

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
König-Ludwig-Haus

Direktor: Prof. Dr. med. J.Eulert

**DNA-Stabilität und
Thioredoxin/Thioredoxin Reduktase im Zellkern**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Karina Paunescu
aus Bukarest/Rumänien

Würzburg, Februar 2003

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	1
1 DNA-Prozessierung	1
1.1 Topoisomerasen.....	2
1.2 DNA-Reparasen	5
2 DNA-Schädigung, -Schutz und Reparatur.....	7
2.1 Schädigungsmechanismen.....	9
2.1.1 Strangbrüche.....	10
2.1.2 Oxidative DNA-Schädigung.....	10
2.2 Reparaturmechanismen	11
2.2.1 Basen-Exzisions-Reparatur und Nucleotide Excision Repair (NER).....	11
2.2.2 Reparatur von Strangbrüchen	12
2.3 DNA Instabilität und Tumorentstehung	13
2.4 DNA Instabilität, Aging und degenerative Erkrankungen	14
3 Antioxidative Systeme	15
3.1 Reaktive Sauerstoff-Spezies	17
3.1.1 Einzel-Substanzen	17
3.1.2 Oxidative Schädigung versus Redox-sensitive Signaltransduktion	18
3.2 Antioxidative Schutzmechanismen	19
3.2.1 Superoxid-Dismutasen (SOD).....	19
3.2.2 Katalasen	20
3.2.3 Selenoenzyme.....	20
3.2.3.1 Selen als Spurenelement.....	20
3.2.3.2 Selenocystein.....	21
3.2.3.3 Selenoproteine.....	23
3.2.3.3.1 Glutathionperoxidasen.....	23
3.2.3.3.2 Selenoprotein P	26
3.2.3.3.3 Weitere Selenoproteine.....	26
3.2.4 Thioredoxin Reduktasen (TrxR).....	27
3.2.5 Thioredoxin	29

B. Fragestellung	31
C. Material und Methoden	33
1 Material	33
1.1 Lösungen und Puffer	33
1.2 Prokaryontische Zellen	33
1.3 Plasmide	33
1.4 Oligonucleotide	34
1.5 Eukaryontische Zellen	34
1.5.1 COS7-Zellen	34
1.5.2 HepG2	35
1.5.3 hFOB	35
1.5.4 MG63	35
1.5.5 T/C-28a2	35
1.5.6 TERT4	35
1.6 Computersoftware	35
2 Methoden	36
2.1 Zellkultur	36
2.1.1 Kulturbedingung und Passagierung	36
2.2 Arbeiten mit Nucleinsäuren	36
2.2.1 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	36
2.2.2 Arbeiten mit RNA	36
2.2.2.1 Isolierung von Gesamt -RNA	36
2.2.2.2 Reverse Transkription von RNA	37
2.2.3 Arbeiten mit DNA	37
2.2.3.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	37
2.2.3.2 Restriktion von DNA	38
2.2.3.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese	39
2.2.3.4 Elution von DNA-Fragmenten	39
2.2.3.5 Klonierung von PCR-Produkten in die Klonierungsvektoren (pGEM, pCR2.1-TOPO) und in die Vektoren pEGFP-N1, pEGFP-C1 und pDsRed2-N1	39
2.2.3.5.1 Ligation	41

2.2.3.6	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien.....	41
2.2.3.6.1	Herstellung MgSO ₄ -kompetenter <i>E.coli</i> DH5 α oder JM109.....	41
2.2.3.6.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> DH5 α oder JM109	42
2.2.3.7	Isolierung von Plasmid-DNA.....	42
2.2.3.7.1	Mini-Präparation.....	42
2.2.3.7.2	Midi-und Maxi-Präparation.....	42
2.2.3.8	Sequenzierung.....	43
2.2.3.9	Transfektion von COS7-, HepG2- und hFOB-Zellen.....	43
2.3	Arbeiten mit Proteinen	44
2.3.1	Proteinmessung.....	44
2.3.2	Gewinnung von Kernen.....	44
2.3.3	Herstellen von Zelllysaten.....	45
2.3.4	Immunadsorptionsversuche ("pull-down Assay").....	45
2.3.5	SDS-Gelelektrophorese	47
2.3.6	Silberfärbung	49
2.3.7	Western Blot Analyse (Proteintransfer auf eine Membran).....	50
2.4	Immunostaining.....	52
2.5	Topoisomerase Assay.....	52
D. Ergebnisse.....		54
1 Expression von Fusionsproteinen		54
1.1	Klonierung und Herstellung der Expressionsvektoren.....	54
1.1.1	Thioredoxin	54
1.1.2	Thioredoxin Reduktase.....	55
1.1.2.1	Klonierung der Thioredoxin Reduktase 1 aus hFOB-Zellen	55
1.1.2.2	Herstellung der Expressionskonstrukte	55
1.2	Westernblot-Analyse	56
2 Subzelluläre Lokalisation des Thioredoxin/Thioredoxin Reduktase-Systems		59
2.1	Thioredoxin (Trx).....	59
2.1.1	Transiente Transfektion von Trx in COS7-, HepG2- und hFOB-Zellen.....	59
2.1.2	Immunfluoreszenz-Untersuchungen in Zellkultur für Trx.....	60
2.2	Thioredoxin Reduktase.....	62

2.2.1	Expression von Thioredoxin Reduktase-Isoformen	62
2.2.1.1	PCR-Nachweis in verschiedenen Zelllinien und Westernblot-Analyse	62
2.2.1.2	Transiente Transfektion von TrxR-Isoformen in COS7-, HepG2- und hFOB-Zellen und mögliche Lokalisationssequenzen	63
2.2.2	Immunfluoreszenz an Kulturzellen für TrxR1	68
2.3	Kolokalisation des Trx/TrxR-Systems und Topoisomerase I	74
3	Charakterisierung von nucleären Interaktionspartnern der TrxR.....	75
4	TrxR und DNA-prozessierende Enzyme	78
E	Diskussion	81
1	Molekularbiologie und Proteinstruktur der TrxR1	81
2	Subzelluläre Lokalisation des Trx/TrxR-Systems, Isoformen der TrxR1 und mögliche Lokalisationssequenzen	83
2.1	Subzelluläre Lokalisation	83
2.1.1	Subzelluläre Lokalisation von Thioredoxin	83
2.1.2	Subzelluläre Lokalisation von TrxR1	84
2.1.3	Kolokalisation von TrxR1 und Trx	87
3	Charakterisierung von nucleären Interaktionspartnern.....	89
4	TrxR und DNA-prozessierende Enzyme	91
F	Zusammenfassung.....	96
G	Abkürzungen	97
H	Literaturverzeichnis	100

A. Einleitung

1 DNA-Prozessierung

Von Generation zu Generation und von Zelle zu Zelle wird die genetische Information weitergegeben. Die molekulare Grundlage ist die Replikation von DNA. Bei Eukaryonten ist das Genom in Form von eng gepacktem Chromatin (DNA-Protein-Komplex) organisiert. Bei Entwindung der langen DNA-Moleküle kommt es zu Verdrillungen und hohen Drehungsspannungen, die durch Topoisomerasen aufgelöst werden müssen, sonst käme es zum Stillstand der Replikation. Die semikonservative Replikation erfordert zwei grundlegende Reaktionen:

- 1- der parentale DNA-Strang wird entspiralisiert, dadurch werden dem DNA Synthese-Apparat die Nucleotid-Folgen als Matrizen zur Kopie bereitgestellt,
- 2- die neuen DNA-Stränge, die komplementär zu den Matrizen-Strängen sind, werden anschließend synthetisiert.

Für die Entwindung der DNA sind die Helikasen und die Topoisomerasen verantwortlich, für die Synthese der neuen DNA-Stränge die DNA-Polymerasen. Die Schritte, in denen die enzymatische Polymerisierung von Deoxynucleotid-Triphosphaten (dNTP) von 5' nach 3' erfolgt, sind:

- Korrekte Bindung des Enzyms an die DNA: das 3'-OH-Ende des Nucleotids liegt im aktiven Zentrum.
- Leitung eines dNTP an die Nucleotid-Bindestelle des Enzyms. Die Anpassung des hereinkommenden Deoxynucleotids über Basenpaarung an die komplementäre Base im Matrizenstrang ist hier der entscheidende Vorgang.
- Die Konsequenz ist ein nukleophiler Angriff des 3'-OH-Nucleotid-Endes auf das α -Phosphat des freien Nucleotids und die Rückbildung der ursprünglichen Konformation. Das neue 3'-OH-Nucleotid-Ende gelangt in das aktive Zentrum. Das bedeutet, dass die DNA-Polymerase sich um die Länge eines Basenpaares an der DNA entlang bewegt. Dabei kann das Enzym an der DNA bleiben, bis schließlich alle vorhandenen Einzelstrang-Bereiche in Doppelstränge überführt sind. Man spricht dann von einer prozessiven DNA-Synthese (Knippers, 2001).

1.1 Topoisomerasen

Die Topoisomerasen sind in allen prokaryontischen und eukaryontischen Zellen vorhanden und nehmen an Reaktionen teil, bei denen die DNA-Helix-Windungen sich ändern und Verdrillungen auftreten, bei der Replikation, Transkription und Rekombination. Es gibt zwei Klassen oder Gruppen von Topoisomerasen, die je in zwei Familien eingeteilt werden können: Topoisomerase IA, B und Topoisomerasen IIA, B. Jede Topoisomerase öffnet und schließt die DNA-Stränge durch den selben Mechanismus:

- Nach der Bindung an die DNA, wird eine Phosphatbrücke zwischen einer Tyrosin-Seitenkette im aktiven Zentrum des Enzyms und dem Phosphodiester-Rest der DNA gebildet.
- Durch die Lücke, die dadurch entsteht, kann ein intakter DNA-Strang geleitet werden oder sie dient als Stelle freier Drehbarkeit.
- Das Schließen der Lücke erfolgt dann, indem sich die kovalente Protein-DNA-Bindung unter gleichzeitiger Rückbildung des Phosphodiester-Restes der DNA löst.

Einen Überblick über die Vertreter der Topoisomerase-Familien und deren Funktion gibt die folgende Tabelle (Knippers, 2001; Champoux, 2001; Wang, 2002):

	Vertreter	Struktur	Reaktionen
Typ-IA	<i>E.coli</i> Topoisomerase I (97 kDa), III, Hefen Topoisomerase III, <i>D.melanogaster</i> III α und β , Topoisomerase III α und III β aus Säugetieren	Monomer Monomer Monomer Monomer	spaltet Einzelstrang-DNA und bildet 5'-Phosphotyrosin Bindungen; entspannt negativ superhelikale DNA; positiv superhelikale DNA nur bei vorhandenen Einzelstrangregionen
Typ-IB	eukaryontische Topoisomerase I (100 kDa), mitochondriale Topoisomerase I aus Säugertierzelle, Pox Virus Topoisomerase	Monomer Monomer	bindet an Doppelstrang-DNA und schneidet einen der beiden DNA-Stränge unter Ausbildung einer 3'-Phosphotyrosin Bindung; entspannt negativ und positiv superhelikale DNA; <i>in vitro</i> Katenation und Dekatenation von nicked dsDNA-Ringen
Typ-IIA	<i>E.coli</i> Gyrase, <i>E.coli</i> Topoisomerase IV, Hefen Topoisomerase II, Topoisomerasen II α und II β aus Säugetieren (human), Phagen T4 DNA Topoisomerase	Tetramer Tetramer Homodimer Homodimer Homodimer	spaltet beide Stränge der gebundenen DNA; entspannt negativ superhelikale DNA spaltet beide Stränge der gebundenen DNA und entspannt negativ und positiv superhelikale DNA; alle benötigen ATP-Spaltung für einen vollständigen Reaktions-zyklus
Typ-IIB	<i>Sulfolobus shibatae</i> DNA Topoisomerase VI (Untereinheit A homolog zu Spo1 in Hefen)	Tetramer	spaltet beide Stränge der gebundenen DNA; entspannt negativ superhelikale DNA

Tab. 1) Vertreter der Topoisomerasen-Familien, Struktur und biologische Funktionen

Die Funktionen aller Topoisomerasen überlappen sich in der Zelle teilweise, aber sie unterscheiden sich insofern, als die Typ-I Enzyme hauptsächlich für die Auflösung von Torsionsspannungen verantwortlich sind, während die Typ-II Enzyme eine Rolle spielen, wenn Doppelstränge umeinander gewunden sind oder gewunden werden, wie bei Trennung von Replikationsprodukten und bei der Trennung von Chromatiden während der Mitose.

Typ-I-DNA-Topoisomerasen werden in Untergruppe I-A und I-B unterteilt.

Die Enzyme der Untergruppe I-A haben DNA-Einzelstränge oder einzelsträngige Bereiche in Doppelstrang-DNA als Substrat; die Tyrosingruppe des aktiven Zentrums bindet sich an den 5'-Phosphat-Rest der geschnittenen DNA, die Folge ist die Entstehung einer Lücke, durch die der intakte Strang geleitet wird. Die Lücke wird danach wieder verschlossen und die Konsequenz ist die Entspannung negativ superhelikaler DNA. Die Struktur einiger Vertreter wird in Abbildung 1 dargestellt. Die

Zn-Domäne ist durchaus für die Relaxation und Verknüpfung/Lösen von verknüpfter DNA notwendig und es wird angenommen, dass durch Bindung an die DNA die Bewegung durch die Lücke erleichtert wird. Für die Relaxation brauchen die Topoisomerasen dieser Gruppe Mg^{2+} (Champoux, 2001).

Typ-I-B Topoisomerasen benötigen doppelsträngige DNA und schneiden einen der beiden Stränge, indem die Tyrosin-Seitenkette mit einem 3'-Ende verknüpft wird. Der geschnittene Strang dreht sich um den intakten, so dass sowohl überwundene als auch unterwundene DNA vollständig entspannt wird. Als Hauptvertreter gilt humane Topoisomerase I, welche für die Relaxation kein Mg^{2+} braucht und keine Zn-Domäne enthält. Die Struktur, welche in der Abbildung 1 dargestellt wird, besteht aus vier Domänen. Die N-terminale-Domäne (214 Aminosäuren) ist unwesentlich für die Relaxation *in vitro* und stellt eine hydrophile, unstrukturierte, hoch empfindliche Region für Proteasen dar. Hier sind auch vier nucleäre Signale analog zu Proteinen wie Nukleolin, SV40 T-Antigen, p53 und WRN-Protein (Werner Protein) lokalisiert. Die nächste Domäne ist eine Core-Domäne, hoch konserviert, welche die katalytischen Reste ausgenommen der Tyrosingruppe enthält (Aminosäure 421). Eine für Protease empfindliche und schlecht konservierte Linker-Domäne enthält 77 Aminosäuren und bindet die Core-Domäne an die C-Terminus-Domäne, wo sich das aktive Tyr723-Zentrum befindet (Champoux, 2001).

Typ-II-DNA-Topoisomerasen binden an doppelsträngige DNA und schneiden jeden der beiden DNA-Stränge; die 5'-Phosphat-Enden werden an Tyrosin-Reste von verschiedenen Untereinheiten geknüpft und durch die entstandene Lücke kann ein intakter Doppelstrang geleitet werden. Der Mechanismus wird als „Zwei-Tore-Weg“ (*two-gate-operation*) bezeichnet. Die Typ-II-Enzyme benötigen ATP für die Konformationsänderungen, die das Enzym bei dem Zwei-Tore-Weg durchlaufen muss. Es gibt zwei eukaryontische Typ-II-DNA-Topoisomerasen (II α , II β), die Ähnlichkeiten mit den bakteriellen haben: der N-Terminus-Bereich mit der GyrB-Untereinheit und ihrer ATP-ase Funktion und der zentral gelegene Bereich mit der GyrA-Untereinheit mit dem Tyrosin-Rest im aktiven Zentrum (Knippers, 2001). Ein Übersicht der Struktur der Topoisomerase-Familie gibt die Abbildung 1.

