten die Wirkmechanismen der jeweiligen Substanzen besser aufgeklärt werden.

Um die Relevanz einer Nrf2-vermittelten GI-GPx-Expression auch *in vivo* absichern zu können, wären tierexperimentelle Versuche nötig. In Nrf2-Knockout-Mäusen wurde bereits von einer deutlich verminderten GI-GPx-mRNA-Expression berichtet [112, 113], jedoch existieren bislang keine Untersuchungen hinsichtlich der GI-GPx-Proteinexpression in diesen Mäusen. Weiterhin wäre es wichtig, zu untersuchen, ob sich die GI-GPx auf Proteinebene sowohl im Tiermodell als auch im Menschen durch Verabreichung chemopräventiver Substanzen (z.B. SFN) induzieren lässt, und wenn ja, in welchen Organen und Zelltypen sich diese Induktion vollzieht. Hierbei müsste auch der Einfluss des Selenstatus und die hohe Stellung der GI-GPx innerhalb der Hierarchie der Selenoproteine berücksichtigt werden.

Die GI-GPx wird nur in bestimmten Organen und in Krebszellen exprimiert. Die Ursachen für diese spezifische Expression sind bislang nicht bekannt, würden aber enorm zum weiteren Verständnis der Funktionen der GI-GPx, insbesondere in der Entstehung und Prävention von Krebs, beitragen.

Über die Funktionen der GI-GPx in der Cancerogenese und während Entzündungen ist nichts bekannt. Es wäre zum einen interessant, zu untersuchen, wie sich die GI-GPx im Hinblick auf die zelluläre Apoptoserate verhält. Die antiapoptotischen Eigenschaften von cGPx und PHGPx suggerieren ein ebensolches Verhalten für die GI-GPx, jedoch existieren bislang dahingehend keinerlei experimentelle Daten. Zum anderen erscheint es von Bedeutung, die Wechselbeziehungen zwischen GI-GPx und COX-2 näher zu untersuchen. Der COX-2 werden nachweislich procancerogene Eigenschaften nachgesagt. Die von Florian et al. [184] in frühen Colonadenomen gemachten Beobachtungen einer gemeinsamen Hochregulation von GI-GPx und COX-2 deuten auf einen kausalen Zusammenhang dieser beiden Enzyme hin.

Der Verzehr von Cruciferen ist mit einem verminderten Krebsrisiko assoziiert, allerdings gibt es bislang keine *in vivo*-Untersuchungen zum Einfluss von Cruciferen (z.B. Broccoli) auf die Expression der GI-GPx.

Zur Beantwortung der Fragen hinsichtlich der Beteiligung der GI-GPx an der Apoptoseregulation sowie der Wechselbeziehungen mit COX-2 würden sich Zellen, die die GI-GPx stabil überexprimieren, eignen. Da man die enzymatische Aktivität der GI-GPx nicht separat messen kann und infolge einer Selensupplementation die Expression aller Selenoproteine verstärkt würde, scheint die Generierung eines GI-GPx-überexprimierenden Zellsystemes für diese Fragestellungen unumgänglich. Derzeit wird versucht, ein solches Zellmodell in CaCo-2-Zellen zu etablieren. Da es sich bei CaCo-2-Zellen um Colonicarcinomzellen handelt, in welchen GI-GPx natürlicherweise vorkommt, ist dieses Zellmodell zur Untersuchung der GI-GPx während der colorektalen Cancerogenese geeignet.

Weiterhin gilt es zu untersuchen, über welche Proteine die PHGPx Einfluss auf Signalkaskaden nehmen kann und was die dafür verantwortlichen Mechanismen sind. Hierbei wäre zu klären, ob die PHGPx die essentiellen Thiole (z.B. von p50 oder Keap1) durch Glutathionylierung oder gar durch Vernetzung von sich selbst mit diesen Thiolen modifiziert.

In dieser Arbeit wurde die Expression von jeweils nur einem Zielgen für NF- κ B bzw. Nrf2 untersucht. Um eine generelle Aussage über die Modulation der NF- κ B- bzw. der Nrf2-abhängigen Genexpression durch PHGPx treffen zu können, müssten noch weitere potentielle Zielgene analysiert werden. Ein zu untersuchender Kandidat wäre natürlich die GI-GPx. Aufgrund der fehlenden GI-GPx-Expression in SMC bzw. ECV304 konnte bislang keine diesbezügliche Aussage getroffen werden, jedoch könnten derartige Untersuchungen an PHGPx-überexprimierenden CaCo-2-Zellen durchgeführt werden. Eine solche Zelllinie wird derzeit ebenfalls parallel zu den GI-GPx-überexprimierenden CaCo-2-Zellen konstruiert.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das 1817 erstmals schriftlich erwähnte Selen galt lange Zeit nur als toxisch und sogar als procancerogen, bis es 1957 von Schwarz und Foltz als essentielles Spurenelement erkannt wurde, dessen biologische Funktionen in Säugern durch Selenoproteine vermittelt werden. Die Familie der Glutathionperoxidasen nimmt hierbei eine wichtige Stellung ein. Für diese sind konkrete Funktionen und die dazugehörigen molekularen Mechanismen, welche über die von ihnen katalysierte Hydroperoxidreduktion und damit verbundene antioxidative Kapazität hinausgehen, bislang nur unzureichend beschrieben worden.

Die Funktion der gastrointestinalen Glutathionperoxidase (GI-GPx) wird als Barriere gegen eine Hydroperoxidabsorption im Gastrointestinaltrakt definiert. Neuen Erkenntnissen zufolge wird die GI-GPx aber auch in verschiedenen Tumoren verstärkt exprimiert, was weitere, bis dato unbekannte, Funktionen dieses Enzymes wahrscheinlich macht.

Um mögliche neue Funktionen der GI-GPx, vor allem während der Cancerogenese, abzuleiten, wurde hier die transkriptionale Regulation der GI-GPx detaillierter untersucht. Die Sequenzanalyse des humanen GI-GPx-Promotors ergab das Vorhandensein von zwei möglichen „antioxidant response elements“ (ARE), bei welchen es sich um Erkennungssequenzen des Transkriptionsfaktors Nrf2 handelt. Die meisten der bekannten Nrf2-Zielgene gehören in die Gruppe der Phase-II-Enzyme und verfügen über antioxidative und/oder detoxifizierende Eigenschaften. Sowohl auf Promotorebene als auch auf mRNA- und Proteinebene konnte die Expression der GI-GPx durch typische, in der Nahrung enthaltene, Nrf2-Aktivatoren wie z.B. Sulforaphan oder Curcumin induziert werden. Eine direkte Beteiligung von Nrf2 wurde durch Cotransfektion von Nrf2 selbst bzw. von Keap1, das Nrf2 im Cytoplasma festhält, demonstriert. Somit konnte die GI-GPx eindeutig als Nrf2-Zielgen identifiziert werden. Ob sich die GI-GPx in die Gruppe der antiinflammatorischen und anticancerogenen Phase-II-Enzyme einordnen lässt, bleibt noch zu untersuchen.