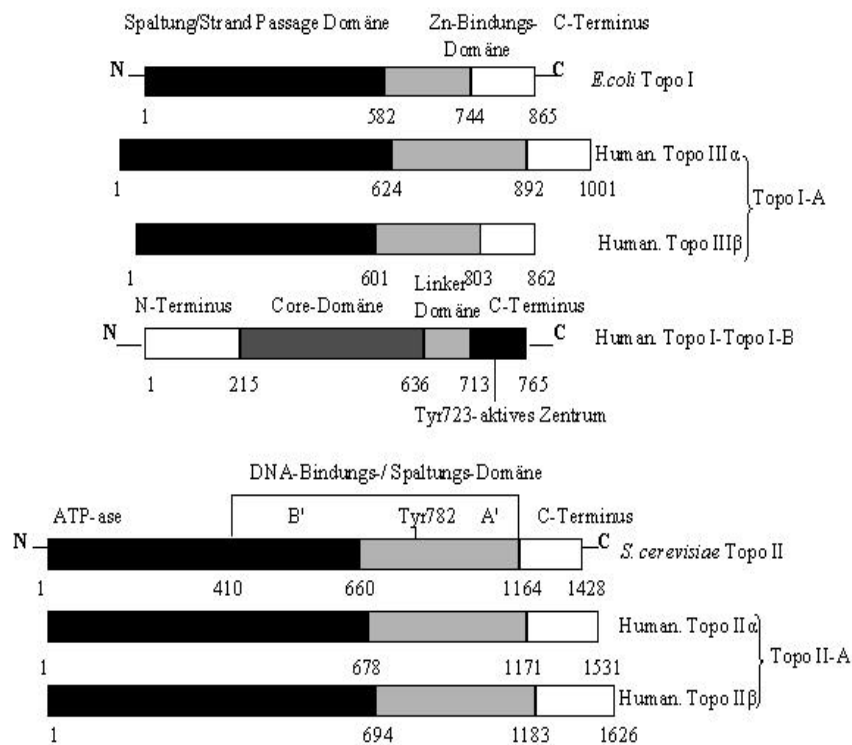


Abb. 1) Die Struktur verschiedener Vertreter der Topoisomerase-Familie (modifiziert nach Champoux *et al.*, 2001)

1.2 DNA-Reparasen

Für die Zelle ist die Erhaltung der genomischen Integrität von großer Bedeutung. Die genetische Information kann Veränderungen erleiden, die vererbbar sind und unter dem Namen Mutationen bekannt sind. Mutationen sind einerseits notwendig für die Evolution und können andererseits gefährliche Folgen haben, wie z.B. Krankheiten oder sogar Tumorentstehung. Deshalb haben sich schon früh in der Evolution wirkungsvolle Reparaturmechanismen entwickelt, die Schäden an der DNA erkennen und die Häufigkeit von Mutationen in bestimmten Grenzen halten. Eine wichtige Bedrohung für die genomische Stabilität sind unreparierte DNA-Schäden (Kiberstis *et al.*, 2002).

DNA-prozessierende Enzyme werden benötigt, um die Integrität des Genoms während der Prozesse wie Ketten-Verlängerung (DNA-Replikation), DNA-Reparatur, DNA-Synthese, DNA-Rekombination, Zell-Zyklus-Kontrolle und schadeninduzierte Checkpoint-Kontrolle beizubehalten (Hübscher *et al.*, 2002). DNA-Polymerasen unterscheiden sich bei Eukaryonten und Bakterien. Bei Eukaryonten gibt es mindestens

fünf verschiedene. Sie verknüpfen monomere Deoxynucleotide zu langen Polynucleotid-Ketten. Die angebotene DNA muss teilweise einzelsträngig sein, indem beispielsweise einer der beiden DNA-Stränge den anderen überragt. Neue Nucleotide werden dann an das 3'-OH-Ende des kürzeren Stranges geheftet, während die Reihenfolge der Nucleotide durch die Sequenz des Einzelstranges bestimmt wird (Knippers, 2001).

Viele Polymerasen (z.B. Pol γ , ϵ und δ) enthalten eine weitere enzymatische Aktivität und zwar eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität (Shevelev *et al.*, 2002). Die wichtige Aufgabe der 3'-5' Exonuclease wird oft als Korrekturlese-Funktion beschrieben, denn sie erkennt und entfernt falsch eingebaute Deoxynucleotide. Mutierte Phänotypen wurden in Zellen beschrieben (mit höher Rate von Tumorenstehung), die keine 3'-5'-Exonuclease assoziierte Polymerase-Aktivität haben oder Defekte in der Mismatch-Reparatur. Die 3'-5'-Exonucleasen können in zwei Gruppen eingeteilt werden: in intrinsische, polymerasenassoziierte Enzyme und unabhängige, autonome Enzyme (Jackson *et al.*, 1998; Kunkel *et al.*, 1988; Shevelev *et al.*, 1996). Polymerase-assoziierte Enzyme umfassen *Escherichia coli* Pol I, Bakteriophagen-Polymerasen und eukaryontische Polymerasen δ , ϵ und γ . Autonome Exonucleasen schließen die Säugetier-Enzyme TREX1 und TREX2 (Mazur *et al.*, 1999). Relativ neu charakterisierte Proteine mit eigener Exonuclease-Aktivität oder mit Beteiligung an der Aktivität von Interaktionspartnern wurden kürzlich beschrieben. Als Beispiele seien unter anderen das Werner Syndrom Protein (WRN) (Huang, *et al.*, 1998), p53, MRE11 (Doppelstrang-Bruch-Reparatur), zwei Checkpointproteine, RAD1 und RAD9 und APE1 (Apurin-/Apyrimidin-Endonuclease 1) (Basen-Exzisions-Reparatur) genannt.

Bei der Entwindung der DNA nehmen Enzyme teil, die man als Helikasen bezeichnet. Unter biochemischen Gesichtspunkt werden Helikasen nach der Polarität ihrer Bewegung auf dem gebundenen DNA-Strang (in 3'-5'-Richtung oder in 5'-3'-Richtung) oder nach Art des Substrats eingeteilt. Viele Helikasen benötigen z.B. überstehende Einzelstrang-Enden um wirken zu können. Interessanter ist jedoch eine Einteilung nach der Funktion, denn Helikasen sind an allen Reaktionen beteiligt, die mit der Ausbildung von Einzelstrang-Bereichen einhergehen. Deswegen gibt es spezifische Helikasen für die Replikation, DNA-Reparatur, für die Rekombination und für andere

genetische Prozesse (Knippers, 2001). Bei *E. coli* wird die Nucleotid-Exzisions-Reparatur von UvrA, B, C-Proteinen durchgeführt.

2 DNA-Schädigung, -Schutz und Reparatur

Zellen befinden sich ständig unter dem Einfluss von zytotoxischen und mutagenen Substanzen. Diese können exogener oder endogener Herkunft sein. Zu den exogenen gehören UV-Licht, ionisierende Strahlen und chemische Substanzen aus Nahrung und Wasser. Elektromagnetische Strahlen (Röntgen- oder γ -Strahlen) sowie α - und β -Strahlen können direkt oder indirekt auf Bestandteile der Zelle wirken. Die Schäden an der DNA betreffen die Struktur von Nucleotid-Basen oder die Struktur der DNA: Einzelstrang- und Doppelstrang-Brüche (Knippers, 2001).

Zwei Systeme sind bei Menschen für Genomintegrität wesentlich: DNA-Reparatur und Apoptose. Zellen, in denen DNA-Reparatur ineffizient ist, neigen dazu, in hohem Maß DNA-Schäden anzusammeln. Apoptosedefiziente Zellen tendieren dazu, trotzdem zu überleben. Dadurch findet auch die Replikation von geschädigter DNA statt, was Mutationen verursacht, die zur Alteration der Proteinfunktion führen (gain of function, loss of function) und zur Karzinogenese beitragen können. Man kennt fünf DNA-Reparatur-Systeme, wobei die ersten zwei (homologe Rekombinations-Reparatur (HRR) und non-homologous End-Joining (NHEJ)), verschiedene Mechanismen für die Reparatur von Doppelstrang-Brüchen darstellen. Tabelle 2 zeigt die Reparaturmechanismen, die DNA-Schäden beseitigen, diese werden ausführlicher behandelt.

DNA-Schäden und Reparatur	Enzyme	Referenz
Einzelstrangbrüche	-Poly-(ADP-Ribose)Polymerase I (PARP-1) -AP-Lyase-Aktivität der Polymerase β -SSB-Protein (single strand binding) -RPA (Replication Protein A)	Jeggo, 1998; Shall <i>et al.</i> , 2000; de Murcia <i>et al.</i> , 1994, Knippers, 2001;
Doppelstrangbrüche	-RecA-Protein, RecB-Protein -eukaryontische Rad51, Rad 52 -Protein-Komplex Ku70 und Ku80 -Protein-Kinase(DNA-PK _{cs} ; cs für: <i>catalytic subunit</i>) -Proteine mit Exonuclease-Aktivität	Norbury <i>et al.</i> , 2001; Smith <i>et al.</i> , 1999; Uhlmann <i>et al.</i> , 1997

	<ul style="list-style-type: none"> -Protein p53, RFC (Replikation Faktor C) -PCNA-Protein (proliferating cell nuclear antigen) -ATR-Kinase -schadensinduzierte Checkpoint-Kontrolle-Proteine -Ligase IV, XRCC4-Protein (<i>x ray repair cross complementing</i>) -BRCA-1(Brust-Krebs-Asoziiertes-Gen 1(breast cancer-associated gene 1)) 	
Basen-Exzisions-Reparatur (BER)	<ul style="list-style-type: none"> -<i>E.coli</i> Nth -<i>E.coli</i> MutM und Nei -MTH1 (mutT humanes Homolog) -DNA Glykosylase/AP-Lyase -OGG1 (8-oxoG-DNA Glycosylase) -NTH1(Nei Homolog) -NEH1 und NEH2 (Nei Homolog 1 und Nei homolog 2) -Ref1 	Furuichi, 1994; Jiang <i>et al.</i> , 1997; Zharkov <i>et al.</i> , 1997; Ikeda <i>et al.</i> , 1998; Lu <i>et al.</i> , 1997; Hazra <i>et al.</i> , 2002; Bernstein <i>et al.</i> , 2002
Nucleotid-Exzisions-Reparatur (NER)	<ul style="list-style-type: none"> -XPA, XPC-hHR23B, -RPA, TFIIH, XPG -XPF-ERCC1 -PCNA, RFC, Polymerase α und β DNA LigaseI) -XPB/ERCC3; XPD/ERCC2 	Ura <i>et al.</i> , 2002; Knippers, 2001
Mismatch-Reparatur (MMR)	<ul style="list-style-type: none"> -<i>E. coli</i>- MutS, MutL, MutH, MutU (UvrD) -<i>S.cerevisiae</i>-Msh2, Msh6, Msh3, Msh4, Msh5, Mlh1, Pms1, Mlh2, Mlh3 -<i>H. sapiens</i>-Msh2a, Msh6, Msh3, Msh4, Msh5, Mlh1, Pms2, Pms1, Mlh3 	Buermeyer <i>et al.</i> , 1999

Tab. 2) Die Mechanismen der DNA-Reparatur und die beteiligten Enzyme.

Jedes DNA-Reparatur-System besteht aus Schlüsselproteinen mit Doppelfunktion: einerseits die routinemäßige Erkennung der DNA-Schädigung und deren Reparatur und andererseits die Einleitung der Apoptose bei unangemessenen hohen Schäden. Proteine mit diesen Doppelrollen treten z.B. bei: der (1) homologen Rekombinations-Reparatur (BRCA1, ATM, ATR, WRN, BLM, Tip60 und p53); dem (2) non-homologous End-Joining (die katalytische Untereinheit der DNA-PK); der (3) Nucleotid-Exzisions-Reparatur (XPB, XPD, p53 und p33^{ING1b}); der (4) Basen-Exzisions-Reparatur (Ref1/Ape, poly (ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) und p53) und der (5) Mismatch-Reparatur (MSH2, MSH6, MLH1 und PMS2) auf. Für einige Proteine mit

Doppelfunktion sind Mutationen, die sie fehlerhaft machen, eine Ursache für Kanzerogenese. Solche Proteine schließen BRCA1, ATM, WRN, BLM, p53, XPB, XPD, MSH2, MSH6, MLH1 und PMS2 ein (Bernstein *et al.*, 2002). Einen Überblick gibt folgende Abbildung.

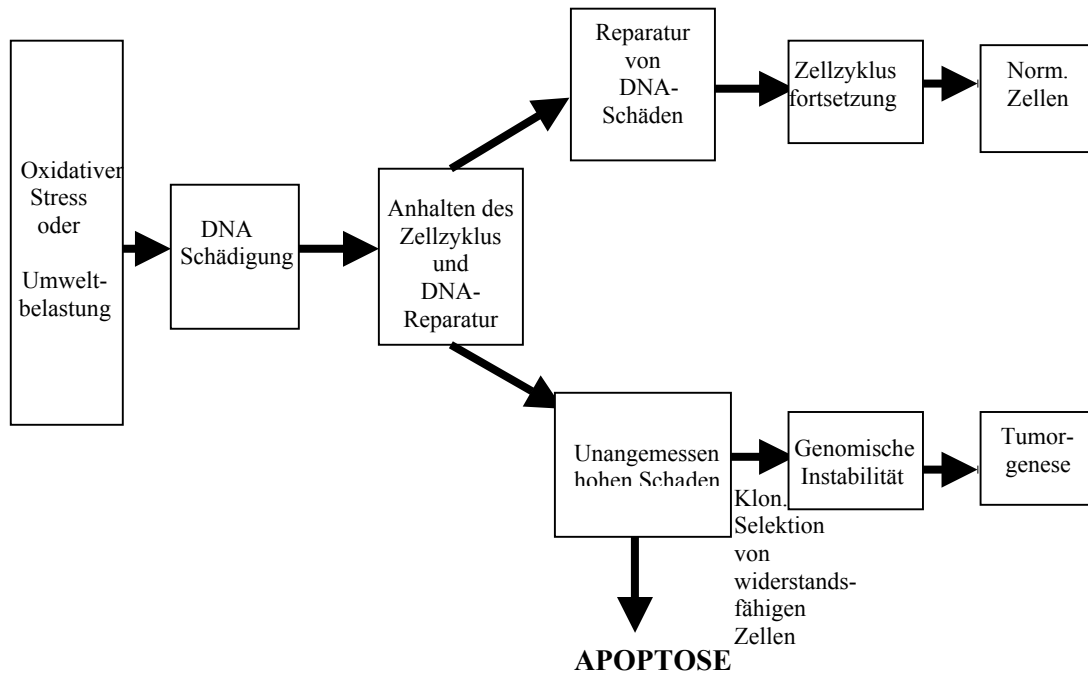


Abb. 2) Darstellung der Wege für die DNA-Reparatur bzw. Einleitung der Apoptose bei unangemessener hoher Schädigung (modifiziert nach C. Bernstein *et al.*, 2002)

2.1 Schädigungsmechanismen

Die endogenen Substanzen, die Mutationen verursachen können, beinhalten Methylierungsspezies (durch Methylierung nach Einsatz alkylierender Chemikalien veränderte DNA-Nucleotide) und reaktive Sauerstoff Spezies, die hauptsächlich aus der Atmungskette entstehen. Die DNA-Schäden, die durch Einwirkung von endogenen Wirkstoffen entstehen, sind: hydrolytische Depurinierung, Deaminierung von Cytosin und 5-Methylcytosin, Bildung von kovalenten Addukten mit DNA, Phosphodiesterbindungen und oxidative Schädigung. Wenn Basen-Schädigung unrepariert bleiben, kommt es zur Mutation, weil bei der Replikation ein Baustein der Matrize fehlt. Es kann gegenüber einer AP-Stelle jedes Nucleotid eingebaut werden.

2.1.1 Strangbrüche

Die genetische Stabilität von lebenden Zellen wird ununterbrochen von reaktiven Sauerstoff Spezies und anderen genotoxischen Moleküle bedroht. Eine besondere Bedrohung sind tausende von DNA-Strang-Brüchen, die in jeder Zelle täglich sowohl durch direkte Schädigung der Zuckermoleküle als auch indirekt durch die Basen-Exzisions-Reparatur entstehen. Wenn Einzelstrang-Brüche unrepariert bleiben, können diese in Doppelstrang-Brüche während der DNA-Replikation umgesetzt werden, was chromosomale Anomalien und genetische Mutationen zur Folge haben könnte. Ein Einzelstrang-Bruch ist eine Unterbrechung der Zucker-Phosphat Bindung von einem Einzelstrang der Doppelhelix (Lindahl, 1993; Ward, 1998; Beckman *et al.*, 1997). Zusätzlich zu endogenen Quellen können Einzelstrang-Brüche auch durch Einwirkung von ionisierender Strahlung oder durch Umweltgenotoxine induziert werden.

Die Zellen haben mehrere Wege entwickelt, um das schnelle und effiziente Wegschaffen von Einzelstrang-Brüchen zu sichern. Diese Vorgänge werden durch ein Protein-Ensemble ausgeführt, zu dem die DNA-prozessierenden Enzyme gehören.

2.1.2 Oxidative DNA-Schädigung

Unter oxidativen DNA-Schäden versteht man die Schäden, die durch Hydroxyl-Radikale verursacht werden. Diese entstehen in Zellen aus H_2O_2 , welches teilweise durch Katalasen und Peroxidasen inaktiviert wird, aber teilweise auch in reaktive Hydroxyl-Radikale überführt werden kann. Beim Einwirken ionisierender Strahlen verändern die entstehenden Radikale die Struktur von DNA-Nucleotiden. Die Reaktionsprodukte wirken mutagen, besonders wichtig scheint 8-Oxo-Guanin (8-OxoG) und 8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosin (oxo8dG) zu sein. Mutationen können auf zwei Wegen entstehen: GC-TA Transversion und Oxidation eines freien dGTP und Bildung von 8-Oxo-dGTP (Knippers, 2001). Für den ersten Mechanismus ist ein Enzym verantwortlich (Produkt des mutT-Gens), das auch bei Menschen kloniert worden ist und als MTH1 (mutT human homologue) bezeichnet wurde (Furuichi, 1994). Eine andere Gruppe von Enzymen, die 8-oxoG, Thyminglykol, 2-Hydroxyadenin, Hypoxanthin, 5,6-Dihydrouracil, 5-Hydroxyuracil, Xanthin und 5-Hydroxycytosin aus der DNA entfernen, stellen die DNA Glykosylasen/AP-Lyasen dar.