Die Phospholipidhydroperoxid Glutathionperoxidase (PHGPx) nimmt aufgrund ihres breiten Substratspektrums, ihrer hohen Lipophilie und ihrer Fähigkeit, Thiole zu modifizieren, eine Sonderstellung innerhalb der Familie der Glutathionperoxidasen ein. Sie inhibiert die Aktivierung von NF- κ B und die Apoptose. Sie erhält dadurch anti-inflammatorische Eigenschaften, die sowohl für eine postulierte anti-atherogene als auch anti-cancerogene Funktion relevant sein könnten. Mit Hilfe eines PHGPx-überexprimierenden Zellmodells wurden deshalb Beeinflussungen des zellulären Redoxstatus und daraus resultierende Veränderungen in der Aktivität redoxsensitiver Transkriptionsfaktorsysteme und in der Expression atheroskleroserelevanter Adhäsionsmoleküle untersucht. Als Transkriptions-

faktoren wurden NF- κ B und Nrf2 ausgewählt. Die Bindung von NF- κ B an sein entsprechendes responsives Element in der DNA erfordert das Vorhandensein freier Thiole, wohingegen Nrf2 durch Thiolmodifikation von Keap1 freigesetzt wird und in den Kern transloziert. Eine erhöhte Aktivität der PHGPx resultierte in einer Erhöhung des Verhältnisses von GSH zu GSSG, andererseits aber in einer verminderten Markierbarkeit freier Proteinthiole. PHGPx-Überexpression reduzierte die IL-1-induzierte NF- κ B-Aktivität, die sich in einer verminderten NF- κ B-DNA-Bindfähigkeit und Transaktivierungsaktivität ausdrückte. Auch war die Proliferationsrate der Zellen vermindert. Die Expression des NF- κ B-regulierten vaskulären Zelladhäsionsmoleküls, VCAM-1, war ebenfalls deutlich verringert. Umgekehrt war in PHGPx-überexprimierenden Zellen eine erhöhte Nrf2-Aktivität und Expression der Nrf2-abhängigen Hämoxxygenase-1 zu verzeichnen. Letzte kann für die meisten der beobachteten Effekte verantwortlich gemacht werden.

Die hier dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Modifizierung von Proteinthiolen als wichtige Determinante für die Regulation der Expression und Funktion von Glutathionperoxidasen angesehen werden kann. Entgegen früheren Vermutungen, welche oxidative Vorgänge generell mit pathologischen Veränderungen assoziierten, scheint ein moderater oxidativer Stress, bedingt durch eine transiente Thiolmodifikation, durchaus günstige Auswirkungen zu haben, da, wie hier dargelegt, verschiedene, miteinander interagierende, cytoprotektive Mechanismen ausgelöst werden. Hieran wird deutlich, dass sich „antioxidative Wirkung“ oder „oxidativer Stress“ keineswegs nur auf „gute“ oder „schlechte“ Vorgänge beschränken lassen, sondern im Zusammenhang mit den beeinflussten (patho)physiologischen Prozessen und dem Ausmaß der „Störung“ des physiologischen Redoxgleichgewichtes betrachtet werden müssen.

6 LITERATUR

- [1] K. Schwarz and C. Foltz (1957). Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration, *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3292-3293.
- [2] J. R. Andreesen and L. G. Ljungdahl (1973). Formate dehydrogenase of *Clostridium thermoaceticum*: incorporation of selenium-75, and the effects of selenite, molybdate, and tungstate on the enzyme, *J. Bacteriol.* 116, 867-873.
- [3] L. Flohé, W. A. Gunzler and H. H. Schock (1973). Glutathione peroxidase: a selenoenzyme, *FEBS Lett.* 32, 132-134.
- [4] J. T. Rotruck, A. L. Pope, H. E. Ganther, A. B. Swanson, D. G. Hafeman and W. G. Hoekstra (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase, *Science* 179, 588-590.
- [5] R. F. Burk and K. E. Hill (1999). Orphan selenoproteins, *Bioessays* 21, 231-237.
- [6] T. C. Stadtman (1990). Selenium biochemistry, *Annu. Rev. Biochem.* 59, 111-127.
- [7] D. M. Driscoll and P. R. Copeland (2003). Mechanism and regulation of selenoprotein synthesis, *Annu. Rev. Nutr.* 23, 17-40.
- [8] G. V. Kryukov, S. Castellano, S. V. Novoselov, A. V. Lobanov, O. Zehtab, R. Guigo and V. N. Gladyshev (2003). Characterization of mammalian selenoproteomes, *Science* 300, 1439-1443.
- [9] M. Birringer, S. Pilawa and L. Flohé (2002). Trends in selenium biochemistry, *Nat. Prod. Rep.* 19, 693-718.
- [10] V. N. Gladyshev and D. L. Hatfield (1999). Selenocysteine-containing proteins in mammals, *J. Biomed. Sci.* 6, 151-160.
- [11] D. Behne, C. Weiss-Nowak, M. Kalcklosch, C. Westphal, H. Gessner and A. Kyriakopoulos (1995). Studies on the distribution and characteristics of new mammalian selenium-containing proteins, *Analyst* 120, 823-825.
- [12] F. F. Chu, J. H. Doroshov and R. S. Esworthy (1993). Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI, *J. Biol. Chem.* 268, 2571-2576.
- [13] K. Wingler, M. Böcher, L. Flohé, H. Kollmus and R. Brigelius-Flohé (1999). mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins, *Eur. J. Biochem.* 259, 149-157.
- [14] K. Takahashi, N. Avissar, J. Whitin and H. Cohen (1987). Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme, *Arch. Biochem. Biophys.* 256, 677-686.
- [15] Y. Yamamoto and K. Takahashi (1993). Glutathione peroxidase isolated from plasma reduces phospholipid hydroperoxides, *Arch. Biochem. Biophys.* 305, 541-545.