2.2 Reparaturmechanismen

2.2.1 Basen-Exzisions-Reparatur und Nucleotide Excision Repair (NER)

Ein Mechanismus, der bei der Entstehung von endogenen DNA-Schäden eingeleitet wird, ist die Basen-Exzisions-Reparatur. Das Reparatur-System kommt sowohl bei den Eukaryonten als auch in Bakterien vor. Das DNA-fremde Nucleotid wird von einer Glykosylase (Bsp. Uracil-DNA-Glykosylase) erkannt, aus dem Verband der Doppelhelix geschwenkt (base flipping) und die glykosidische Bindung gelöst. Dadurch entsteht eine AP-Stelle, die durch eine AP-Endonuclease repariert wird. Auf der 5'-Seite neben der AP-Stelle schneidet die AP-Endonuclease die Deoxyribose-Phosphat-Bindung und es entstehen zwei freie Enden: auf einer Seite der Strangöffnung ein 5'-Deoxyribose-Phosphat-Rest und auf der anderen Seite eine 3'-OH-Gruppe. Der Deoxyribose-Phosphat-Rest wird durch eine Deoxyribophosphodiesterase (dRpase) entfernt und die Lücke, die dadurch entsteht, wird mit Hilfe einer DNA-Polymerase, die an das 3'-OH-Ende ein Nucleotid bindet und einer Ligase geschlossen (Knippers, 2001; Norbury *et al.*, 2001).

Nucleotide-Excision-Repair (NER) ist einer der meist verbreiteten Mechanismen für die Reparatur von DNA-Schäden. NER wird eingeleitet, wenn DNA-Schäden zu grösseren Verzerrungen der DNA-Helix führen, wie z.B. bei der Entstehung von unförmigen Modifikationen (bulky adducts) durch polyzyklische Kohlenwasserstoffe oder bei UV-induzierten Schäden. Defekte in den Komponenten von NER sind für die Entwicklung von Xeroderma pigmentosum (XP) und Cockayne Syndrom (CS) verantwortlich, Krankheiten in denen die Patienten bei geringster Sonneneinstrahlung schwere Schädigung der Haut erleiden und für Hautkrebs prädisponiert sind.

NER besteht aus vier Schritten: 1) Erkennung von DNA-Schäden, 2) XPA-Protein und weitere Proteine des Komplexes binden sich an die DNA, der Strang wird beiderseits des Schadens geschnitten und es entsteht eine Lücke von 24-32 Nucleotiden, 3) die DNA-Polymerasen schließen die Lücke, 4) Ligation. Die an diesem Mechanismus beteiligten Enzyme werden in der Tabelle 2 dargestellt (Ura, 2002).

Mismatch-Reparatur (MMR) ist ein weiterer Prozess, der für die Erhaltung der genomischen Stabilität notwendig ist. Das System ist für die Korrektur von falsch eingebauten Nucleotiden verantwortlich und entfernt auch Mismatch-Basen in

Heteroduplex-Bereichen (Buermeyer *et al.*, 1999; Knippers, 2001). Die daran beteiligten Enzyme werden in der Tabelle 2 kurz zusammengefasst.

2.2.2 Reparatur von Strangbrüchen

Einzelstrang-Brüche werden in einer koordinierten gemeinschaftlichen Aktion von Poly-(ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP-1), AP-Lyase-Aktivität der Polymerase β und assoziierten Proteinen (SSB-single strand binding bei Bakterien, RPA-Replication Protein A bei Eukaryonten) wieder ligiert (Jeggo, 1998; Shall *et al.*, 2000; de Murcia *et al.*, 1994).

Die Induktion von Doppelstrang-Brüchen (DSB) der DNA aufgrund einer Exposition mit schädigenden Wirkstoffen oder als Zustand in den normalen zellulären Prozessen stellt eine Bedrohung für die Vollständigkeit des Genoms dar. Wenn es nicht richtig repariert wird, können DSB chromosomale Abweichungen ergeben, die zum Zelltod oder zu ungesteuertem Zellwachstum führen können. Um die Vollständigkeit des Genoms zu sichern, haben sich mehrere Wege für die Reparatur von DSB während der Evolution entwickelt: Homologe Rekombination (HR), nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung (non-homologous End-joining NHEJ) und Einzelstrang-Annealing (single-strand annealing SSA). Bei Hefen werden DSB zuerst via HR repariert, während bei Eukaryoten beide Mechanismen wichtig sind. HR führt zu einer genauen Reparatur von DSB, während NHEJ und SSA im Wesentlichen mutagen sind (van den Bosch, *et al.*, 2002). Die Rekombination tritt dann auf, wenn Strangbrüche, DNA-Enden oder Einzelstrang-Regionen vorhanden sind. Bei Bakterien wurden zuerst rekombinationsdefekte Mutanten isoliert (*rec A*, *B*, *C*), später wurden die verantwortlichen Gen-Produkte RecA-Protein und RecB-Protein genannt.

Hefezellen verwenden auch die Rekombination als Reparaturmechanismus für Doppelstrang-Brüche. In der Tat sind Hefemutanten empfindlicher auf ionisierende Strahlen als Wildtyp-Hefe. Die Mutanten haben die Bezeichnung *Rad* bekommen (für: *radiation*). Die von den verantwortlichen Genen kodierten Proteine Rad51 und Rad52 wurden ausführlicher untersucht. Protein Rad51 gleicht dem RecA -Protein von *E. coli*: es bindet ATP-abhängig an Einzelstrang-DNA und es erfolgt die Anlagerung von homologen Sequenzen zu Doppelstrang-DNA. Bei den Eukaryonten ist die Aktivität des Proteins Rad51 von dem eukaryontischen Einzelstrang-Bindeprotein RPA und dem

Rad52 abhängig (Norbury *et al.*, 2001). Die Proteine, die daran beteiligt sind, können aus der Tabelle 3 entnommen werden.

2.3 DNA Instabilität und Tumorentstehung

Unter Krebs versteht man eine unkontrollierte Zellvermehrung in vielzelligen Organismen. Dazu gehören die ungeordnete Vermehrung von Zellen im Verband eines Gewebes, ihr Eindringen in dessen Umgebung sowie die Verbreitung von Krebszellen an anderen Stellen des Körpers und die Ausbildung von Metastasen. Als Tumor (lat. Schwellung) bezeichnet man eine (zunächst) gewebbegrenzte Zellvermehrung.

Schon vor fast 100 Jahren wurde behauptet, dass die genomische Instabilität eine Rolle in der Tumorentstehung spielen würde. 1914 hat Theodor Boveri postuliert, dass Tumorzellen aneuploid sind. Es wird angenommen, dass bei erhöhter genomischer Instabilität eine geringere Anzahl von DNA-Mutationen von einzelnen Genen zur Tumorentstehung führen kann (Marx, 2002). Man vermutet, dass meist fünf bis sechs menschliche Gene durch Mutationen verändert sein müssen, um den Phänotyp einer Krebszelle auszubilden. Das wäre eine Erklärung dafür, warum die meisten Krebserkrankungen erst in höherem Lebensalter auftreten. Es wird angenommen, dass die meisten Tumoren durch Akkumulation von inaktivierten Genen, Aktivierung von Onkogenen oder Ausfall von Tumor-Suppressorgenen ausgelöst werden.

Onkogene wurden von verschiedenen Autoren unterschiedlich definiert. Sie sind essentiell für die Entstehung, das Wachstum und die Metastasierung eines Tumors.

Tumor-Suppressorgene kodieren Proteine, deren normale Funktion eine negative Kontrolle des Zellzyklus ist. Bekannte Beispiele sind das Rb-Protein (retinoblastom), Protein p53 und p16^{INK4A}. Vogelstein *et al.* (1994) und andere Arbeitsgruppen haben bewiesen, dass die Mutation von Onkogenen und Tumor-Suppressorgenen, die in der Mismatch-Reparatur involviert sind, für die Entstehung von HNPCC (hereditäres nicht-polyposes Kolonkarzinom) verantwortlich sind. Bei HNPCC -Patienten sind Mutationen in den MSH2 (MutS-Homolog) und MLH1 (MutL-Homolog)- kodierenden Genen nachgewiesen worden. Die Reparaturfunktionen fallen aus und die Zelle bleibt für weitere Mutationen anfällig. Defekte in der DNA-Reparatur wurden auch im Fall von Brustkrebs und einigen Formen von Hautkrebs beschrieben (Marx, 2002; Al-Taie, *et al.*, 2001).

Diese Reparaturdefekte führen zu Veränderungen vor allem der Anzahl repetitiver DNA-Sequenzen, in sogenannten Mikrosatelliten (z. B. Mono- oder Dinucleotid-Repeats). Variierende Anzahl von Repeat-Strukturen, Insertionen und Basenfehlpaarungen in den Mikrosatelliten der Tumor-DNA werden heute als Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bezeichnet. Die entsprechenden DNA Bereiche werden einerseits als Diagnosticum der MSI genutzt. Andererseits können sie funktionelle Auswirkungen haben, wenn sie in regulatorischen Bereichen der DNA lokalisiert sind.

2.4 DNA Instabilität, Aging und degenerative Erkrankungen

Der Prozess des Alterns ist ein universaler biologischer Prozess, der in verschiedenen Modellen und Tierversuchen sowie in humanen Studien intensiv untersucht wurde. Denham Harman war der erste, der 1956 behauptete, dass freie Radikale eine wesentliche Rolle bei der Alterung spielen. "Die freien Radikale, als Endprodukte des oxidativen Geschehens, werden während des Lebens akkumuliert und können durch den antioxidativen Schutz nicht beseitigt werden. Die Funktion des biologischen Systems wird dadurch so schwerwiegend beeinflusst, dass dieses immer schlechter funktioniert und letztendlich stirbt." Gemäss Harmans Theorie (1972, 1983) sind Mitochondrien Haupt-Produktionsort von freien Radikalen. In den letzten Jahren haben viele Studien bewiesen, dass das Ausmaß der Produktion von freien Radikalen in Mitochondrien mit dem Alter steigt und die Effizienz des Abbaus von Biomolekülen mit oxidativen Veränderungen sinkt (Sohal *et al.*, 1994; Grune *et al.* 1997, 2000, 2002). Dieses Konzept wurde vor kurzem durch eine auf extensiver Gen-Array-Analyse basierende Studie herausgefordert; diese zeigte, dass Fehler in der Mitose und im Arachidosäurestoffwechsel, die wichtigen Ursachen für den Alterungsprozess darstellen (Danith Ly, 2000). Aus diesen Gründen wurde bei vielen Untersuchungen getestet, ob die Senkung der Produktion freier Radikale bzw. die Steigerung von endogenen Antioxidantien oder Reparaturmechanismen Alterungsprozesse hemmt oder aufheben kann. Genetische Mutationen und Manipulationen, die den Widerstand gegen oxidativen Stress verbessern, haben eine Verlängerung der Lebensdauer zur Folge. Die Zugabe von Superoxid-Dismutase (SOD) und Katalase in *Caenorhabditis elegans* (Fadenwürmer) Wildtyp führt zu einer Erhöhung der Lebensdauer von 44 % und die Behandlung von frühzeitig alternden Würmern zu einer Normalisierung der

Lebensdauer (Melov, 2000; Larsen, 1993; Vanfleteren, 1993; Orr *et al.*, 1994; Parkes, 1998; Sun *et al.*, 1999; Migliaccio *et al.*, 1999). Es wurde auch beschrieben, dass die Überexpression von SOD1 in Motoneuronen von *Drosophila* die Lebensdauer bis zu 40% verlängern kann (Parkes *et al.*, 1998). Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob die Einnahme von Antioxidantien die Alterungsprozesse beeinflussen kann. Die Supplementation der Nahrung mit Antioxidantien hatte jedoch nur einen begrenzten Einfluß auf die Verlängerung des Lebens (Harrington *et al.*, 1988). Eine Protein oder Energie restringierte Nahrung bei verschiedenen Tierarten (ca. 60-70 % des Normalverbrauchs) führte nach einigen Studien zu einer Verlängerung der Lebenserwartung um ca. 30-50 % (Grune, 2002). Im Alterungsprozess scheint die Reduktion des Metabolismus, des Proteinturnovers eine wesentliche Rolle zu spielen. Akkumulation von gesundheitsgefährdenden Produkten führt zu Fehlern in Replikation, Transkription und Translation der DNA und kann selbst eine toxische Wirkung bei z.B. der Alzheimerischen Krankheit oder der Parkinsonschen Krankheit haben. Defekte in der Nucleotid-Exzisions-Reparatur, in der Mismatch-Reparatur oder in anderen DNA-Reparatur-Systemen können nicht nur mit Tumorentstehung einhergehen, sondern auch mit beschleunigter Alterung und dem Auftreten degenerativer Erkrankungen wie Osteoporose.

Die menschlichen Krankheitsmodelle der Progerie (vorzeitige Alterung) wie das Werner-Syndrom (WS), das Bloom Syndrom (BS) und das Rothmund-Thompson Syndrom (RTS), bei denen auch Defekte von Mitgliedern der RecQ-Helikasen-Familie zu beobachten sind, zeigen ebenfalls einen Phänotyp, der durch Osteoporose, Atherosklerose und Tumorentwicklung charakterisiert ist (Mohaghegh *et al.*, 2002). Symptome von Progerie-Syndromen wurden ebenfalls bei Mäusen mit Mutationen der XPA und XPD-Gene (helikasenkodierende Gene) beobachtet (de Boer J *et al.*, 2002).

3 Antioxidative Systeme

In unserem Organismus muss die endogene Bildung freier Radikale und anderer Oxidantien als normal angesehen werden. Zusätzlich leidet unser Organismus unter dem Einfluß von exogenen Radikal- und Oxidantienquellen, sowohl in chemischer (Nahrungsbestandteile, Umwelttoxine, Medikamente) als auch in physikalischer Form (UV-Strahlung, ionisierende Strahlung). Die Anpassung an ein Leben in der

Sauerstoffatmosphäre hat ein antioxidatives Schutzsystem herausgebildet, das in vielfältiger Weise die schädliche Wirkung von Oxidantien verhindert.

Dieses antioxidative Schutzsystem besteht aus einem primären und einem sekundären Zweig.

Der primäre Zweig dieses Systems besteht aus den Antioxidantien im eigentlichen Sinn und ist darauf ausgerichtet, die schädigende Wirkung von Oxidantien zu verhindern. Dies bedeutet, dass er einmal gebildete Oxidantien neutralisiert, bevor es zu einer Wechselwirkung mit essenziellen zellulären Komponenten kommt.

Als Komponenten dieses primären antioxidativen Schutzes unterscheidet man die endogenen enzymatischen und die sogenannten niedermolekularen Antioxidantien. Zu den enzymatischen Bestandteilen gehört das Superoxiddismutase-/Katalase-System. Niedermolekulare Antioxidantien sind Stoffe, die chemisch mit Radikalen oder Oxidantien reagieren, deren Reaktivität absorbieren und sich dabei oft selbst verbrauchen. Nicht-enzymatische Antioxidantien sind Bilirubin, β -Carotin, Ascorbat (Vitamin C), Vitamin E, Glutathion und Urat (Hathcock, 1997). Der wichtigste Vertreter des Vitamin E für den Menschen ist α -Tocopherol, welches Lipidperoxidradikale reduziert. Vitamin E kann zumindest teilweise einen selenmangelbedingten Verlust der Glutathionperoxidase-Aktivität ausgleichen (Heslop *et al.*, 1996; Grune, 2002).

Der sekundäre Zweig hat das Ziel, oxidierte, nicht mehr funktionierende Bestandteile der Zelle zu reparieren und falls nicht mehr reparabel, abzubauen und durch neue Zellbestandteile zu ersetzen. Hierzu gehören u.a. die bekannten DNA-Reparaturprozesse, der intrazelluläre Proteinabbau und die Neusynthese von Membranbestandteilen. Teile des sekundären Zweiges haben auch die Funktion, den primären Schutz zu stärken und verbrauchte Komponenten wieder bereitzustellen.

Wenn ein Ungleichgewicht zugunsten reaktiver Sauerstoffverbindungen gegenüber Antioxidantien herrscht, wird der Zustand als oxidativer Stress bezeichnet. Reaktive Sauerstoffverbindungen entstehen bereits unter basalen Bedingungen im aeroben Stoffwechsel und führen potentiell zu Zellschädigungen. Entstandene Radikale werden im Organismus von verschiedenen zellulären antioxidativen Schutzmechanismen abgefangen und Schäden dadurch repariert (Sies 1993 und 1997).

3.1 Reaktive Sauerstoff-Spezies

3.1.1 Einzel-Substanzen

Reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) werden durch alle aeroben Organismen gebildet und abgebaut und führen entweder zu den physiologischen Konzentrationen, welche die normale Zellfunktion erfordert, oder zu übermäßigen Quantitäten. Wie die Bezeichnung ROS andeutet, bedroht intrazelluläre Produktion jener Sauerstoffintermediate (ROI) die Integrität der verschiedenen Biomoleküle einschließlich der Proteine, der Lipide sowie der Lipoproteine (die zur Atherosklerose führen) und der DNA (Stadtman *et al.*, 2000; Marnett, 2000; Ylä-Herttuala, 1999).

ROS schließen einige chemisch reaktive Moleküle ein, die vom Sauerstoff abgeleitet sind. Einige jener Moleküle sind wie das Hydroxylradikal ($\text{HO}\bullet$) äußerst aggressiv, während andere (Superoxid- und Wasserstoffperoxid) weniger aggressiv sind. Intrazelluläre freie Radikale, d.h., freie Moleküle mit niedriger Molekularmasse mit unpaaren Elektronen, sind oft ROS und umgekehrt, die zwei Bezeichnungen werden deshalb allgemein als Äquivalent verwendet. Freie Radikale und ROS können mit dem grössten Teil von Biomolekülen sogleich reagieren, was oft eine Kettenreaktion der ROS-Bildung auslöst. Um diese Kettenreaktion aufzuhalten, muss entweder ein kürzlich geformtes Radikal mit einem anderen freien Radikal reagieren, dadurch werden unpaare Elektronen beseitigt, oder ein Radikalfänger muß ins Spiel treten (Nordberg *et al.*, 2001; Fridovich, 1999; Betteridge, 2000; Halliwell, 1996, 1999). Bei der Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser können das Superanion-Radikal ($\text{O}_2\bullet^-$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder das Hydroxylradikal ($\text{HO}\bullet$) entstehen.

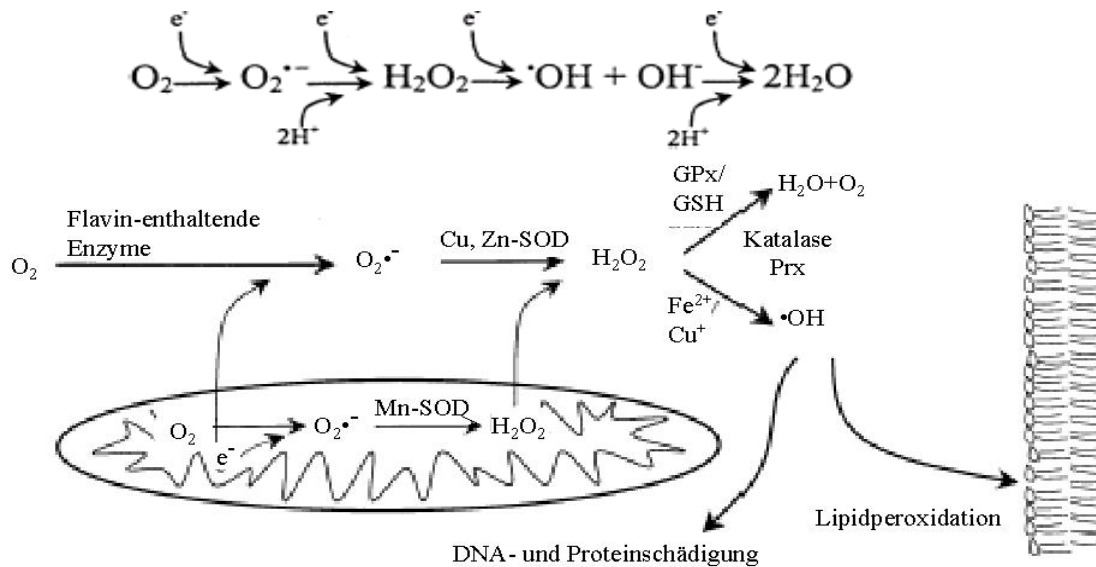


Abb. 3) Schrittweiser Abbau des molekularen Sauerstoffes durch Aufnahme von Elektronen und die Entstehung von ROS Molekülen (modifiziert nach Nordberg *et al.*, 2001). Abkürzungen: Prx: Peroxidase, GPx: Glutathionperoxidase, GSH: Glutathion, Mn-SOD: Mangan-Superoxiddismutase, Cu, Zn-SOD: Kupfer, Zink-Superoxiddismutase.

Weitere relevante reaktive Sauerstoffverbindungen sind das Stickstoffmonoxidradikal ($NO\cdot$), Alkyl- ($RO\cdot$) oder Peroxyl-Radikale ($ROO\cdot$) und $ClOH$. Der schrittweise Abbau des molekularen Sauerstoffes durch Aufnahme von Elektronen und die Entstehung von ROS Molekülen kann wie oben gezeigt zusammengefasst werden (Abbildung 3).

3.1.2 Oxidative Schädigung versus Redox-sensitive Signaltransduktion

ROS können die Konformation und/oder die Aktivitäten aller sulfhydrylhaltigen Moleküle, wie z.B. Proteine oder Glutathion (GSH), durch Oxidation ihrer Thiolalkoholhälfte direkt beeinflussen. Diese Art der Redox-Regulierung beeinflusst viele Proteine, die in Signaltransduktion und Karzinogenese wichtig sind wie z.B. Proteinkinase C, Ca^{2+} -ATPase, Kollagenase und Tyrosinkinasen (Dalton *et al.*, 1999). Für einige Transkriptionsfaktoren wirken ROS wie physiologische Vermittler der Transkriptionsteuerung (Arrigo *et al.*, 1999; Dalton *et al.*, 1999; Morel *et al.*, 1999; Sen *et al.*, 1996; Allen *et al.*, 2000). Weithin bekannte Beispiele redoxsensitiver

Transkriptionsfaktoren sind Nuklear Faktor- κ B (NF- κ B) und Aktivator Protein-1 (AP-1) (Marshall *et al.*, 2000). Im Fall von AP-1, einem Dimer der Genprodukte von Jun- und Fos-Proteinen, wird die Expression durch einige Pro-Oxidationsbedingungen (Timblin *et al.*, 1998), einschließlich der unterschiedlichen Arten der Bestrahlung (Weichselbaum *et al.*, 1994) induziert. Jedoch kann die Aktivität von AP-1 posttranslational reguliert werden. So erhöht sich die DNA-Bindung von AP-1 nach Reduktion der kritischen Cysteinreste und verringert sich, wenn jene Reste oxidiert werden (Abate *et al.*, 1990). Durch Hinzufügung von Antioxidantien oder Mutation der kritischen Cysteinreste zu Serin, steigt die DNA-Bindung von AP-1, während sie sich andererseits nach Hinzufügung der Oxidantien verringert. Die Erhöhung der Aktivität nach der Mutation kritischer Cysteine zu Serin in Jun oder Fos (Abate *et al.*, 1990), sowie nach Antioxidantienbehandlung deutet auf eine Konformationsänderung mit erhöhter Aktivität im reduzierten Zustand hin. Ein ähnlicher Mechanismus wurde in der Regulation der Apoptose Signalregulierenden Kinase 1 (ASK1) durch menschliches Trx (Saitoh *et al.*, 1998) gefunden. Regulation der AP-1-DNA-Bindung wird weiter von Ref-1 vermittelt, ursprünglich als Endonuclease charakterisiert. Ref-1 erhöht die DNA-Bindung von AP-1 zusammen mit reduziertem Thioredoxin (Hirota *et al.*, 1997). AP-1 Bindungsstellen befinden sich in den Promoterregionen vieler Gene, wie z.B. der Kollagenase, von Zytokinen (IL-3, IL-8, IL-9, TNF- α und IFN- γ), Adhäsionsmolekülen und in Promotoren von Faktoren, welche die Zellproliferation und Tumorentstehung beeinflussen (Dalton *et al.*, 1999; Morel *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 1997; Sen *et al.*, 1996, 1998; Schenk *et al.*, 1994).

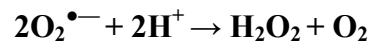
3.2 Antioxidative Schutzmechanismen

Antioxidative Schutzsysteme sind solche, die hochreaktive Sauerstoff-Spezies neutralisieren können. Eine Reihe von selenabhängigen und nicht-selenabhängigen Enzymen ist dazu in der Lage, ebenso Vitamine wie Vitamin E und C.

3.2.1 Superoxid-Dismutasen (SOD)

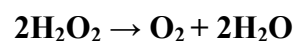
SOD waren die ersten entdeckten ROS-metabolisierenden Enzyme (McCord *et al.*, 1969). In eukaryontischen Zellen kann $O_2^{\bullet-}$ zum Wasserstoffperoxid durch zwei Metall-enhaltene-SOD Isoenzyme umgewandelt werden; eine 80 kDa tetramere Mangan-SOD,

die in den Mitochondrien vorhanden ist, und eine zytosolische 32 kDa dimere Cu/Zn-SOD. Bakterien enthalten Mn-SOD und Fe-SOD, und in einigen Fällen auch Cu, Zn-SOD (Yost *et al.*, 1973; Fridovich, 1997). 1982 wurde ein drittes Mitglied dieser Familie entdeckt. Das Enzym existiert als Homotetramer mit einem Molekulargewicht von 135 kDa mit hoher Affinität für Heparin (Marklund, 1982). SOD3 wurde zuerst im menschlichen Plasma, in der Lymphe, in der Aszitisflüssigkeit und in der Zerebrospinalflüssigkeit beschrieben (Marklund *et al.*, 1982; 1986). Die Expression von SOD3 hängt von der Art der Zellen und des Gewebes ab und kann in einigen höher exprimiert werden als SOD1 und SOD2 (Zelko *et al.*, 2002). In der Reaktion, die von SOD katalysiert wird, bilden zwei Moleküle Superoxid Wasserstoffperoxid und molekularen Sauerstoff und sind dadurch eine Quelle des zellulären Wasserstoffperoxids.



3.2.2 Katalasen

Katalasen vieler Organismen sind "Häm"-enthaltende Enzyme (Aebi, 1974). Die überwiegende subzelluläre Lokalisation in Säugetier-Zellen ist in den Peroxisomen, wo die Katalase die Umwandlung des Wasserstoffperoxids zu Wasser und molekularem Sauerstoff katalysiert.



Die Katalase entgiftet auch andere Substrate, wie z.B. Phenole und Alkohole, gleichzeitig mit der Reduktion von Wasserstoffperoxid (Fridovich, 1999; Halliwell, 1999).

3.2.3 Selenoenzyme

3.2.3.1 Selen als Spurenelement

1817 wurde das essentielle Spurenelement Selen durch Berzelius entdeckt. 1935 wurde die toxische Wirkung des Selens beschrieben, die Aufnahme von >800 µg pro Tag führt im Menschen zu chronischen Vergiftungserscheinungen (Franke *et al.*, 1935; Yang *et al.*, 1989). Biologisch verfügbare Formen sind Na₂SeO₃ und Na₂SeO₄, wobei Selenat im Körper schnell zur stabilen Selenitform reduziert wird. Freie Selenverbindungen, auch

in Form der Salze, kommen in der Natur kaum vor und spielen eine untergeordnete Rolle für die Ernährung. Die Hauptquelle für Selen sind tierische Proteine, die Selenocystein, die 21. proteinogene Aminosäure, und Selenomethionin enthalten. Die Resorption von Selenverbindungen im Körper ist noch nicht vollständig untersucht. Die Selenaufnahme ist abhängig von der nutritiven Zufuhr und wird nicht über die Resorption kontrolliert. Vorwiegend in Form der Aminosäure Selenomethionin wird Selen aus pflanzlichen Nahrungsquellen im Duodenum in Proteinform aufgenommen. Erst nach vollständigem Abbau von Selenomethionin, vermutlich zu Se oder H₂Se, wird Selen wieder bioverfügbar gemacht, stellt also keine akut verfügbare Selenform dar. Selenit, das dem Sulfat chemisch ähnlich ist, wird im Gastrointestinaltrakt wohl über dessen Transportprotein, den vor kurzem klonierten Natriumsulfat-Cotransporter, in der intestinalen Mukosa resorbiert. Für Selenat soll es ein separates aktives Aufnahmesystem geben. Vitamin C in normaler Dosierung erhöht die Selenaufnahme, "Megadosen" von Vitamin C (1 g oder mehr) hemmen diese. Nach der Resorption organifiziert die Leber Selen und sezerniert ein selenreiches Protein (SeP) ins Plasma. Es ist unklar, ob alle Zellen des Körpers Selenverbindungen aufnehmen und verwerten können. Der Körperbestand an Selen liegt bei 10-15 mg, wobei kaum freie Selenverbindungen intra- und extrazellulär vorkommen, sondern proteingebundene Formen vorherrschen. Die Verteilung im Körper ist nicht gleichförmig. Endokrine Organe, Gonaden sowie Gehirn, Thrombozyten und rote Muskeln weisen den höchsten Selengehalt auf (Köhrle, 2002) .

3.2.3.2 Selenocystein

Selen kann in Proteinen kovalent gebunden als Selenomethionin oder Selenocystein vorliegen.

Selenocystein ist als 21. Aminosäure bezeichnet worden. Diese seltene Extra-Aminosäure verlangt ein eigenes Codon, das nur im Kontext eines offenen Leserasters und nur für eine spezielle tRNA gilt.

Das mRNA-Codon, das für den Einbau von Selenocystein verantwortlich ist, entspricht dem Stop-Codon UGA. Das ist möglich, weil die Struktur der SeCys-spezifischen tRNA in mancher Hinsicht von der einer typischen tRNA abweicht. Diese tRNA wird zunächst von einer spezifischen tRNA-Synthetase mit Serin beladen. In einer Serie von

Reaktionen wird dann die OH-Gruppe des Serins durch eine Selenol-Gruppe ersetzt. In dieser Form und unter Mitwirkung eines speziellen Translationsfaktors wird die Selenocysteyl-tRNA an das Ribosom dirigiert und dort, wo im Leseraster der mRNA das Codon UGA vorkommt, in die wachsende Polypeptid-Kette eingebaut (Knippers, 2001).

Das UGA-Codon wird mit einer Sekundärstruktur im 3'-untranslatierten Bereich (3'UTR) der mRNA, dem sogenannten SECIS-Element (selenocysteine insertion sequence), für die Insertion von Selenocystein verwendet, es kommt nicht zum Kettenabbruch. Damit UGA bei den Eukaryonten Selenocystein decodiert gibt es noch andere Faktoren, die notwendig sind: SBP2 (SECIS-binding protein 2) und EFsec (Sec-spezifischer Elongation-Faktor auch Sel B genannt) (Hatfield *et al.*, 2002). Bei Prokaryonten liegt das SECIS-Element meist direkt im Anschluss an das UGA-Codon, bei Eukaryonten befindet es sich zwischen 500 und 5300 bp in der untranslatierten Region (UTR) der mRNA (Berry *et al.*, 1991; Heider *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1996; Walczak *et al.*, 1996). In Prokaryonten wird zunächst eine spezielle tRNA^{Sec}, das Genprodukt des selC-Gens, mit Serin beladen, welches anschließend durch die Selenocystein-Synthase (SelA) katalytisch zum Selenocystein umgewandelt wird (Leinfelder *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1990). Selenophosphat dient als Selen-Donor, welches durch die Selenophosphat-Synthase (SelD) aus Selenid und ATP synthetisiert wird. Das translatierende Ribosom wird von dem Elongationsfaktor SelB, dessen N-Terminus homolog zu dem Transkriptionsfaktor EF-Tu ist, mit der Selenocysteyl-tRNA^{Sec} beliefert (Forchhammer *et al.*, 1989 und 1990). Kürzlich wurde ein RNA-Bindungsprotein beschrieben, welches essentiell für die Translation von Selenoproteinen in Säugern ist und die Termination am UGA-Codon verhindern kann (Copeland *et al.*, 2000).

Es wurden in den vergangenen Jahren neben SelD eine Reihe eukaryontischer Selenoproteine identifiziert. Bei Selenoenzymen liegt Selenocystein jeweils im aktiven Zentrum vor und ist maßgeblich an der Katalyse von Redox-Reaktionen beteiligt (Heider *et al.*, 1993; Stadtman, 1996). Der Einbau von Selenocystein ist in Abbildung 4 dargestellt.