- [16] F. Ursini, M. Maiorino and C. Gregolin (1985). The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, *Biochim. Biophys. Acta* 839, 62-70.
- [17] R. Brigelius-Flohé, K. D. Aumann, H. Blocker, G. Gross, M. Kiess, K. D. Kloppel, M. Maiorino, A. Roveri, R. Schuckelt, F. Ursini, et al. (1994). Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence, *J. Biol. Chem.* 269, 7342-7348.
- [18] H. Pfeifer, M. Conrad, D. Roethlein, A. Kyriakopoulos, M. Brielmeier, G. W. Bornkamm and D. Behne (2001). Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation, *FASEB J.* 15, 1236-1238.
- [19] T. Tamura and T. C. Stadtman (1996). A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93, 1006-1011.
- [20] S. Watabe, Y. Makino, K. Ogawa, T. Hiroi, Y. Yamamoto and S. Y. Takahashi (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.
- [21] S. R. Lee, J. R. Kim, K. S. Kwon, H. W. Yoon, R. L. Levine, A. Ginsburg and S. G. Rhee (1999). Molecular cloning and characterization of a mitochondrial selenocysteine-containing thioredoxin reductase from rat liver, *J. Biol. Chem.* 274, 4722-4734.
- [22] A. Miranda-Vizuete, A. E. Damdimopoulos, J. R. Pedrajas, J. A. Gustafsson and G. Spyrou (1999). Human mitochondrial thioredoxin reductase cDNA cloning, expression and genomic organization, *Eur. J. Biochem.* 261, 405-412.
- [23] Q. A. Sun, Y. Wu, F. Zappacosta, K. T. Jeang, B. J. Lee, D. L. Hatfield and V. N. Gladyshev (1999). Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases, *J. Biol. Chem.* 274, 24522-24530.
- [24] A. Lescure, D. Gautheret, P. Carbon and A. Krol (1999). Novel selenoproteins identified in silico and in vivo by using a conserved RNA structural motif, *J. Biol. Chem.* 274, 38147-38154.
- [25] D. Behne, A. Kyriakopoulos, H. Meinhold and J. Köhrle (1990). Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 1143-1149.
- [26] J. C. Davey, K. B. Becker, M. J. Schneider, D. L. St Germain and V. A. Galton (1995). Cloning of a cDNA for the type II iodothyronine deiodinase, *J. Biol. Chem.* 270, 26786-26789.
- [27] W. Croteau, S. L. Whittemore, M. J. Schneider and D. L. St Germain (1995). Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase, *J. Biol. Chem.* 270, 16569-16575.
- [28] M. J. Guimaraes, D. Peterson, A. Vicari, B. G. Cocks, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, D. A. Ferrick, R. A. Kastelein, J. F. Bazan and A. Zlotnik (1996). Identification of a novel selD homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism?, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93, 15086-15091.

- [29] V. Mostert (2000). Selenoprotein P: properties, functions, and regulation, *Arch. Biochem. Biophys.* 376, 433-438.
- [30] L. Schomburg, U. Schweizer, B. Holtmann, L. Flohé, M. Sendtner and J. Köhrle (2003). Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues, *Biochem. J.* 370, 397-402.
- [31] S. C. Vendeland, M. A. Beilstein, C. L. Chen, O. N. Jensen, E. Barofsky and P. D. Whanger (1993). Purification and properties of selenoprotein W from rat muscle, *J. Biol. Chem.* 268, 17103-17107.
- [32] G. V. Kryukov, V. M. Kryukov and V. N. Gladyshev (1999). New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements, *J. Biol. Chem.* 274, 33888-33897.
- [33] G. V. Kryukov, R. A. Kumar, A. Koc, Z. Sun and V. N. Gladyshev (2002). Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99, 4245-4250.
- [34] N. Petit, A. Lescure, M. Rederstorff, A. Krol, B. Moghadaszadeh, U. M. Wewer and P. Guicheney (2003). Selenoprotein N: an endoplasmic reticulum glycoprotein with an early developmental expression pattern, *Hum. Mol. Genet.* 12, 1045-1053.
- [35] V. N. Gladyshev, K. T. Jeang, J. C. Wootton and D. L. Hatfield (1998). A new human selenium-containing protein. Purification, characterization, and cDNA sequence, *J. Biol. Chem.* 273, 8910-8915.
- [36] Y. J. Hu, K. V. Korotkov, R. Mehta, D. L. Hatfield, C. N. Rotimi, A. Luke, T. E. Prewitt, R. S. Cooper, W. Stock, E. E. Vokes, et al. (2001). Distribution and functional consequences of nucleotide polymorphisms in the 3'-untranslated region of the human Sep15 gene, *Cancer Res.* 61, 2307-2310.
- [37] H. K. Karlsson, H. Tsuchida, S. Lake, H. A. Koistinen and A. Krook (2004). Relationship between serum amyloid A level and Tanis/SelS mRNA expression in skeletal muscle and adipose tissue from healthy and type 2 diabetic subjects, *Diabetes* 53, 1424-1428.
- [38] I. Chambers, J. Frampton, P. Goldfarb, N. Affara, W. McBain and P. R. Harrison (1986). The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA, *EMBO J.* 5, 1221-1227.
- [39] D. L. Hatfield and V. N. Gladyshev (2002). How selenium has altered our understanding of the genetic code, *Mol. Cell Biol.* 22, 3565-3576.
- [40] A. Böck, K. Forchhammer, J. Heider, W. Leinfelder, G. Sawers, B. Veprek and F. Zinoni (1991). Selenocysteine: the 21st amino acid, *Mol. Microbiol.* 5, 515-520.
- [41] S. C. Low and M. J. Berry (1996). Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes, *Trends Biochem. Sci.* 21, 203-208.
- [42] P. R. Copeland and D. M. Driscoll (1999). Purification, redox sensitivity, and RNA binding properties of SECIS-binding protein 2, a protein involved in selenoprotein biosynthesis, *J. Biol. Chem.* 274, 25447-25454.

- [43] D. Fagegaltier, N. Hubert, K. Yamada, T. Mizutani, P. Carbon and A. Krol (2000). Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation, *EMBO J.* 19, 4796-4805.
- [44] R. M. Tujebajeva, P. R. Copeland, X. M. Xu, B. A. Carlson, J. W. Harney, D. M. Driscoll, D. L. Hatfield and M. J. Berry (2000). Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion, *EMBO Rep.* 1, 158-163.
- [45] P. R. Copeland, V. A. Stepanik and D. M. Driscoll (2001). Insight into mammalian selenocysteine insertion: domain structure and ribosome binding properties of Sec insertion sequence binding protein 2, *Mol. Cell. Biol.* 21, 1491-1498.
- [46] R. Brigelius-Flohé, M. Maiorino, F. Ursini and L. Flohé (2001). Selenium: An Antioxidant? In: Handbook of Antioxidants, 2nd edition, E. Cadenas and L. Packer, eds. (New York, Basel, Marcel Dekker), pp. 633-664.
- [47] R. Brigelius-Flohé (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases, *Free Radic. Biol. Med.* 27, 951-965.
- [48] G. Bermano, J. R. Arthur and J. E. Hesketh (1996). Role of the 3' untranslated region in the regulation of cytosolic glutathione peroxidase and phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase gene expression by selenium supply, *Biochem. J.* 320 (Pt 3), 891-895.
- [49] C. Müller, K. Wingler and R. Brigelius-Flohé (2003). 3'UTRs of glutathione peroxidases differentially affect selenium-dependent mRNA stability and selenocysteine incorporation efficiency, *Biol. Chem.* 384, 11-18.
- [50] K. Wingler, C. Müller and R. Brigelius-Flohé (2001). Stability of gastrointestinal glutathione peroxidase mRNA in selenium deficiency depends on its 3'UTR, *Biofactors* 14, 43-50.
- [51] S. C. Low, E. Grundner-Culemann, J. W. Harney and M. J. Berry (2000). SECIS-SBP2 interactions dictate selenocysteine incorporation efficiency and selenoprotein hierarchy, *EMBO J.* 19, 6882-6890.
- [52] J. Köhrle, R. Brigelius-Flohé, A. Böck, R. Gärtner, O. Meyer and L. Flohé (2000). Selenium in biology: facts and medical perspectives, *Biol. Chem.* 381, 849-864.
- [53] M. Maiorino, K. D. Aumann, R. Brigelius-Flohé, D. Doria, J. van den Heuvel, J. McCarthy, A. Roveri, F. Ursini and L. Flohé (1995). Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx), *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 376, 651-660.
- [54] R. Brigelius-Flohé, A. Banning and K. Schnurr (2003). Selenium-dependent enzymes in endothelial cell function, *Antioxid. Redox Signal.* 5, 205-215.
- [55] F. F. Chu and R. S. Esworthy (1995). The expression of an intestinal form of glutathione peroxidase (GSHPx-GI) in rat intestinal epithelium, *Arch. Biochem. Biophys.* 323, 288-294.
- [56] K. Wingler, C. Müller, K. Schmehl, S. Florian and R. Brigelius-Flohé (2000). Gastrointestinal glutathione peroxidase prevents transport of lipid hydroperoxides in CaCo-2 cells, *Gastroenterology* 119, 420-430.

- [57] S. Florian, K. Wingler, K. Schmehl, G. Jacobasch, O. J. Kreuzer, W. Meyerhof and R. Brigelius-Flohé (2001). Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue, *Free Radic. Res.* 35, 655-663.
- [58] Y. M. Lin, Y. Furukawa, T. Tsunoda, C. T. Yue, K. C. Yang and Y. Nakamura (2002). Molecular diagnosis of colorectal tumors by expression profiles of 50 genes expressed differentially in adenomas and carcinomas, *Oncogene* 21, 4120-4128.
- [59] H. Mörk, O. H. Al-Taie, K. Bahr, A. Zierer, C. Beck, M. Scheurlen, F. Jakob and J. Köhrle (2000). Inverse mRNA expression of the selenocysteine-containing proteins GI-GPx and SeP in colorectal adenomas compared with adjacent normal mucosa, *Nutr. Cancer* 37, 108-116.
- [60] H. Mörk, M. Scheurlen, O. Al-Taie, A. Zierer, M. Kraus, K. Schottker, F. Jakob and J. Köhrle (2003). Glutathione peroxidase isoforms as part of the local antioxidative defense system in normal and Barrett's esophagus, *Int. J. Cancer* 105, 300-304.
- [61] M. M. Serewko, C. Popa, A. L. Dahler, L. Smith, G. M. Strutton, W. Coman, A. J. Dicker and N. A. Saunders (2002). Alterations in gene expression and activity during squamous cell carcinoma development, *Cancer Res.* 62, 3759-3765.
- [62] F. F. Chu, R. S. Esworthy and J. H. Doroshov (2004). Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer, *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1481-1495.
- [63] R. S. Esworthy, J. R. Mann, M. Sam and F. F. Chu (2000). Low glutathione peroxidase activity in Gpx1 knockout mice protects jejunum crypts from gamma-irradiation damage, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G426-436.
- [64] R. S. Esworthy, R. Aranda, M. G. Martin, J. H. Doroshov, S. W. Binder and F. F. Chu (2001). Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 281, G848-855.
- [65] F. F. Chu, R. S. Esworthy, P. G. Chu, J. A. Longmate, M. M. Huycke, S. Wilczynski and J. H. Doroshov (2004). Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes, *Cancer Res.* 64, 962-968.
- [66] F. Ursini, M. Maiorino, M. Valente, L. Ferri and C. Gregolin (1982). Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides, *Biochim. Biophys. Acta* 710, 197-211.
- [67] T. R. Pushpa-Rekha, A. L. Burdsall, L. M. Oleksa, G. M. Chisolm and D. M. Driscoll (1995). Rat phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. cDNA cloning and identification of multiple transcription and translation start sites, *J. Biol. Chem.* 270, 26993-26999.
- [68] F. Ursini, S. Heim, M. Kiess, M. Maiorino, A. Roveri, J. Wissing and L. Flohé (1999). Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation, *Science* 285, 1393-1396.
- [69] A. S. Wu, J. E. Oldfield, L. R. Shull and P. R. Cheeke (1979). Specific effect of selenium deficiency on rat sperm, *Biol. Reprod.* 20, 793-798.

- [70] D. Behne, H. Weiler and A. Kyriakopoulos (1996). Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats, *J. Reprod. Fertil.* 106, 291-297.
- [71] R. Brigelius-Flohé and L. Flohé (2003). Is there a role of glutathione peroxidases in signaling and differentiation?, *Biofactors* 17, 93-102.
- [72] K. Schnurr, J. Belkner, F. Ursini, T. Schewe and H. Kühn (1996). The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase controls the activity of the 15-lipoxygenase with complex substrates and preserves the specificity of the oxygenation products, *J. Biol. Chem.* 271, 4653-4658.
- [73] H. S. Huang, C. J. Chen, H. Suzuki, S. Yamamoto and W. C. Chang (1999). Inhibitory effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase on the activity of lipoxygenases and cyclooxygenases, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 58, 65-75.
- [74] H. Sakamoto, H. Imai and Y. Nakagawa (2000). Involvement of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the modulation of prostaglandin D2 synthesis, *J. Biol. Chem.* 275, 40028-40035.
- [75] C. J. Chen, H. S. Huang and W. C. Chang (2002). Inhibition of arachidonate metabolism in human epidermoid carcinoma a431 cells overexpressing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, *J. Biomed. Sci.* 9, 453-459.
- [76] K. Nomura, H. Imai, T. Koumura, M. Arai and Y. Nakagawa (1999). Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway, *J. Biol. Chem.* 274, 29294-29302.
- [77] Y. Nakagawa (2004). Role of mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) as a antiapoptotic factor, *Biol. Pharm. Bull.* 27, 956-960.
- [78] H. Imai, F. Hirao, T. Sakamoto, K. Sekine, Y. Mizukura, M. Saito, T. Kitamoto, M. Hayasaka, K. Hanaoka and Y. Nakagawa (2003). Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 278-286.
- [79] L. J. Yant, Q. Ran, L. Rao, H. Van Remmen, T. Shibatani, J. G. Belter, L. Motta, A. Richardson and T. A. Prolla (2003). The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults, *Free Radic. Biol. Med.* 34, 496-502.
- [80] C. Kretz-Remy, P. Mehlen, M. E. Mirault and A. P. Arrigo (1996). Inhibition of I kappa B-alpha phosphorylation and degradation and subsequent NF-kappa B activation by glutathione peroxidase overexpression, *J. Cell Biol.* 133, 1083-1093.
- [81] R. Brigelius-Flohé, B. Friedrichs, S. Maurer, M. Schultz and R. Streicher (1997). Interleukin-1-induced nuclear factor kappa B activation is inhibited by overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in a human endothelial cell line, *Biochem. J.* 328, 199-203.
- [82] R. Brigelius-Flohé, S. Maurer, K. Lötzer, G. Böhl, H. Kallionpaa, P. Lehtolainen, H. Viita and S. Ylä-Herttuala (2000). Overexpression of PHGPx inhibits hydroperoxide-induced oxidation, NFkappaB activation and apoptosis and affects oxLDL-mediated proliferation of rabbit aortic smooth muscle cells, *Atherosclerosis* 152, 307-316.