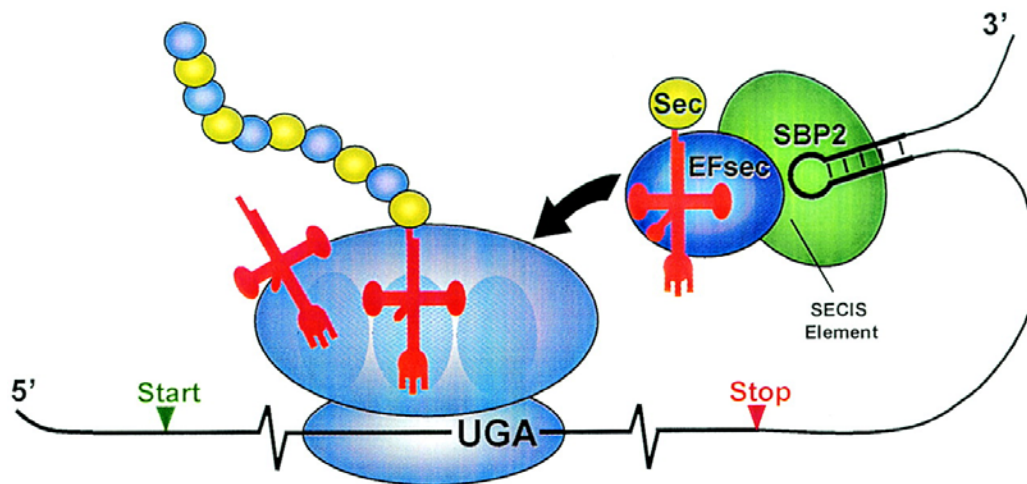


Abb. 4) Mechanismus des Einbaus von Selenocystein in Selenoproteinen (nach Hatfield *et al.*, 2002)

3.2.3.3 Selenoproteine

Die Selen-enhaltenden Proteine können drei verschiedenen Gruppen zugeteilt werden: Proteine die unspezifische Selenverbindungen enthalten, spezifische Selenverbindungen und Selenocystein enthaltende Proteine. Die letztgenannten Proteine werden als Selenoproteine bezeichnet und in dieser Arbeit behandelt.

Zu den Selenocystein enthaltenden Selenoproteinen, bei denen die Funktionen schon bekannt sind, zählen die Glutathionperoxidasen, Deiodasen, die Thioredoxin Reduktasen und Seleno-phosphat synthetase 2 (Behne, *et al.*, 2001).

3.2.3.3.1 Glutathionperoxidasen

Vier genetisch unterschiedliche antioxidative Schutzenzyme, die H_2O_2 und andere Hydroperoxide unter Oxidation von Glutathion zu H_2O oder zum Alkohol umsetzen, gehören zur Familie der Glutathionperoxidasen (Nordberg *et al.*, 2001). Es gibt Autoren, die noch ein fünftes Enzym beschrieben haben, das gewebespezifisch exprimiert und nur in Spermiennuclei vorhanden ist (Behne *et al.*, 2001). Die zytosolische Glutathionperoxidase (cGPx) wurde als erstes eukaryontisches Selenoprotein beschrieben und von Flohé *et al.* 1973 identifiziert. Es handelt sich um ein homotetrameres Protein mit einem Molekulargewicht von jeweils 22000 und einem Selenocysteinrest pro Untereinheit, das in den meisten untersuchten Geweben gefunden

wird; eine hohe Expression wurde in Erythrozyten, in Niere und Leber beschrieben (Mills, 1959; Rotruck *et al.*, 1973; Sunde, 1994; Dreher *et al.*, 1997a; Behne, 2001).

Im Plasma existiert eine glykosylierte Isoform, die Plasma-Glutathionperoxidase (pGPx), ein homotetrameres Protein aus 23 kDa Untereinheiten, die je einen Selenocysteinrest tragen. Sie reduziert H_2O_2 oder reaktive Sauerstoffverbindungen, die durch phagozytierende Zellen oder Endothelzellen sezerniert werden. Die pGPx wird vor allem von proximalen Nieren-Tubuli sezerniert, eine Expression der mRNA wurde aber auch in Mamma, Herz, Plazenta und Lunge von Mensch und Nager nachgewiesen (Avissar *et al.*, 1994). Über die Expression in der Leber berichten verschiedene Arbeitsgruppen widersprüchliche Ergebnisse (Yoshimura *et al.*, 1991; Chu *et al.*, 1992b). Die gastrointestinale Glutathionperoxidase (GI-GPx) ist eine weitere zytosolische Isoform der Glutathionperoxidase-Familie. Das homotetramere Protein besteht aus 22 kDa Untereinheiten, die je einen Selenocysteinrest beinhalten. Beim Menschen wird die GI-GPx im Gastrointestinaltrakt und in der Leber exprimiert und reduziert dort Peroxide, die mit der Nahrung aufgenommen oder dort von Mikroorganismen produziert werden (Chu *et al.*, 1992a und 1995).

Die Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase (PHGPx) ist ein monomeres Enzym, das vor allem Phospholipid- und Cholesterin-Hydroperoxide umsetzt und so Biomembranen vor Peroxidation schützt (Ursini *et al.*, 1995; Maiorino *et al.*, 1990). Das Enzym wurde ursprünglich aus Schweine-Herz, später auch aus Leber und Gehirn, aus Ratten-Leber und Testis und aus humaner Plazenta aufgereinigt und kann sowohl membrangebunden als auch im Zytosol vorliegen (Maiorino *et al.*, 1982 und 1990; Ursini *et al.*, 1985). Der PHGPx wird eine Rolle in der Spermatogenese zugesprochen, es besteht eine direkte Korrelation zwischen Selenmangel und Infertilität (Maiorino *et al.*, 1998; Behne *et al.*, 1996).

Enzym/Protein	Abk.	kat. Reaktion	zell. Verteilung	Gen- lokus
Glutathion Peroxid.	GPx			
Zytosolisch	cGPx (1)	$H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow 2 H_2O + GSSG$	verschiedene Gewebe und Zellen, zytosolisch	3q11-q13.1
Plasma oder extrazellulär	pGPx (3)	$H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow 2 H_2O + GSSG$	Plasma, Niere, GI-Trakt, Schilddrüse; sezerniert	5q32
Gastrointestinal	GI-GPx (2)	$H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow 2 H_2O + GSSG$	GI-Trakt; zytosolisch	14q24.1
Phospholipidhydroperoxid	PH-GPx (4)	$ROOH + 2 GSH \rightarrow ROH + 2 GSSG + H_2O$	verschiedene Gewebe und Zellen, Testis; Zytosol und Zellwand, verschiedene Spleißformen	19p13.3
Deiodasen				
Typ I	5'DI	$T_4 \rightarrow T_3, rT_3 \rightarrow 3,3'-T_2$	Leber, Niere, Schilddrüse; andere Gewebe	1 p32-33
Typ II	5'DII	$T_4 \rightarrow T_3$	Gehirn, Hypophyse, Plazenta, braunes Fettgewebe	14q24.2-3
Typ III	5'DIII	$T_4 \rightarrow rT_3$	Gehirn, nicht in der adulten Leber, nicht in der Hypophyse und Schilddrüse	14q32
Thioredoxin Reduktasen	TrxR	$Trx-S_2 + NADPH + H^+ \rightarrow Trx-(SH)_2 + NADP^+$		
1	TrxR1		Leber, Niere, Herz, Knochen, zytosolisch	12q23-q24.1
2	TrxR2		mitochondrial, Testis	
3	TrxR3		Leber, Niere, Herz, mitochondrial	22q11.2
SeZF1,2		TrxR-ähnliche Funktion		
Trx und GSSG Red.	TGR	Trx und GSSG Reduktase		
Selenophosphat Synthetase	Sps2, selD2	Synthese von Selenophosphat	Testis	
? Funktion				
Selenoprotein P	SeP	Inaktivierung von Peroxinitrit, antioxidativer Schutz	Leber, verschiedene Gewebe, sezerniert	5q31
Selenoprotein W	SeW	?	verschiedene Gewebe	19q13.3
Prostata spezifisches Selenoprotein	PES	300 kDa Holoenzyme, 32 und 15 kDa Untereinheiten, Pi 4.5	Prostata	
p15		H_2O_2 Abbau, 32 kDa Holoenzyme	Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Prostata, Granulozyten, T-Zellen	1p31
p18		?	Leber, Milz, Gehirn, Niere	
kleine Selenoproteine		7 kDa, 5 kDa, 4 kDa, 3 kDa	Nebennieren, Gehirn, Nebenhoden, Hypophyse, Schilddrüse, Prostata, usw.	

Enzym/Protein	Abk.	kat. Reaktion	zell. Verteilung	Gen- lokus
SelN, SEPN1		Mutationen verursachen steif-Wirbelsäule Syndrom	Bauchspeicheldrüse, Eierstock, Prostata, Milz; ubiquitär?	1p35-36
Sel R, ist gleich SelX?		?, Redox-Aktivität?		
SelT		?, Redox-Aktivität?	ubiquitär?	
SelX		?	Bauchspeicheldrüse, Leber, Niere, Leukozyten; verschiedene Gewebe	16
SelY		?, verwandt 5'DII ?	innere Organe	
SelZ		?	Niere, Leber, Testis, Prostata; ubiquitär?	

Tab. 3) Selenoproteine und deren Lokalisation und Funktion (modifiziert nach Köhrle, *in press*). Abkürzungen: Glutathion Peroxid.: Glutathion peroxidasen, ? Funktion: unbekannte Funktion, Abk.-Abkürzung

3.2.3.3.2 Selenoprotein P

Selenoprotein P (SeP), ein stark glykosyliertes, Cystein- und Histidin-reiches Protein mit Heparin-Bindungseigenschaften, wurde aus Ratten- und humanem Plasma isoliert (Herrman *et al.*, 1977; Yang *et al.*, 1987; Motchnik *et al.*, 1989; Eberle *et al.*, 1993). Im offenen Leserahmen (ORF-open reading frame) der mRNA befinden sich zehn Opal-UGA-Codons, die mit Hilfe der zwei SECIS-Elemente im 3'-UTR für zehn Selenocysteine codieren. Die Funktion des 43 kDa SeP ist noch nicht gut geklärt, eine Selenspeicher- oder Transportfunktion wird diskutiert (Motsenbocker *et al.*, 1982) und eine sehr neue Arbeit behauptet, dass SeP eine Rolle bei der Selen-Versorgung spielt und als Selenspeicher dient. SeP knock-out Mäuse zeigten einen hohen Selengehalt in der Leber und im Serum, in anderen Geweben ist der Selengehalt reduziert (Schomburg *et al.*, 2003). SeP verhindert im Rattenmodell Lebernekrosen nach Paraquat- oder Diquat-Injektion, was auf eine oxidative Schutzfunktion des SeP schließen lässt (Burk *et al.*, 1980 und 1995). Ebenso verhindert SeP im humanen Plasma eine Oxidation durch Peroxinitrit (Arteel *et al.*, 1998).

3.2.3.3.3 Weitere Selenoproteine

Die Familie der Deiodasen besteht aus drei Isoenzymen, die das Schilddrüsenhormon L-Thyroxin (T4) und Derivate mit unterschiedlicher Substratpräferenz, Gewebeverteilung und Regulation umsetzen. Die Typ I 5'-Deiodase (5'-DI) wurde als zweites humanes

Selenoprotein identifiziert (Behne *et al.*, 1990,2001; Berry *et al.*, 1991) und katalysiert, wie auch die Typ II 5'-Deiodase (5'-DII), die Deiodierung von T4 zum aktiven 3,5,3'-Triiod-L-Thyronin (T3) (Behne *et al.*, 2001). Die Typ III 5-Deiodase (5-D) inaktiviert T4 und T3 (Köhrle, 1999). Ein weiteres Selenoprotein ist die oben bereits erwähnte Selenophosphat Synthetase.

Es gibt auch andere Selenoproteine wie Selenoprotein W, T, R, N, T₂, M, W₂, Pb, G-reich, BthD, ein 15-kDa Selenoprotein (Sep15), deren Funktionen noch unbekannt sind (Hatfield, *et al.*, 2002). Die Expression von Selenoprotein W, einem 10 kDa Muskelprotein, wird Selen-abhängig reguliert (Vendeland *et al.*, 1993; Yeh *et al.*, 1995). Aus menschlichen T-Zellen wurde ein weiteres bisher unbekanntes 15 kDa Selenoprotein isoliert, das auch in Schilddrüse und Nebenschilddrüse gefunden wurde (Gladyshev *et al.*, 1998). In Testis, Spermatozoen, Prostata, Pankreas und anderen Geweben wurden weitere Selenoproteine gefunden (Behne *et al.*, 1995, 2001; Kalcklösch *et al.*, 1995; Kyriakopoulos *et al.*, 1993). Die Selenoproteine werden in Tabelle 3 dargestellt.

3.2.4 Thioredoxin Reduktasen (TrxR)

Das System Thioredoxin (Trx)-/Thioredoxin-Reduktase ist ein ubiquitäres System, welches sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten untersucht wurde.

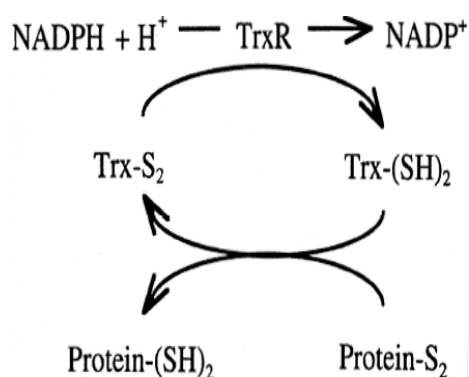


Abb. 5) Die Komponenten des Thioredoxin/Thioredoxin Reduktase-Systems (nach Arner *et al.*, 2000).

Die Komponenten des Systems sind Thioredoxin-Reduktase und ihr Substrat-Thioredoxin. Thioredoxin Reduktase gehört zur Gruppe der NADPH-abhängigen Disulfid-Oxidoreduktasen, die als prosthetische Gruppe ein FAD besitzen, wie die

Lipoamiddehydrogenase und Glutathion Reduktase. Es wird angenommen, dass NADPH das Flavin des Enzyms reduziert, die Elektronen werden anschließend auf das aktive Zentrum, das ein Selenocystein beinhaltet, übertragen. Die Reaktion wird in Abb. 5 dargestellt. Die TrxR1 reduziert Disulfidbindungen, die für die Faltung von Proteinen, Protein/Protein-Interaktionen und DNA/Protein-Interaktionen, wie die Ausbildung von Zinkfingerstrukturen, wichtig sind (Wu *et al.*, 1996).

Das Enzym trägt den Namen wegen seiner charakteristischen redoxaktiven Disulfid/Dithiol Eigenschaft an der Redoxregulation der Zelle. Oxidiertes Thioredoxin, das wichtigste Substrat der TrxR wird in einer NADPH-abhängigen Reaktion zu Trx-(SH)₂ reduziert.

Die Katalyse des Elektrontransfers von NADPH zu Thioredoxin, welche wiederum mit kritischen Komponenten des Zellmetabolismus verbunden ist, wie Ribonucleotid Reduktase, AP-1, NFκB, Transkriptionfaktoren, Vitamin K-Epoxid Reduktase, Thiolperoxidase und pGPx, erklärt die Vielfältigkeit von Prozessen, die von TrxR abhängig sind (Tamura *et al.*, 2002). Es gibt bis jetzt drei Isoformen von TrxR in Eukaryonten. Die zytosolische Thioredoxin Reduktase 1 (TrxR1 oder TrxRα) wurde 1995 von Gasdaska *et al.* aus humaner Plazenta kloniert und ein Jahr später aus T-Zellen und Adenokarzinom-Zellen als Selenoprotein identifiziert (Gladyshev *et al.*, 1996; Tamura *et al.*, 1995). Das Enzym setzt sich aus homodimeren 55 kDa Untereinheiten aus je 499 Aminosäuren zusammen, wobei sich jeweils an Position 498 ein Selenocystein befindet. Das Gen wurde auf Chromosom 12q23-q24.1 lokalisiert (Gasdaska *et al.*, 1996), die mRNA umfasst 3,8 kb. TrxR1 wird ubiquitär exprimiert und wurde als 1,25(OH)₂ Vitamin D₃-responsives Gen in Osteoblasten charakterisiert (Schütze *et al.*, 1998b). Substrate der TrxR1 sind außer Trx, das im folgenden Kapitel näher beschrieben wird, Proteindisulfidisomerase, natural killer cell lysin (NK-Lysin) und Ca²⁺-Bindungsproteine 1 und 2, aber auch kleine Substanzen wie Selenodiglutathion, Lipidhydroperoxide oder 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) werden reduziert (Andersson *et al.*, 1996; Arteel *et al.*, 1999; Gromer *et al.*, 1998a und 1998b; Holmgren *et al.*, 1996 und 1989; Lundstrom-Ljung *et al.*, 1995; Luthman *et al.*, 1982; Oblong *et al.*, 1993). Die Reduktion von Lipidhydroperoxiden und Hydrogenperoxiden spricht für eine Funktion von TrxR in der Entgiftung von Hydrogenperoxid. Es wurde in einigen Zellexperimenten beschrieben, dass H₂O₂

vorübergehend TrxR inaktiviert, möglicherweise durch Induktion von Selenylsulfid oder Oxidation des Secys-Restes (Norgberg *et al.*, 2001). Unter Selenmangel zeigt TrxR1 in Leber und Niere von Ratten verminderte Aktivität, wie für Selenoproteine typisch (Hill *et al.*, 1997). Osborne *et al.* haben 2001 alternative Spleißvarianten der TrxR1 in Ratten und Menschen beschrieben. Nach diesen Autoren gibt es verschiedene mRNA-Isoformen, die sich am 5'-Ende unterscheiden und putative Proteine verschiedenen Molekulargewichts kodieren. Nur die Isoformen I und II enthalten die beiden verschiedenen ATG (in Exon 1 und Exon 4). Bei den Isoformen III-VI ist nur Exon 4 enthalten, somit kein PCR-Produkt mit Primern im Exon 1 zu erwarten. Damit kann nur aus den Isoformen 1 und 2 ein grösseres Protein entstehen. Die Translation vom in Exon 4 befindlichen ATG führt zur ursprünglich beschriebenen TrxR1 (TrxR1-2ATG), während die Translation von dem ersten 5' gelegenen ATG (TrxR1-1ATG) ein 60 kDa-Protein als Produkt hat.