- [83] U. Siebenlist, G. Franzoso and K. Brown (1994). Structure, regulation and function of NF-kappa B, *Annu. Rev. Cell Biol.* 10, 405-455.
- [84] S. Ghosh and M. Karin (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle, *Cell* 109 Suppl, S81-96.
- [85] T. Hayashi, Y. Ueno and T. Okamoto (1993). Oxidoreductive regulation of nuclear factor kappa B. Involvement of a cellular reducing catalyst thioredoxin, *J. Biol. Chem.* 268, 11380-11388.
- [86] E. Pineda-Molina, P. Klatt, J. Vazquez, A. Marina, M. Garcia de Lacoba, D. Perez-Sala and S. Lamas (2001). Glutathionylation of the p50 subunit of NF-kappaB: a mechanism for redox-induced inhibition of DNA binding, *Biochemistry* 40, 14134-14142.
- [87] M. B. Toledano and W. J. Leonard (1991). Modulation of transcription factor NF-kappa B binding activity by oxidation-reduction in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 88, 4328-4332.
- [88] L. Flohé, R. Brigelius-Flohé, C. Saliou, M. G. Traber and L. Packer (1997). Redox regulation of NF-kappa B activation, *Free Radic. Biol. Med.* 22, 1115-1126.
- [89] M. L. Schmitz, S. Bacher and M. Kracht (2001). I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations, *Trends Biochem. Sci.* 26, 186-190.
- [90] L. Vermeulen, G. De Wilde, S. Notebaert, W. Vanden Berghe and G. Haegeman (2002). Regulation of the transcriptional activity of the nuclear factor-kappaB p65 subunit, *Biochem. Pharmacol.* 64, 963-970.
- [91] L. Vermeulen, G. De Wilde, P. Van Damme, W. Vanden Berghe and G. Haegeman (2003). Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1), *EMBO J.* 22, 1313-1324.
- [92] D. Wang and A. S. Baldwin, Jr. (1998). Activation of nuclear factor-kappaB-dependent transcription by tumor necrosis factor-alpha is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529, *J. Biol. Chem.* 273, 29411-29416.
- [93] H. Sakurai, H. Chiba, H. Miyoshi, T. Sugita and W. Toriumi (1999). IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain, *J. Biol. Chem.* 274, 30353-30356.
- [94] L. F. Chen and W. C. Greene (2003). Regulation of distinct biological activities of the NF-kappaB transcription factor complex by acetylation, *J. Mol. Med.* 81, 549-557.
- [95] L. F. Chen, Y. Mu and W. C. Greene (2002). Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB, *EMBO J.* 21, 6539-6548.
- [96] J. D. Hayes and M. McMahon (2001). Molecular basis for the contribution of the antioxidant responsive element to cancer chemoprevention, *Cancer Lett.* 174, 103-113.

- [97] T. Nguyen, P. J. Sherratt and C. B. Pickett (2003). Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 233-260.
- [98] T. H. Rushmore, M. R. Morton and C. B. Pickett (1991). The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity, *J. Biol. Chem.* 266, 11632-11639.
- [99] W. W. Wasserman and W. E. Fahl (1997). Functional antioxidant responsive elements, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94, 5361-5366.
- [100] K. Itoh, T. Chiba, S. Takahashi, T. Ishii, K. Igarashi, Y. Katoh, T. Oyake, N. Hayashi, K. Satoh, I. Hatayama, et al. (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 313-322.
- [101] M. Ramos-Gomez, M. K. Kwak, P. M. Dolan, K. Itoh, M. Yamamoto, P. Talalay and T. W. Kensler (2001). Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98, 3410-3415.
- [102] K. Itoh, T. Ishii, N. Wakabayashi and M. Yamamoto (1999). Regulatory mechanisms of cellular response to oxidative stress, *Free Radic. Res.* 31, 319-324.
- [103] D. D. Zhang and M. Hannink (2003). Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress, *Mol. Cell Biol.* 23, 8137-8151.
- [104] M. McMahon, K. Itoh, M. Yamamoto and J. D. Hayes (2003). Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression, *J. Biol. Chem.* 278, 21592-21600.
- [105] M. I. Kang, A. Kobayashi, N. Wakabayashi, S. G. Kim and M. Yamamoto (2004). Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101, 2046-2051.
- [106] G. Wakabayashi, K. Itoh, J. Wakabayashi, H. Motohashi, S. Noda, S. Takahashi, S. Imakado, T. Kotsuji, F. Otsuka, D. R. Roop, et al. (2003). Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation, *Nat. Genet.* 35, 238-245.
- [107] N. Wakabayashi, A. T. Dinkova-Kostova, W. D. Holtzclaw, M. I. Kang, A. Kobayashi, M. Yamamoto, T. W. Kensler and P. Talalay (2004). Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101, 2040-2045.
- [108] A. T. Dinkova-Kostova, M. A. Massiah, R. E. Bozak, R. J. Hicks and P. Talalay (2001). Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98, 3404-3409.

- [109] M. K. Kwak, N. Wakabayashi and T. W. Kensler (2004). Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers, *Mutat. Res.* 555, 133-148.
- [110] A. T. Dinkova-Kostova, W. D. Holtzclaw, R. N. Cole, K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, M. Yamamoto and P. Talalay (2002). Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99, 11908-11913.
- [111] R. K. Thimmulappa, K. H. Mai, S. Srisuma, T. W. Kensler, M. Yamamoto and S. Biswal (2002). Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray, *Cancer Res.* 62, 5196-5203.
- [112] H. Y. Cho, A. E. Jedlicka, S. P. Reddy, T. W. Kensler, M. Yamamoto, L. Y. Zhang and S. R. Kleeberger (2002). Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26, 175-182.
- [113] H. Y. Cho, S. P. Reddy, M. Yamamoto and S. R. Kleeberger (2004). The transcription factor NRF2 protects against pulmonary fibrosis, *FASEB J.* 18, 1258-1260.
- [114] A. J. Lusis (2000). Atherosclerosis, *Nature* 407, 233-241.
- [115] R. Ross (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s, *Nature* 362, 801-809.
- [116] M. Braun, P. Pietsch, K. Schror, G. Baumann and S. B. Felix (1999). Cellular adhesion molecules on vascular smooth muscle cells, *Cardiovasc. Res.* 41, 395-401.
- [117] M. I. Cybulsky, K. Iiyama, H. Li, S. Zhu, M. Chen, M. Iiyama, V. Davis, J. C. Gutierrez-Ramos, P. W. Connelly and D. S. Milstone (2001). A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis, *J. Clin. Invest.* 107, 1255-1262.
- [118] L. Osborn, C. Hession, R. Tizard, C. Vassallo, S. Luhowskyj, G. Chi-Rosso and R. Lobb (1989). Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes, *Cell* 59, 1203-1211.
- [119] M. I. Cybulsky, J. W. Fries, A. J. Williams, P. Sultan, R. Eddy, M. Byers, T. Shows, M. A. Gimbrone, Jr. and T. Collins (1991). Gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing of the human VCAM1 gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 88, 7859-7863.
- [120] M. I. Cybulsky, M. Allan-Motamed and T. Collins (1993). Structure of the murine VCAM1 gene, *Genomics* 18, 387-391.
- [121] C. Hession, R. Tizard, C. Vassallo, S. B. Schiffer, D. Goff, P. Moy, G. Chi-Rosso, S. Luhowskyj, R. Lobb and L. Osborn (1991). Cloning of an alternate form of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1), *J. Biol. Chem.* 266, 6682-6685.
- [122] N. Marui, M. K. Offermann, R. Swerlick, C. Kunsch, C. A. Rosen, M. Ahmad, R. W. Alexander and R. M. Medford (1993). Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells, *J. Clin. Invest.* 92, 1866-1874.

- [123] F. Zhang, W. Yu, J. L. Hargrove, P. Greenspan, R. G. Dean, E. W. Taylor and D. K. Hartle (2002). Inhibition of TNF-alpha induced ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression by selenium, *Atherosclerosis* 161, 381-386.
- [124] M. Braun, P. Pietsch, A. Zepp, K. Schror, G. Baumann and S. B. Felix (1997). Regulation of tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1-beta- induced induced adhesion molecule expression in human vascular smooth muscle cells by cAMP, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 2568-2575.
- [125] T. Couffinhal, C. Duplaa, C. Moreau, J. M. Lamaziere and J. Bonnet (1994). Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 in human vascular smooth muscle cells, *Circ. Res.* 74, 225-234.
- [126] S. A. Thorne, S. E. Abbot, C. R. Stevens, P. G. Winyard, P. G. Mills and D. R. Blake (1996). Modified low density lipoprotein and cytokines mediate monocyte adhesion to smooth muscle cells, *Atherosclerosis* 127, 167-176.
- [127] X. Wang, G. Z. Feuerstein, J. L. Gu, P. G. Lysko and T. L. Yue (1995). Interleukin-1 beta induces expression of adhesion molecules in human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle cells, *Atherosclerosis* 115, 89-98.
- [128] M. F. Iademarco, J. J. McQuillan, G. D. Rosen and D. C. Dean (1992). Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), *J. Biol. Chem.* 267, 16323-16329.
- [129] C. C. Chen and A. M. Manning (1995). Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: a dominant role for NF-kappa B, *Agents Actions Suppl.* 47, 135-141.
- [130] M. P. Rayman (2000). The importance of selenium to human health, *Lancet* 356, 233-241.
- [131] J. T. Salonen, G. Alfthan, J. K. Huttunen, J. Pikkarainen and P. Puska (1982). Association between cardiovascular death and myocardial infarction and serum selenium in a matched-pair longitudinal study, *Lancet* 2, 175-179.
- [132] J. Virtamo, E. Valkeila, G. Alfthan, S. Punsar, J. K. Huttunen and M. J. Karvonen (1985). Serum selenium and the risk of coronary heart disease and stroke, *Am. J. Epidemiol.* 122, 276-282.
- [133] J. F. Maddox, K. M. Aherne, C. C. Reddy and L. M. Sordillo (1999). Increased neutrophil adherence and adhesion molecule mRNA expression in endothelial cells during selenium deficiency, *J. Leukoc. Biol.* 65, 658-664.
- [134] P. d'Alessio, M. Moutet, E. Coudrier, S. Darquenne and J. Chaudiere (1998). ICAM-1 and VCAM-1 expression induced by TNF-alpha are inhibited by a glutathione peroxidase mimic, *Free Radic. Biol. Med.* 24, 979-987.
- [135] P. D. Whanger (2004). Selenium and its relationship to cancer: an update dagger, *Br. J. Nutr.* 91, 11-28.
- [136] G. N. Schrauzer, D. A. White and C. J. Schneider (1977). Cancer mortality correlation studies--III: statistical associations with dietary selenium intakes, *Bioinorg. Chem.* 7, 23-31.

- [137] F. J. Kok, A. M. de Bruijn, A. Hofman, R. Vermeeren and H. A. Valkenburg (1987). Is serum selenium a risk factor for cancer in men only?, *Am. J. Epidemiol.* 125, 12-16.
- [138] K. Yoshizawa, W. C. Willett, S. J. Morris, M. J. Stampfer, D. Spiegelman, E. B. Rimm and E. Giovannucci (1998). Study of prediagnostic selenium level in toenails and the risk of advanced prostate cancer, *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 1219-1224.
- [139] L. C. Clark, G. F. Combs, Jr., B. W. Turnbull, E. H. Slate, D. K. Chalker, J. Chow, L. S. Davis, R. A. Glover, G. F. Graham, E. G. Gross, et al. (1996). Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group, *JAMA* 276, 1957-1963.
- [140] G. Bjelakovic, D. Nikolova, R. G. Simonetti and C. Gluud (2004). Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis, *Lancet* 364, 1219-1228.
- [141] C. Ip (1998). Lessons from basic research in selenium and cancer prevention, *J. Nutr.* 128, 1845-1854.
- [142] K. Pietila, S. Ylä-Herttua, O. Jaakkola and T. Nikkari (1980). Metabolism of glycosaminoglycans and lipids in smooth muscle cells from atherosclerotic rabbit aortas in culture, *Atherosclerosis* 37, 449-456.
- [143] K. Takahashi, Y. Sawasaki, J. Hata, K. Mukai and T. Goto (1990). Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells, *In Vitro Cell Dev. Biol.* 26, 265-274.
- [144] J. Winer, C. K. Jung, I. Shackel and P. M. Williams (1999). Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro, *Anal. Biochem.* 270, 41-49.
- [145] P. D. Siebert, A. Chenchik, D. E. Kellogg, K. A. Lukyanov and S. A. Lukyanov (1995). An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA, *Nucleic Acids Res.* 23, 1087-1088.
- [146] S. N. Ho, H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen and L. R. Pease (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction, *Gene* 77, 51-59.
- [147] K. Quandt, K. Frech, H. Karas, E. Wingender and T. Werner (1995). MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data, *Nucleic Acids Res.* 23, 4878-4884.
- [148] S. A. Kliewer, K. Umesono, D. J. Noonan, R. A. Heyman and R. M. Evans (1992). Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors, *Nature* 358, 771-774.
- [149] M. I. Cybulsky and M. A. Gimbrone, Jr. (1991). Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis, *Science* 251, 788-791.