Es wurden zwei weitere Thioredoxin Reduktasen, TrxR3 oder TrxR β und TrxR2 aus Maus und Mensch kloniert (Gasdaska *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1999), die ebenfalls ein Selenocystein im aktiven Zentrum besitzen, das sich am C-Terminus der Polypeptidkette befindet. TrxR2 besitzt zur TrxR1 eine 70 %ige Identität, während TrxR3 und TrxR1 bzw. TrxR3 und TrxR2 eine 52 bis 53 %ige Identität aufweisen. Die mRNA der TrxR3 hat eine Länge von 2,4 kb und codiert für ein 56,5 kDa Protein aus 524 Aminosäuren. TrxR3 besitzt am N-Terminus eine putative mitochondriale Signalsequenz. Das Gen umfasst eine Region von etwa 65 kb auf Chromosom 22q11.2. TrxR3 ist ubiquitär in der Maus, vor allem aber in der Leber exprimiert, während sich die Expression von TrxR2 auf Testis beschränkt (Sun, *et al.*, 2002).

Thioredoxin Reduktase ist ubiquitär, bei den Prokaryonten wird das Enzym aber nicht als Selenoprotein beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wird die Thioredoxin Reduktase 1 als Vertreter der Thioredoxin Reduktasefamilie behandelt.

3.2.5 Thioredoxin

Das wichtigste Substrat der TrxR1 ist Trx, das ubiquitär und in hoher Konzentration exprimiert wird. Es wurde als Wachstumsfaktor von Lymphozyten identifiziert und erschwert die Apoptose von Zellen, was bei Überexpression in Tumorzellen einen

Wachstumsvorteil für diese Zellen darstellen kann (Baker *et al.*, 1997; Das *et al.*, 1999; Schenk *et al.*, 1996). Der Trx-Knockout ist bereits im frühen Embryonalstadium letal (Matsui *et al.*, 1996). Es wurden zwei Isoformen von Thioredoxin kloniert: Thioredoxin 1 (Trx1) und Thioredoxin 2 (Trx2). Das aus 104 Aminosäuren bestehende Thioredoxin 1 hat ein Molekulargewicht von 12 kDa; es enthält zwei katalytische Stellen, Cysteinreste –Trp-Cys³²-Gly-Pro-Cys³⁵-Lys, die in allen Thioredoxinproteinen vorhanden sind und als Wasserstoffdonor dienen können und zusätzlich noch drei Reste (Cys⁶², Cys⁶⁹ und Cys⁷³), die in Bakterien nicht zu finden sind. Trx1 wurde vorwiegend im Zytosol lokalisiert; es ist keine nucleäre Lokalisation bekannt, jedoch wurde im Kern verschiedener Tumorzelllinien Trx detektiert (Magenkarzinom). Nach H₂O₂- und PMA-Behandlung (phorbol 12-myristate, 13-acetate) oder UV-Bestrahlung konnte man eine Translokation des Thioredoxins vom Zytosol in den Zellkern beobachten. Der Mechanismus ist noch nicht bekannt, dafür verantwortlich sei unter anderen der Transkriptionsfaktor NF-κB.

Das Thioredoxin 2 wurde als mitochondrial beschrieben, hat ein Molekulargewicht von 18 kDa und besteht aus 166 Aminosäuren.

Thioredoxin 1 wird von verschiedenen Zellen sezerniert (z.B. Epstein-Barr Virus transformierten Zellen, Hepatoma-Zellen und normale Hepatozyten, Lymphozyten und Fibroblasten). Es hat verschiedene Funktionen wie bei der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, beim Wachstum und der Differenzierung, bei der Hemmung der Apoptose und dem Schutz vor oxidativem Stress (Powis *et al.*, 2000).

B. Fragestellung

Ist das Thioredoxin/Thioredoxin Reduktase-System in den Schutz und die Erhaltung der Stabilität der zellulären DNA involviert?

Das Enzymsystem Thioredoxin-Thioredoxin Reduktase ist aktiv bei der Proteinfaltung, der Ribonucleotidsynthese und der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Steroidhormonrezeptoren (Kortikoid-, Östrogen-Rezeptor), AP-1 und NFκB. Als Bestandteil der antioxidativen Systeme der Zelle und gleichzeitig der Ribonucleotid-Synthese bei Zellproliferation erfüllt das System alle Voraussetzungen, eine wichtige Rolle auch bei der DNA-Prozessierung im Rahmen von Zellteilung und DNA-Reparatur zu spielen.

Aufgrund der intramolekularen sterischen Anordnung der Domänen des Enzyms ist dieses in der Lage, sowohl Kleinmoleküle (Vitamin K), als auch größere Polypeptidketten in seine Bindungstasche aufzunehmen (z.B. NK-Lysin). War das Enzym selbst zunächst nur als zytosolisches Enzym beschrieben, so ist mittlerweile bekannt, dass es z.B. nach Phorbolster-Stimulation auch sezerniert werden kann. Zudem haben wir selbst und andere nachgewiesen, dass beide Komponenten des Systems auch im Zellkern präsent sind. Adäquate Stimuli für die Translokation von Trx sind z.B. UV-Licht und TNF-Signalling.

Die nucleäre Lokalisation des Thioredoxin-/Thioredoxin Reduktase Systems stellt die Grundlage für die Arbeitshypothese dar. So stellen sich folgende Fragen :

- A) Ist das System Trx/TrxR in den untersuchten Systemen im Kern lokalisiert? Gibt es dort eine Kolo-kalisation der beiden Komponenten?
- B) Kolo-kalisiert das Trx/TrxR-System mit der Topoisomerase I oder anderen DNA-prozessierenden Enzymen?
- C) Gibt es Beweise für regulatorische Mechanismen für nucleären Transfer von TrxR1 (z.B. verschiedene Lokalisationen von zwei Isoformen 1-ATG, 2-ATG)?
- D) Kann man in den Kernextrakten Interaktionsproteine finden, kann man diese durch "pull-down assay" isolieren und anschliessend identifizieren? Diese Partner sollen nach 2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF-Analyse (PD Dr. J. Adamski, GSF Neuherberg) identifiziert werden.
- E) Gibt es Einflüsse von Thioredoxin-Reduktase auf "in vitro Assays" für die DNA-Prozessierung? Es wird die Auswirkung des gereinigten Enzyms auf die Aktivität

von Topoisomerasen untersucht (gereinigte Topoisomerase I-Präparationen Prof. Dr. F. Boege, Würzburg).

C. Material und Methoden

1 Material

Plastikwaren wurden von Eppendorf, Falcon, Greiner und Sarstedt bezogen. Chemikalien wurden von Life Technologies, Merck, Roche Molecular Biochemicals, Roth oder Sigma bezogen und waren von p. A-Qualität.

Lösungen wurden je nach benötigter Reinheit mit deionisiertem Wasser, doppelt destilliertem deionisiertem Wasser (Bidest) oder mit sterilem, RNase-freiem Aqua ad injectabilia (Ampuva) von Boehringer-Ingelheim angesetzt.

1.1 Lösungen und Puffer

TE (10 mM Tris -HCl, 1 mM EDTA pH 8,0)

TBE (0,09 M Tris-Borat, 0,002 M EDTA)

PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, pH 7,4)

LB-Medium (pro Liter: 10 g Bacto-Trypton, 5g Bacto-Yeast Extract, 10g NaCl, pH 7,0).

Farbmarker für Agarosegele (Stop-Puffer) (5-fach konzentriert: 0,25 % Bromphenolblau (w/v), 0,25 % (Xylencyanol (w/v)), 30 % Glycerin (w /v), 1 mM EDTA).

1.2 Prokaryontische Zellen

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurden *E. coli* DH5 α (Genotyp: F-supE44 hsdR17 recA1 gyrA96 endA1 thi-1 relA1 deoR lambda-) und JM109 (Genotyp: F' traD36 proA+ proB+ lacIq Δ (lacZ)M15 Δ (lac-proAB) supE44 hsdR17 recA1 gyrA96 thi-1 endA1 relA1 e14- lambda-) verwendet.

1.3 Plasmide

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurden die Vektoren pGEM-T (Promega) und pCR2.1-TOPO (Invitrogen), zur Überexpression von cDNA in COS7-Zellen, HepG2, und hFOB die pEGFP-N1, pEGFP-C1 und pDsRed2-N1 (auch Invitrogen) verwendet .

1.4 Oligonucleotide

Einzelsträngige Oligonucleotide wurden von MWG bezogen. Folgende Oligonucleotide wurden für PCR und für Sequenzierungen eingesetzt:

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Position (bp)	Genbank-Nr.
FwTrxori(NcoI)	GCAGCCCACCATGGTGAAGCAG ATCGAG	2-28	AY004872
RevTrxBamHI	CATGGATCCACTAATTCATTAAT GGTG	307-333	AY004872
FwTrxE1	GCGAATTCGATGGTGAAGCAGAT CGAG	2-28	AY004872
RevTrxXbaI	GCTCTAGATTAGACTAATTCATT AATGGTG	307-337	AY004872
FwTrxR1 (1ATG)	CGAATTCGCTTCAGCATGTCATG TGAGGACGGTC	89-113	D88687
RevSTOPTrxR1	CTGGATCCCAGCAGCCAGCCTGG AG	1729-1753	D88687
FwTrxR1 (2ATG)	CGAATTCTACTAAAAATGAACGG CCCTG	424-445	D88687
RevSPTrxR1	GGTGGATCCCGTTTTAGTAGCTT	241-263	D88687
FwN1EGFP	GCTGGTTTTAGTGAACCGTCAGA	566-587	XXU19279
RwN1EGFP	CGTCGCCGTCACAGCTCGACCAG	724-745	XXU19279
FwC1EGFP	ACATGGTCCTGCTGGAGTTCG TG	1265-1287	CVU55763
RwC1EGFP	GTAAAACCTCTACAAATGTGG TATGG	1425-1450	CVU55763
M13Fw	CTGGCCGTCGTTTTAC	391-406	
M13Rw	CAGGAAACAGCTATGAC	205-221	
β Aktin1	TGACGGGGTCACCCACACTGTGC CCATCT	478-506	AB004047
β Aktin2	CTAGAAGCATTGCGGTGGACGAT GGAGG	1111-1138	AB004047
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	2984-3	
SP6	AAGATATCACAGTGGATTTA	124-143	

Tabelle 4) Oligonucleotide, die für RT-PCR und Sequenzierungen verwendet wurden.

1.5 Eukaryontische Zellen

1.5.1 COS7-Zellen

COS7-Zellen wurden aus der Niere der afrikanischen Affenart *Cercopithecus aethiops* etabliert. Es handelt sich hierbei um Fibroblast-ähnliche Zellen, die mit dem SV40-Virus T-Antigen stabil transformiert wurden (ATCC No. CRL-1651).

1.5.2 HepG2

HepG2 wurden aus dem Tumorgewebe (Leberzellkarzinom) eines 15-jährigen Argentiniers etabliert. Hierbei handelt es sich um Epithel-ähnliche Zellen (ATCC No. HB 8065).

1.5.3 hFOB

hFOB sind humane fetale Osteoblasten-Zellen und wurden von Tom Spelsberg (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Mayo Clinic, Rochester, MN 55905, USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

1.5.4 MG63

Hierbei handelt es sich um eine Osteoblasten-Zelllinie, die aus einem 14-jährigen kaukasischen Patienten mit Osteosarkom etabliert wurde. Die Zellen sind adhärent (ATCC No.CRL-1427) und exprimieren die Rezeptoren RI und RII für TGF- β .

1.5.5 T/C-28a2

T/C-28a2 wurden von Mary Goldring (NIH) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um humane immortalisierte Chondrozyten, die von den Rippen eines jungen Patienten etabliert wurden.

1.5.6 TERT4

TERT4 sind immortalisierte Stammzellen, die stabil transfiziert wurden, mit einem retroviralen Vektor, welcher das Gen für die katalytische Untereinheit von humaner Telomerase (hTERT) enthält. Die Zellen wurden freundlicherweise von Moustapha Kassem (Odense, Dänemark) zur Verfügung gestellt.

1.6 Computersoftware

Zum Erstellen von Tabellen wurde Microsoft Word verwendet. Die Bilder wurden in Microsoft-PowerPoint zusammengestellt. Statistische Berechnungen wurden mit SPSS 9.0 durchgeführt. Für densitometrische Auswertungen von Röntgenfilmen wurde das Programm Bioprofil (LTF; Wasserburg) verwendet.

2 Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Kulturbedingung und Passagierung

COS7-, HepG2-, MG63-, T/C-28a2-, hFOB-Zellen wurden zur Stammerhaltung in 75 oder 25 cm²-Gewebekulturflaschen in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM/NUT MIX F12(1:1), Life Technologies GmbH) bzw. DMEM/HAM'S F-12 mit L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH), versetzt mit 10 % FCS (Life Technologies GmbH), 2% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Für die TERT4-Zellen wurde Earle's MEM 1x mit L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH), versetzt mit 10 % FCS (Life Technologies GmbH), 2% Penicillin/Streptomycin verwendet. Wöchentlich wurden die Zellen unterschiedlich (COS7 1:30 bis 1:45; HepG2 1:5 bis 1:8; MG63 1:25 bis 1:40; T/C-28a2 1:25 bis 1:40; hFOB 1:6 bis 1:10; TERT4 1:10) gesplittet. Mediumwechsel erfolgte routinemäßig 2x wöchentlich. Alle Zellen wurden bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre (95 % Luft, 5 % CO₂) gehalten. Eine Ausnahme waren hFOB-Zellen, die bei 34°C kultiviert wurden.

2.2 Arbeiten mit Nucleinsäuren

2.2.1 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die zu bestimmenden Nucleinsäurelösung wurde 1:200, 1:100 oder 1:400 mit TE verdünnt und in Quartzküvetten gegen TE im Uvicoll-Photometer (Amersham Pharmacia Biotech) im entsprechenden DNA-oder RNA-Programm gemessen, das jeweils zur Ermittlung der Reinheit den Quotienten aus der Absorption bei 260 und 280 nm (liegt zwischen 1,6 und 2,0 je nach Reinheit der Nucleinsäuren) sowie die Menge durch Multiplikationen mit dem Faktor 50 (ds DNA) oder 40 (RNA) berechnet.