- [150] M. M. Bradford (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- [151] M. Böcher, T. Boldicke, M. Kiess and U. Bilitewski (1997). Synthesis of mono- and bifunctional peptide-dextran conjugates for the immobilization of peptide antigens on ELISA plates: properties and application, *J. Immunol. Methods* 208, 191-202.
- [152] R. Brigelius-Flohé, K. Lötzer, S. Maurer, M. Schultz and M. Leist (1995). Utilization of selenium from different chemical entities for selenoprotein biosynthesis by mammalian cell lines, *Biofactors* 5, 125-131.
- [153] T. P. Akerboom and H. Sies (1981). Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples, *Methods Enzymol.* 77, 373-382.
- [154] R. Brigelius, C. Muckel, T. P. Akerboom and H. Sies (1983). Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide, *Biochem. Pharmacol.* 32, 2529-2534.
- [155] J. Alam and J. L. Cook (2003). Transcriptional regulation of the heme oxygenase-1 gene via the stress response element pathway, *Curr. Pharm. Des.* 9, 2499-2511.
- [156] K. W. Kang, S. J. Lee, J. W. Park and S. G. Kim (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress, *Mol. Pharmacol.* 62, 1001-1010.
- [157] K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J. D. Engel and M. Yamamoto (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain, *Genes Dev.* 13, 76-86.
- [158] J. Alam, D. Stewart, C. Touchard, S. Boinapally, A. M. Choi and J. L. Cook (1999). Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene, *J. Biol. Chem.* 274, 26071-26078.
- [159] F. F. Chu, R. S. Esworthy, L. Lee and S. Wilczynski (1999). Retinoic acid induces Gpx2 gene expression in MCF-7 human breast cancer cells, *J. Nutr.* 129, 1846-1854.
- [160] M. J. Kelner, R. D. Bagnell, M. A. Montoya and K. A. Lanham (2000). Structural organization of the human gastrointestinal glutathione peroxidase (GPX2) promoter and 3'-nontranscribed region: transcriptional response to exogenous redox agents, *Gene* 248, 109-116.
- [161] F. Ursini, M. Maiorino, R. Brigelius-Flohé, K. D. Aumann, A. Roveri, D. Schomburg and L. Flohé (1995). Diversity of glutathione peroxidases, *Methods Enzymol.* 252, 38-53.
- [162] D. B. Cowan, R. D. Weisel, W. G. Williams and D. A. Mickle (1993). Identification of oxygen responsive elements in the 5'-flanking region of the human glutathione peroxidase gene, *J. Biol. Chem.* 268, 26904-26910.
- [163] M. Tan, S. Li, M. Swaroop, K. Guan, L. W. Oberley and Y. Sun (1999). Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53, *J. Biol. Chem.* 274, 12061-12066.

- [164] S. L. Throm and M. J. Klemsz (2003). PU.1 regulates glutathione peroxidase expression in neutrophils, *J. Leukoc. Biol.* 74, 111-117.
- [165] C. Bierl, B. Voetsch, R. C. Jin, D. E. Handy and J. Loscalzo (2004). Determinants of human plasma glutathione peroxidase (GPx-3) expression, *J. Biol. Chem.* 279, 26839-26845.
- [166] H. S. Huang, C. J. Chen and W. C. Chang (1999). The CCAAT-box binding factor NF-Y is required for the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in human epidermoid carcinoma A431 cells, *FEBS Lett* 455, 111-116.
- [167] C. Ufer, A. Borchert and H. Kühn (2003). Functional characterization of cis- and trans-regulatory elements involved in expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, *Nucleic Acids Res.* 31, 4293-4303.
- [168] A. Borchert, N. E. Savaskan and H. Kühn (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, 2571-2580.
- [169] M. Maiorino, M. Scapin, F. Ursini, M. Biasolo, V. Bosello and L. Flohé (2003). Distinct promoters determine alternative transcription of gpx-4 into phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase variants, *J. Biol. Chem.* 278, 34286-34290.
- [170] K. J. Hintze, K. A. Wald, H. Zeng, E. H. Jeffery and J. W. Finley (2003). Thioredoxin reductase in human hepatoma cells is transcriptionally regulated by sulforaphane and other electrophiles via an antioxidant response element, *J. Nutr.* 133, 2721-2727.
- [171] J. Zhang, V. Svehlikova, Y. Bao, A. F. Howie, G. J. Beckett and G. Williamson (2003). Synergy between sulforaphane and selenium in the induction of thioredoxin reductase 1 requires both transcriptional and translational modulation, *Carcinogenesis* 24, 497-503.
- [172] A. S. Keck and J. W. Finley (2004). Cruciferous vegetables: cancer protective mechanisms of glucosinolate hydrolysis products and selenium, *Integr. Cancer Ther.* 3, 5-12.
- [173] D. T. Verhoeven, R. A. Goldbohm, G. van Poppel, H. Verhagen and P. A. van den Brandt (1996). Epidemiological studies on brassica vegetables and cancer risk, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 5, 733-748.
- [174] Y. Kayanoki, J. Fujii, K. N. Islam, K. Suzuki, S. Kawata, Y. Matsuzawa and N. Taniguchi (1996). The protective role of glutathione peroxidase in apoptosis induced by reactive oxygen species, *J. Biochem. (Tokyo)* 119, 817-822.
- [175] L. M. Coussens and Z. Werb (2002). Inflammation and cancer, *Nature* 420, 860-867.
- [176] W. L. Smith and W. E. Lands (1972). Oxygenation of polyunsaturated fatty acids during prostaglandin biosynthesis by sheep vesicular gland, *Biochemistry* 11, 3276-3285.
- [177] M. Haurand and L. Flohé (1988). Kinetic studies on arachidonate 5-lipoxygenase from rat basophilic leukemia cells, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 369, 133-142.

- [178] F. Weitzel and A. Wendel (1993). Selenoenzymes regulate the activity of leukocyte 5-lipoxygenase via the peroxide tone, *J. Biol. Chem.* 268, 6288-6292.
- [179] J. R. Vane, Y. S. Bakhle and R. M. Botting (1998). Cyclooxygenases 1 and 2, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38, 97-120.
- [180] R. A. Gupta and R. N. Dubois (2001). Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2, *Nat. Rev. Cancer* 1, 11-21.
- [181] H. Kühn (1996). Biosynthesis, metabolization and biological importance of the primary 15-lipoxygenase metabolites 15-hydro(pero)XY-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid and 13-hydro(pero)XY-9Z,11E-octadecadienoic acid, *Prog. Lipid Res.* 35, 203-226.
- [182] H. Imai, K. Narashima, M. Arai, H. Sakamoto, N. Chiba and Y. Nakagawa (1998). Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, *J. Biol. Chem.* 273, 1990-1997.
- [183] Y. S. Ho, J. L. Magnenat, R. T. Bronson, J. Cao, M. Gargano, M. Sugawara and C. D. Funk (1997). Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia, *J. Biol. Chem.* 272, 16644-16651.
- [184] S. Florian (2004) Immunhistochemische Charakterisierung pathologischer Veränderungen bei der sporadischen und hereditären kolorektalen Karzinogenese und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen; Präventionsstrategien mit resistenter Stärke Typ III - experimentelle Studien am TNBS- und DMH-Modell., Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin.
- [185] P. A. Cerutti (1985). Prooxidant states and tumor promotion, *Science* 227, 375-381.
- [186] S. Li, T. Yan, J. Q. Yang, T. D. Oberley and L. W. Oberley (2000). The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase, *Cancer Res.* 60, 3927-3939.
- [187] C. Lehmann, U. Wollenberger, R. Brigelius-Flohé and F. W. Scheller (2001). Modified gold electrodes for electrochemical studies of the reaction of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase with glutathione and glutathione disulfide, *Electroanalysis* 23, 364-369.
- [188] D. W. Jeong, M. H. Yoo, T. S. Kim, J. H. Kim and I. Y. Kim (2002). Protection of mice from allergen-induced asthma by selenite: prevention of eosinophil infiltration by inhibition of NF-kappa B activation, *J. Biol. Chem.* 277, 17871-17876.
- [189] K. Iiyama, L. Hajra, M. Iiyama, H. Li, M. DiChiara, B. D. Medoff and M. I. Cybulsky (1999). Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation, *Circ. Res.* 85, 199-207.
- [190] I. Y. Kim and T. C. Stadtman (1997). Inhibition of NF-kappaB DNA binding and nitric oxide induction in human T cells and lung adenocarcinoma cells by selenite treatment, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94, 12904-12907.