2.2.2 Arbeiten mit RNA

2.2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA aus Zellen wurde nach der Methode von Chomczynski P. und Sacchi N. (Analytical Biochemistry, 1987) präpariert. Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, in 1 ml pro 3,5 cm-Schale peqGOLD Trifast Reagenz geerntet und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette lysiert und dann in 1,5 ml Reaktionsgefäße übernommen. Die Proben wurden für 5 min bei RT stengelassen, um die Dissoziation

der Nucleotidkomplexe zu gewährleisten. Je eingesetztem ml peqGOLD Trifast wurden 0,2 ml Chloroform zugegeben und die Proben kräftig geschüttelt. Danach wurden die Proben 3-10 min bei RT stehengelassen und anschliessend für 5 min bei 12000 x g zentrifugiert. Dies führt zur Trennung der Probe in drei Phasen. Die RNA ist ausschliesslich in der oberen wässrigen Phase angereichert. Nach Abnahme des wässrigen Überstandes wurde die RNA mit 0,5 ml Isopropanol pro eingesetztem ml peqGOLD Trifast gefällt, für 5-15 min bei RT gelagert und im Anschluss für 10 min bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Isopropanolüberstand wurde dann 2x mit 75 %igem Ethanol durch Vortexen und anschließende Zentrifugation (10 min, 12000 x g, 4°C) gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in einem adequate Volumen Ampuva aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 Reverse Transkription von RNA

Gesamt-RNA aus Zellen wurde unter Verwendung von Oligo-dT (12-18mer) oder eines genspezifischen Primers revers transkribiert. Hierzu wurden zu 2 µg Gesamt-RNA 20 pmol Primer pipettiert und der Reaktionsansatz mit sterilem Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Nach 10 min Inkubation bei 70°C und anschließendem Abkühlen auf Eis wurden 4 µl 5xFirst Strand Buffer (Life Technologies GmbH), 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl Desoxyribonucleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Stammlösung jeweils 20 mM) zupipettiert. Die Reverse Transkription wurde durch Zugabe von 200 U Superscript Reverser Transkriptase (Life Technologies GmbH) gestartet und bei 42°C für 1 h inkubiert. Um das Enzym zu denaturieren wurde die Reaktion anschließend für 20 min auf 95°C erhitzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.3 Arbeiten mit DNA

2.2.3.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten (Mullis *et al.*, 1987) wurde Taq-Polymerase (Chien 1976, Amersham Pharmacia Biotech bzw. Qiagen) und ein Thermocycler von MWG Biotech verwendet. Ein PCR-Ansatz enthielt bis zu 100 ng Template-DNA, jeweils 25 pmol Primer, 2,5 mM MgCl₂, 5 µl 10-fach Puffer, je 0,2 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 3 U Taq-Polymerase in einem Volumen von 50 µl. Der Ansatz wurde zunächst für 300 s auf 94°C erhitzt, anschließend wurde die DNA in 15 bis 30 Zyklen der Abfolge (45s , 94°C; 45s 'T' °C; 45s, 72°C), einmalig 5 min, 72°C

amplifiziert und zur Analyse im Agarosegel aufgetrennt. Die Annealing-Temperatur 'T' wurde im allgemeinen 2-3°C unter der Schmelztemperatur des Primers gewählt. Zur Amplifikation von TrxR1 (beiden Spleißvarianten) wurde Herculase Enhanced DNA Polymerase von Stratagene verwendet. Ein PCR-Ansatz enthielt bis zu 250 ng DNA, jeweils 100 ng Primer, 5 µl 10x Puffer, je 1 µl (25mM) dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 5 U Herculase Polymerase in einem Volumen von 50 µl. Der Ansatz wurde zunächst für 180 s auf 98°C erhitzt, anschließend wurde die DNA in 25 bis 35 Zyklen der Abfolge (35s, 95°C; 30s 'T' °C; 120s, 72°C), einmalig 10 min, 72°C amplifiziert und zur Analyse im Agarosegel aufgetrennt. Die verwendeten Primerkombinationen, Annealingtemperaturen und Produktlängen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Gen	Primerkombination	Produktlänge	Annealing Temperatur
Trx1	FwTrxori(NcoI)- RevTrxBH1	480 bp	56°C
Trx1	FwTrxE1-RevTrxXbaI	480 bp	56°C
TrxR1 (1ATG)	FwhTrxR1(1ATG)- RevSTOPhTrxR ₁	1649 bp	63°C
TrxR1 (2ATG)	FwhTrxR1(2ATG)- RevSTOPhTrxR1	1493 bp	63°C
SP TrxR1	FwhTrxR1(1ATG)- RevSPhTrxR1	156 bp	56°C
β Aktin	β Aktin1-β Aktin2	660 bp	56°C

Tab. 5) Verwendete PCR-Primer, Primerkombinationen, Annealingtemperaturen und Produktlängen der amplifizierten Gene.

Für die Amplifikation der Thioredoxin cDNA wurde das TaqPlus System von Qiagen verwendet. Es wurden 1 µl der cDNA, jeweils 25 pmol der Primer, 5 µl 10 mM Deoxynucleotide und 2,5 U TaqPlus Polymerase zur Amplifikation in einem Volumen von 50 µl eingesetzt. Der Ansatz wurde für 3 min auf 94°C erhitzt und anschließend die DNA in 30 Zyklen der Abfolge (30s, 94°C; 30s, 56°C; 90s, 72°C), einmalig 5 min 72°C amplifiziert und zur Analyse im Agarosegel aufgetrennt.

2.2.3.2 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgte für 1-3 h bei 37°C. Pro µg DNA wurden ca. 2-3 U Enzym eingesetzt. Restriktionsenzyme mit entsprechendem 10-fach konzentriertem Reaktionspuffer wurden bei Gibco und New England Biolabs bezogen.

2.2.3.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Lösungen wurden mit dem entsprechenden Volumen 5-fach konzentriertem Stop-Puffer vermischt und in 0,8 bis 1,5% Agarosegelen, die Ethidiumbromid (10µg/ml) enthielten in Horizontal-Gelkammern (AGS) aufgetrennt. DNA-Fragmente wurden durch Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids unter UV-Bestrahlung sichtbar gemacht und mit einer Polaroid-Kamera fotografiert.

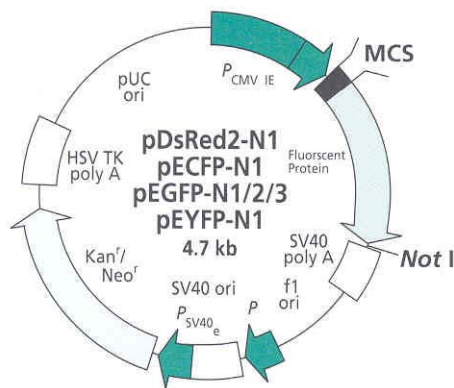
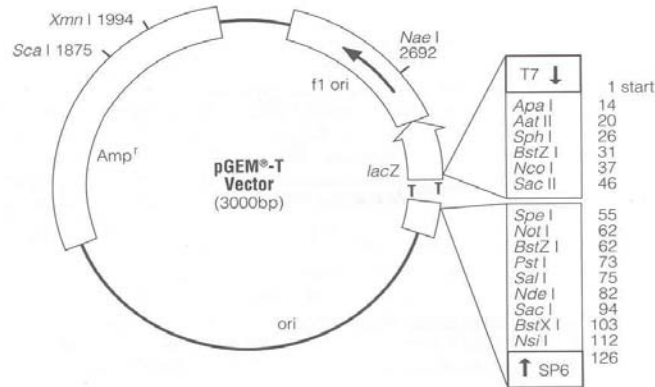
2.2.3.4 Elution von DNA-Fragmenten

DNA-Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des Nucleotrap-Kits (Macherey und Nagel) nach Angaben des Herstellers eluiert.

2.2.3.5 Klonierung von PCR-Produkten in die Klonierungsvektoren (pGEM, pCR2.1-TOPO) und in die Vektoren pEGFP-N1, pEGFP-C1 und pDsRed2-N1.

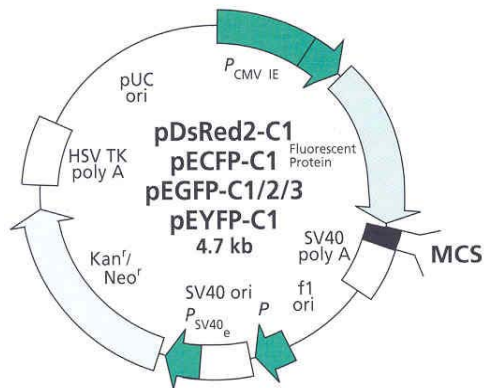
Die PCR-Produkte wurden in den pGEM und/oder in den pCR2.1-TOPO-Vektor kloniert.

Die Vektoren sind in Abbildung 6 dargestellt.



N1 MCS

G CTA GCG CTA CCG GAC TCA GAT CTC GAG CTC AAG CTT CGA ATT CTG CAG TCG ACG GTA CCG CGG GCC CGG GAT CCA CCG GTC GCC ACC ATG GTG
 Nhe I Eco47 III Bgl II Xho I Sac I Hind III EcoR I Pst I* Sal I Kpn I Apa I Xma I BamH I Age I**
 Ecl136 II Acc I Asp718 I Sac II Bsp120 I Sma I



C1 MCS

TAC AAG TCC GGA CTC AGA TCT CGA GCT CAA GCT TCG AAT TCT GCA GTC GAC GGT ACC GCG GGC CCG GGA TCC ACC GGA TCT AGA TAA CTG ATC A
 BspE1 I Bgl II Xho I Hind III EcoR I Pst I Sal I Kpn I Apa I BamH I Xba I Bcl I
 Sac I Ecl136 II Acc I Asp718 I Sac II Bsp120 I Xma I

Abb. 6) Karten der verwendeten Klonierungsvektoren und deren MCS (Multiple Cloning Site).

Nachdem die Sequenzen mit den publizierten Sequenzen verglichen worden sind, erfolgte die Klonierung in die Expressionvektoren (N1-EGFP, C1-EGFP und/oder pDsRed2N1). Die Schnittstellen werden in der Tabelle 6 dargestellt.

Gen	Vektor	Restriktionsstellen
Trx1	pEGFP-N1	EcoRI; BamHI
Trx1	pEGFP-C1	EcoRI; XbaI
Trx1	psDRed2-N1	EcoRI; BamHI
TrxR (1-ATG)	pEGFP-N1	EcoRI; BamHI
TrxR (2-ATG)	pEGFP-N1	EcoRI; BamHI
TrxR (2-ATG)	psDRed2-N1	EcoRI; BamHI

Tab. 6) Vektoren, Insert und Schnittstellen.

2.2.3.5.1 Ligation

In einem 15 oder 20 µl Ligationsansatz wurden Insert und Vektor im molaren Verhältnis von 2:1 bis 3,5:1, 3 oder 4 µl 5-fach konzentriertem T4-DNA-Ligase Puffer sowie 1 µl T4-DNA-Ligase (Life Technologies GmbH) zusammenpipettiert. Der gesamte Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

2.2.3.6 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

2.2.3.6.1 Herstellung MgSO₄-kompetenter *E.coli* DH5α oder JM109

200 ml NZY-Medium (pro Liter: 5g NaCl, 2 g MgSO₄, 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, pH 7,5) wurden mit 1 ml Übernachtskultur von *E. coli* DH5α oder JM109 angeimpft und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bei einer Wellenlänge von 578 nm inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 10 min auf Eis gestellt, dann 5 min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 ml eiskaltem 0,1 M MgCl₂ aufgenommen und 30 min auf Eis gestellt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Bakterien in 5 ml 10 mM CaCl₂ aufgenommen und in 200 µl-Portionen, die mit 20 µl Glycerin versetzt wurden aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Aliquots bei -80°C aufbewahrt.

2.2.3.6.2 Transformation kompetenter *E. coli* DH5 α oder JM109

Ein Aliquot kompetenter *E. coli* DH5 α oder JM109-Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit 1 μ l eines 20 μ l-Ligationsansatzes versetzt und auf Eis für 30 min inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 90 s bei 42°C einem Hitzepuls unterzogen, ca. 10 s in Eis gestellt, mit 800 μ l vorgewärmtem LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Es wurden jeweils 100 μ l und der Rest der Bakteriensuspension auf LB/Ampicillin (50 μ g/ml) oder LB/Gentamicin (50 μ g/ml) Agarplatten ausgebracht. Wurde in einen Vektor kloniert der blau-weiss Selektion erlaubte (pCR2.1-TOPO) wurden auf die Platten ca. 1 h vor dem Ausplattieren der Bakterien 40 μ l IPTG (20 mg/ml) sowie 40 μ l X-Gal (20 mg/ml in DMSO) ausplattiert. Nach Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht wurden rekombinante Kolonien gepickt und in 5 ml LB/Ampicillin oder LB/Gentamicin Medium überführt. Nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht im Schüttelinkubator konnte die Plasmid-DNA isoliert werden.

2.2.3.7 Isolierung von Plasmid-DNA

2.2.3.7.1 Mini-Präparation

Nach der Methode von Chowdhury (Chowdhury K., 1991) wurden kleine Mengen an Plasmid-DNA für Restriktionsanalysen präpariert. Hierzu wurden 0,5 ml einer Übernachtskultur mit 500 μ l TE-gesättigtem Phenol (Roth), Chloroform (Sigma) (Verhältnis 1:1) gemischt und 1 min geschüttelt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 12000 rpm wurden 450 μ l Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 500 μ l Isopropanol und anschließender Zentrifugation bei 12000 rpm die DNA pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit 500 μ l 70 % Ethanol gewaschen und in einer Speed Vac (Univapo 150 H, Uniequip, Unijet II, Refrigerated Aspirator) getrocknet. Die DNA wurde in 20 μ l TE-Puffer (mit 20 μ g/ml RNaseI, Sigma) aufgenommen. Alternativ wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des Macherey und Nagel Mini-Kits nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.2.3.7.2 Midi-und Maxi-Präparation

Zur Präparation großer Mengen an Plasmid-DNA wurden entsprechend transformierte *E. coli* DH5 α und JM109-Klone über Nacht in LB-Medium mit 50 μ g/ml Ampicillin

oder Gentamicin inkubiert und anschließend die Plasmid DNA mit Hilfe des Qiagen oder Macherey und Nagel Midi- oder Maxi-Kits nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.2.3.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde nach der Cycle Sequencing Methode in einem ABI Sequencer (ABI Prism 310), eine Weiterentwicklung der ursprünglichen Methode (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Hierzu wurden 8 µl Terminator Ready Reaction Mix (enthält fluoreszenzmarkierte Dideoxynucleotide und Deoxynucleotide, sowie AmpliTaq DNA Polymerase, Perkin Elmer) 500 ng DNA und 5 pmol des Sequenzierprimers in einem Volumen von 20 µl vermischt. Das Cycle Sequencing erfolgte in einem Thermocycler. Nach einer einmaligen 4 minütigen Denaturierungsphase bei 94°C wurde die DNA in 25 Zyklen folgender Abfolge sequenziert (94°C, 30 sec; 50°C, 60 sec; 60°C, 120 sec). Nach der Amplifikation erfolgte eine Elongationsphase von 5 min bei 72°C. Die Proben wurden mit 4 µl 3 M Natrium-Acetat, pH 4,6 und 120 µl absolutem Ethanol versetzt, 10 min auf Eis inkubiert und bei 13000 rpm, 4°C für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 25 µl Template Suppression Reagent (Perkin Elmer) resuspendiert. Nach einer 2 minütigen Denaturierungsphase bei 95°C wurden die Proben im Sequencer analysiert.

2.2.3.9 Transfektion von COS7-, HepG2- und hFOB-Zellen

COS7 und HepG2-Zellen wurden mittels Lipofectamin, hFOBs mittels Elektroporation transfiziert.

Zur Transfektion von COS7 und HepG2 wurden die Zellen auf Deckgläschen in 6-well Platten ausgesät und bei 60-70 % Konfluenz transfiziert. Die Liposomen-vermittelte Transfektion wurde nach der Methode von Felgner *et al.* (1987) mit Hilfe von Lipofectamin-Reagenz (Life Technologies GmbH), das eine 3:1-Mischung der polykationischen Lipide DOSPA und DOPE enthält, durchgeführt. Pro Einheit einer 6-well Platte wurden 10 µl Lipofectamin und 1 µg des zu transfizierenden Plasmids in jeweils 100 µl serumfreiem DMEM-Medium verdünnt. Die Lösungen wurden vereinigt und zur Ausbildung von DNA-Liposomenkomplexen 20-45 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 800 µl serumfreien Mediums zugegeben und die Lösung

vorsichtig auf die Zellen pipettiert, die vorher 2x mit serumfreiem Medium gewaschen worden waren. Nach 4 h Inkubation wurde die Transfektionslösung entfernt, die Zellen 2x mit Medium gewaschen und für weitere 36 h mit 2 ml serumhaltigem Zellkulturmedium inkubiert.

Für die Elektroporation wurden hFOB-Zellen in 75 cm² Gewebeflaschen ausgesät und jede volle (10⁷ Zellen) Flasche wurde für einen Transfektionsansatz verwendet. Die Zellen wurden abgelöst, zentrifugiert und dann in der entsprechenden Zahl in 350 µl serumfreiem DMEM-F12 Medium aufgenommen. Zu den Zellen wurde 10 µg DNA pipettiert. Der Ansatz wurde in von BioRad 0,1 cm Küvetten überführt und 10 bis 12 sec. eine Spannung von 120 V und 950 µF angelegt (unter Verwendung eines BioRad-Elektroporators).

Danach wurden die Zellen auf Deckgläschen in 6-well Platten ausgesät und für weitere 36 h mit 2 ml serumhaltigem Zellkulturmedium inkubiert.

2.3 Arbeiten mit Proteinen

2.3.1 Proteinmessung

Proteinkonzentrationen wurden mit dem Protein-Assay von Roth, angelehnt an die Proteinbestimmung nach Bradford (1976), nach den Angaben des Herstellers in einem UvicordIII-Photometer (Amersham Pharmacia Biotech) bzw. in einem Eppendorf-Photometer gemessen. Das Roti-Quant-Reagenz wurde 1:5 mit H₂O verdünnt, hiervon je 1 ml in eine Mess-Küvette gegeben und dazu 20 µl des Proteinstandards bzw. Zelllysates (Kernextrakte) pipettiert, gemischt und bei Raumtemperatur 30 min inkubiert. Als Proteinstandard zur Erstellung von Eichkurven wurde bovines Serum Albumin bekannter Konzentration verwendet (50, 100, 150, 200, 250 mg/ml). Die Messungen erfolgen in Doppelbestimmungen. Anhand der Eichkurve wurden die Proteinkonzentrationen berechnet.