- [191] V. Makropoulos, T. Bruning and K. Schulze-Osthoff (1996). Selenium-mediated inhibition of transcription factor NF-kappa B and HIV- 1 LTR promoter activity, *Arch. Toxicol.* 70, 277-283.
- [192] K. S. Prabhu, F. Zamamiri-Davis, J. B. Stewart, J. T. Thompson, L. M. Sordillo and C. C. Reddy (2002). Selenium deficiency increases the expression of inducible nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages: role of nuclear factor-kappaB in up- regulation, *Biochem. J.* 366, 203-209.
- [193] J. Wenk, J. Schuller, C. Hinrichs, T. Syrovets, N. Azoitei, M. Podda, M. Wlaschek, P. Brenneisen, L. A. Schneider, A. Sabiwalsky, 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, 45634-45642.
- [194] X. M. Liu, G. B. Chapman, H. Wang and W. Durante (2002). Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene expression stimulates apoptosis in vascular smooth muscle cells, *Circulation* 105, 79-84.
- [195] H. J. Duckers, M. Boehm, A. L. True, S. F. Yet, H. San, J. L. Park, R. Clinton Webb, M. E. Lee, G. J. Nabel and E. G. Nabel (2001). Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation, *Nat. Med.* 7, 693-698.
- [196] R. E. Bellas, J. S. Lee and G. E. Sonenshein (1995). Expression of a constitutive NF-kappa B-like activity is essential for proliferation of cultured bovine vascular smooth muscle cells, *J. Clin. Invest.* 96, 2521-2527.
- [197] X. L. Chen, S. E. Varner, A. S. Rao, J. Y. Grey, S. Thomas, C. K. Cook, M. A. Wasserman, R. M. Medford, A. K. Jaiswal and C. Kunsch (2003). Laminar flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells. A novel anti-inflammatory mechanism, *J. Biol. Chem.* 278, 703-711.
- [198] T. J. Vachharajani, J. Work, A. C. Issekutz and D. N. Granger (2000). Heme oxygenase modulates selectin expression in different regional vascular beds, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278, H1613-1617.
- [199] M. P. Soares, M. P. Seldon, I. P. Gregoire, T. Vassilevskaia, P. O. Berberat, J. Yu, T. Y. Tsui and F. H. Bach (2004). Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation, *J. Immunol.* 172, 3553-3563.
- [200] Y. Zhang, J. Li and L. Tang (2005). Cancer-preventive isothiocyanates: dichotomous modulators of oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med.* 38, 70-77.
- [201] H. R. Moinova and R. T. Mulcahy (1999). Up-regulation of the human gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene involves binding of Nrf-2 to an electrophile responsive element, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 661-668.
- [202] J. W. Fahey and P. Talalay (1999). Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of Phase II detoxication enzymes, *Food Chem. Toxicol.* 37, 973-979.

- [203] E. Heiss, C. Herhaus, K. Klimo, H. Bartsch and C. Gerhauser (2001). Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms, *J. Biol. Chem.* 276, 32008-32015.
- [204] Q. Ma and K. Kinneer (2002). Chemoprotection by phenolic antioxidants. Inhibition of tumor necrosis factor alpha induction in macrophages, *J. Biol. Chem.* 277, 2477-2484.
- [205] A. Foryst-Ludwig, M. Neumann, W. Schneider-Brachert and M. Naumann (2004). Curcumin blocks NF-kappaB and the motogenic response in Helicobacter pylori-infected epithelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316, 1065-1072.
- [206] A. Kumar, S. Dhawan, N. J. Hardegen and B. B. Aggarwal (1998). Curcumin (Diferuloylmethane) inhibition of tumor necrosis factor (TNF)-mediated adhesion of monocytes to endothelial cells by suppression of cell surface expression of adhesion molecules and of nuclear factor-kappaB activation, *Biochem. Pharmacol.* 55, 775-783.
- [207] B. Gupta and B. Ghosh (1999). Curcuma longa inhibits TNF-alpha induced expression of adhesion molecules on human umbilical vein endothelial cells, *Int. J. Immunopharmacol.* 21, 745-757.
- [208] T. Finkel (2001). Reactive oxygen species and signal transduction, *IUBMB Life* 52, 3-6.

7 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen Personen meinen Dank aussprechen, die, auf unterschiedlichste Art und Weise, das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglicht haben.

Allen voran danke ich Frau Prof. Dr. Regina Brigelius-Flohé für die interessante Themenstellung sowie für die in zahlreichen Diskussionen vermittelten Hinweise und Anregungen und für die allzeit, auch in schwierigen Phasen, gewährte Unterstützung.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Abteilung „Vitamine und Atherosklerose“ bzw. der Abteilung „Biochemie der Mikronährstoffe, wie wir seit kurzem heißen, möchte ich für die gute Zusammenarbeit und für das unkomplizierte und höchst angenehme Arbeitsklima danken. Einige Personen sind hierbei besonders hervorzuheben:

Stefanie Deubel, Anke Gühler und Jörg-Uwe Bittner danke ich für die tatkräftige Hilfe bei den experimentellen Arbeiten. Ohne Euch hätte alles viel länger gedauert und einige Schwierigkeiten wären wohl nie überwunden worden, wenn da nicht so manche realisierbare Idee von Eurer Seite gekommen wäre.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Dr. Kerstin Schnurr, die mich, als ich noch ganz am Anfang stand, in viele molekularbiologische Arbeitstechniken eingewiesen hat. Frau Dr. Katrin Müller-Schmehl danke ich für die Hilfe bei den immuncytochemischen Versuchen und Frau Dr. Gaby-Fleur Böhl für das Näherbringen verschiedener proteinbiochemischer Methoden.

Bei den Doktoranden und Diplomanden unserer Abteilung, die mich während der letzten Jahre begleitet haben, genauer gesagt bei: Dirk Kluth, Nadine Jurrmann, Nico Landes, Paul Pfluger, Sandra Nell, Daniela Kuka, Mandy Osterloh, Melanie Kny, Anja Jacobs, Kathrin Weiß und Anna Kipp bedanke ich mich für die allzeit nette Gesellschaft sowohl dienstlich als auch auf privater Ebene.

Schließlich bedanke ich mich ganz herzlich bei meiner Familie für die Geduld und stete Förderung meiner Ausbildung.

Ich möchte diese Arbeit den beiden wichtigsten Männern in meinem Leben widmen: meinem Vater Dieter Banning und meinem Freund Achim Düringer, welche diesen Tag beide leider nicht mehr erleben können.

Potsdam, im Januar 2005

Antje Banning