2.3.2 Gewinnung von Kernen

Zellen von einer 75 cm² Flasche wurden geerntet. Die adhärierenden Zellen (Zelllayer in der Zellkulturflasche) wurden mit PBS gespült, in STM-Puffer (0,05 M Tris, pH 7,4, 0,25 M Sucrose, 0,005 M MgSO₄) abgeschabt; danach wurde Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 1% zugegeben. Die Zellen in Suspension wurden abzentrifugiert,

1x in PBS gewaschen und dann abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 3 ml STM-Puffer mit 1% Triton X-100 aufgenommen, resuspendiert und auf Eis für 15 min inkubiert. Es folgte dann eine Zentrifugation bei 1800 rpm (Biofuge, swingout Rotor) für 10 min bei 4°C.

Das Kernpellet wurde vorsichtig in 1 ml STM (pH 7,4), 0,5 M Sucrose aufgenommen und auf ein 1 ml Sucrosekissen aus STM und 1 M Sucrose aufgetragen. Die Kerne wurden durch eine Zentrifugation bei 4°C, 4500 rpm, 80 min ohne Bremse pellettiert, vorsichtig dekantiert und das Kernpellet in 2 ml PBS aufgenommen und vorsichtig resuspendiert.

Es erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C, 1800 rpm, 10 min. Das resultierende Pellet wurde in 50 µl Extraktionspuffer (HEPES (pH 7,8) 50 mM; EDTA 0,1 mM; KCl 50 mM; NaCl 300 mM; DTT 1 mM; Pefabloc SC 1 mM; Glycerin 10 %) aufgenommen, lysiert und 20 min auf Eis gestellt. Die Molarität der NaCl-Lösung wurde variiert (0,1 M; 0,2 M; 0,3 M) für verschiedene Präparationen. Die Zentrifugation des Lyseansatzes fand in einer Haereus Kühlzentrifuge bei 4°C, 13000 rpm, 5 min statt.

Für die Herstellung der im Topoisomerase-DNA-Relaxationsassay verwendeten Kernextrakte wurde ein Extraktionspuffer (0,005 M Kaliumphosphat, pH 7,5, 0,1 M NaCl, 0,01 M 2-Mercaptoethanol, 0,0005 M Phenylmethyl Sulfonylfluorid (PMSF)) verwendet. Es wurde 5 M NaCl zugegeben bis zu einer Endmolarität von 0,35 M.

2.3.3 Herstellen von Zelllysaten

Das Medium wurde abgesaugt, die adhären Zellen 2x mit 5 ml kaltem PBS gewaschen, in 500 µl Extraktionspuffer (50 mM Tris, pH 7,5; 1 mM EDTA in PBS) abgekratzt und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen überführt. Diese wurden in ein mit Eis gefülltes Becherglas gestellt (10 Impulse). Die Zelllysate wurden durch eine Zentrifugation bei 4°C, 5 min, 11000 rpm pellettiert und die Überstände auf Eis gelagert.

2.3.4 Immunadsorptionsversuche ("pull-down Assay")

Der „Pull-Down Assay“ wurde unter Verwendung von IgG spezifischer Protein A-Agarose Suspension (Roche 1719394) und TrxR-Antikörper (Prof. Dr. K. Becker, Giessen) durchgeführt. Wir haben eine Prozedur für die Gewinnung sauberer

Kernpräparationen etabliert, anhand derer wurden von verschiedenen Zelllinien Kernextrakte hergestellt (siehe oben 2.3.2). Diese wurden mit Antikörper gegen TrxR versetzt und mit Protein A-Agarose vermischt. Nach verschiedenen Waschschrritten wurde das Immunpräzipitat von der Matrix eluiert, auf SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Lösungen

Wasch-Puffer 1	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 1% Nonidet P40
Wasch-Puffer 2	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 500 mM NaCl 0,1% Nonidet P40
Wasch-Puffer 3	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 0,1% Nonidet P40

Um die unspezifische Bindung von irrelevanten Proteinen an die Protein A-Agarose zu vermeiden, empfiehlt sich ein Vorreinigungsschritt. 50 µl von Protein A wurden mit der Probe (Kernextrakte oder Zellysate) 3 h oder über Nacht bei 2-8°C unter Schwenken inkubiert. Die an die Matrix gebundenen unspezifischen Proteine wurden dann durch eine Zentrifugation für 20 min bei 12000 x g pellettiert und der Überstand weiter verwendet. Zum Überstand wurden 2-5 µl des TrxR Antikörpers gegeben und für 1 h bei 2-8°C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurde die Protein A-Agarose (50 µl) mit dem Ansatz vermischt und 3 h oder über Nacht bei 2-8°C unter Schwenken inkubiert. Der gebildete Komplex wurde bei 12000 x g für 20 min zentrifugiert und der Überstand bei -20°C gelagert. Das Pellet wurde 2x mit der Waschlösung 1 für 20 min bei 2-8°C inkubiert und nach jedem Waschschrtritt bei 12000 x g, 20 min zentrifugiert. Die selbe Prozedur wurde mit der Waschlösung 2 wiederholt und es erfolgte dann ein Waschschrtritt mit der Waschlösung 3. Die Waschschrtritte sind in der Tabelle 7 zusammengefasst:

Schritt	Benötigte Lösung	Reaktionsvolum
Vorreinigung der Probe	Protein A-Agarose Suspension	50 µl
Immunpräzipitation	Protein A-Agarose Suspension	50 µl
1. Waschschrift, 2x	Wasch-Puffer 1	2 ml
2. Waschschrift, 2x	Wasch-Puffer 2	2 ml
3. Waschschrift, 1x	Wasch-Puffer 3	1 ml

Tab. 7) Schritte eines Immunpräzipitationsprotokolls.

Nach dem letzten Waschschrift wurden die an die ProteinA-Agarose gebundene Proteine mit 25-75 µl SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt, durch 3 minütiges Kochen denaturiert und bei 15-25°C, 12000 x g für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3.5 SDS-Gelelektrophorese

für SDS-PAGE

Trenngel-Puffer: 3 M Tris-HCl, pH 8,8

Sammelgel-Puffer: 0,5 M Tris-HCl, pH 8,8

Laufpuffer: 192 mM Glycin
25 mM Tris
0,1 % SDS

Das gebräuchlichste Verfahren zur Auftrennung und Reinheitskontrolle von Proteinen ist die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Wanderungsgeschwindigkeit von Molekülen im elektrischen Feld hängt normalerweise von drei Faktoren ab: der Grösse, ihrer Form, und ihrer elektrischen Ladung. Bei der SDS-PAGE ist jedoch vorwiegend die Masse für die Wanderungsgeschwindigkeit ausschlaggebend. Dies erreicht man dadurch, dass dem Gel und dem Laufpuffer SDS, ein Detergens mit stark amphipatischen Eigenschaften, zugegeben wird. Es trennt oligomere Proteine in ihre Untereinheiten und denaturiert sie. An die entfalteten Peptidketten binden SDS-Moleküle und verleihen ihnen eine stark negative Ladung. Zur vollständigen Denaturierung gibt man ausserdem Thiole zu, um die Disulfidbrücken der Proteine zu spalten. Das anionische Detergens SDS bindet an hydrophobe Regionen von Polypeptiden, wodurch die meisten multimeren Proteine in ihre Untereinheiten

dissoziieren. Gleichzeitig werden durch die Bindung negative Ladungen eingeführt, deren Menge näherungsweise eine Funktion des Molekulargewichts ist. Durch Disulfidbrücken zusammengehaltene Untereinheiten können durch Erhitzen in Gegenwart von Mercaptoessigsäure, welche die Disulfidbrücken zu Sulfhydrylgruppen reduziert, dissoziiert werden. Die Proteine können dann mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt werden. Die Auftrennung erfolgte in Polyacrylamidgelen mit einem Tris-Glycin-Puffersystem. Vor Auftrennung im Trenngel wurden die Proteine zur Erhöhung der Auflösung in einem Sammelgel auf eine schmale Startzone konzentriert. Aus folgenden Lösungen wurde in einem Gießstand einer Bioradkammer Trenn- und Sammelgel gegossen (Gelzusammensetzung für 2 Gele: siehe Tabelle 8 und 9):

Trenngel:

	10%	12%	15%
Acrylamid:Bisacrylamid 29:1, 40%	2,5 ml	3,0 ml	3,75 ml
SDS 10%	100 µl	100 µl	100 µl
Ammoniumpersulfat 10%	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	4 µl	4 µl	4 µl
Trenngel-Puffer 3 M Tris-HCl pH 8,8	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml
H₂O	6,05 ml	5,55 ml	4,8 ml

Tab. 8) Zusammensetzung des Trenngels.

Sammelgel:

	15%
Acrylamid:Bisacrylamid 29:1, 40%	0,5 ml
SDS 10%	40 µl
Ammoniumpersulfat	40 µl
TEMED	4 µl
Sammelgel-Puffer 0,5 M Tris-HCl pH 8, 8	1,0 ml
H₂O	2,4 ml

Tab. 9) Zusammensetzung des Sammelgels.

Nach der Polymerisation wurden jeweils pro Spur die gleiche Proteinmenge im gleichen Volumen aufgetragen. Die Proteine wurden 5 min im SDS-PAGE-Probenpuffer

(RotiLoad) gekocht, auf Eis gelagert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Proteinmarker (prestained) von peqLab, bestehend aus den Komponenten Lysozym (20,4 kDa), β Laktoglobulin (24,5 kDa), Karboanhydrase (32,0kDa), Ovalbumin (46,8 kDa), Bovines Serum Albumin (81,4 kDa) und β -Galaktosidase(121,6kDa). Die Elektrophorese lief bei einer Spannung von 110 V, bis an den unteren Rand des Trenngels (ca. 15 min) anschließend bei einer Spannung von 200 V, bis die Markerbande den unteren Gelrand erreicht hat.

2.3.6 Silberfärbung

Reagenzien

1. Fixierungsreagenz (40% Methanol; 10% Essigsäure)
2. Waschreagenz (30% Ethanol)
3. Sensibilisierungsreagenz (0,02% Na-thiosulphat)
4. Silberreagenz (0,2% AgNO_3 ; 0,02% Formaldehyd (37%))
5. Entwicklerreagenz (3% Na_2CO_3 ; 0,0005% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; 0,05% Formaldehyd(37%))
6. Stopreagenz (0,5% Glycin)
7. Konservierungsreagenz (20% Ethanol; 2% Glycerol)

Das Protokoll wurde wie folgt durchgeführt.

SCHRITT	LÖSUNG	ZEIT
Fixieren	1	60 min
Fixieren	1	30 min
Waschen 2x	2	20 min
Waschen	H_2O	20 min
Sensibilisierung	3	1 min
Waschen 3x	H_2O	20 sec
Silberfärbung	4	20 sec
Waschen 3x	H_2O	20 sec
Ag-Reduktion	5	3-5 min
Waschen	H_2O	20 sec
Abstoppen	6	5 min
Waschen 3x	H_2O	10 min

Tab. 10) Die Schritte einer Silberfärbung

2.3.7 Western Blot Analyse (Proteintransfer auf eine Membran)

Puffer und Lösungen

für den Transfer

10x Transferstammlösung	0,25 M Tris 1,9 M Glycin, pH 10 wird mit NaOH-Plätzchen eingestellt
<u>Transferpuffer:</u>	100 ml 10x Transferstammlösung 200 ml Methanol 700 ml H ₂ O

zur Membran-Färbung

Ponceau S-Stammlösung: 10x	2% Ponceau S 30% Trichloressigsäure 30% Sulfosalicylsäure
-------------------------------	---

zur Antikörper-Inkubation

Stammlösungen:

Waschlösung 1:	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 2 mM EDTA, pH 8,0 0,1 % Triton X-100
Waschlösung 2:	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 M NaCl 2 mM EDTA, pH 8,0 0,1 % Triton X-100
Blockierungslösung:	2,5 % BSA 2,5 % Magermilchpulver 2 % Pferdeserum PBS- 0,1 % Tween-20 ad 100 ml
Inkubationslösung 1:	1 % BSA 1 % Magermilch 1 % Pferdeserum PBS- 0,1 % Tween-20 ad 6 ml + 1. Antikörper
<u>1. Waschen:</u>	1 % BSA 1 % Magermilchpulver 1 % Pferdeserum in Waschlösung 1
Inkubationslösung 2:	1 % BSA 1 % Magermilchpulver 1 % Pferdeserum PBS- 0,1 % Tween-20 ad 40 ml + 2. Antikörper

2. Waschen:
 1 % BSA
 1 % Magermilchpulver
 1 % Pferdeserum
 in Waschlösung 2

zur Detektion

10 ml PBS- 0,5 % Tween 20
 5 ml ECL-Reagenz 1 (AmershamPharmacia)
 5 ml ECL-Reagenz 2 (AmershamPharmacia)

Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulose Membran mithilfe einer BioRad Blot Apparatur bei einer Spannung von 25 V für 2 h transferiert. Die Membran wurde leicht 5-10 min in Ponceau-Lösung geschwenkt, mit entsalztem Wasser gewaschen, zwischen zwei Folien gelegt und mit einem Densitometer fotografiert. Das Blockieren erfolgte bei Raumtemperatur 2 h in 50 ml Blockierungslösung. Die Inkubation mit dem in der Inkubationslösung 1 verdünnten Antikörper (siehe Tab. 11) folgte über Nacht bei 4°C.

Antikörper	Verdünnung/Arbeitskonzentration
Living Colors A.v. Peptide Antibody(BD Biosciences, rabbit anti-GFP)	100 µg/ml; 1: 500
Living Colors DsRed Monoclonal Antibody (BD Biosciences, mouse anti-DsRed2N1)	0,25 mg/ml;1: 500
Rabbit anti-humane TrxR Antibody (Prof. Dr. K. Becker)	1:1000
anti-Rabbit-Peroxidase (Roche)	1:2000
anti-Mouse-Peroxidase (SIGMA)	1:2000

Tab. 11) Die für denWesternblot verwendeten Antikörper.

Am nächsten Tag wurde die Membran in eine Schale gelegt und 4x bei Raumtemperatur unter Schütteln in Waschlösung 1 gewaschen. Danach folgte die Inkubation mit dem an Peroxidase gekoppelten 2. Antikörper (1:2000 verdünnt), 1 h bei 4°C (oder bei Raumtemperatur) auf einem Schüttler. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Blot wiederum 4x 10 min bei Raumtemperatur unter Schütteln in der Waschlösung 2 gewaschen und konnte dann mit Hilfe des ECL-Reagenz (enhanced chemiluminiscence) entwickelt werden. Die zwei ECL-Reagenzien wurden mit PBS-0,05% Tween 20

gemischt, Waschlösung abgeschüttet und die ECL-Lösung auf die Membran gegeben. Nach einer 1 minütigen Inkubationszeit wurde die Membran zwischen zwei Folien gelegt, ein Film für 5 bis 20 min aufgelegt und dieser entwickelt.

2.4 Immunostaining

Das Immunostaining wurde bei Raumtemperatur nach folgendem Protokoll durchgeführt. Die auf Deckgläschen in 6 well-Platten ausgesäten Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen, mit 3 % Paraformaldehyd 15-20 min fixiert und mit 0,2 % Triton 10 min permeabilisiert. Anschließend wurde 3-4x je 5-10 min mit PBS gewaschen. Die Blockierung erfolgte 1 h bei Raumtemperatur in PBS mit 2 % BSA, 4 % Ziegen Serum. Die Deckgläschen wurden in eine feuchte Kammer gelegt und der 1. Antikörper in der Blockierlösung (1:100 bis 1:250 verdünnt, 100-200 μ l/well) darauf pipettiert. Nach einer Inkubationsdauer bei Raumtemperatur von ca. 1 h wurden die Deckgläschen 3-4x je 5-10 min mit PBS gewaschen und anschließend die Sekundärantikörper-Lösung an Cy3 gekoppelt (Santa Cruz) für 30-45 min aufgetragen. Er wurde in der Blockierlösung 1:800 bis 1:1000 verdünnt. Zur Inkubation wurden pro Deckglas 100-200 μ l eingesetzt. Um DNA bzw. Zellkerne sichtbar zu machen, wurde der Antikörperlösung 5 min vor Ablauf der Inkubationszeit des Sekundärantikörpers 200-400 μ l pro Deckglas Hoechst 33258 (DAPI-Lösung, 1:5000 verdünnt) zugegeben. Nach 5 maligem Waschen in PBS für je 10 min wurden die Zellen mit Mowiol (Hoechst, Frankfurt bzw. Sigma) eingedeckt. Die Präparate wurden anschließend mikroskopiert und fotografiert (Axioskop 2, Zeiss, Olympus bzw. Konfokales Mikroskop)

2.5 Topoisomerase Assay

Die DNA-Relaxationsversuche wurden 1 h bei 37°C durchgeführt. Die Reaktion fand in einem 20 μ l-Ansatz (10 mM Tris-HCl, pH 7,9; 3 mM MgCl₂; 0,03 % mM EDTA, 0,5 mM DTT, 150 ng pUC18 Plasmid-DNA und 50 mM KCl) statt. Es wurden verschiedene Mengen an gereinigter TrxR (50 ng, 100 ng, 150 ng, 200 ng, 250 ng) und rekombinanter Topoisomerase I aus Hefe (10 ng und die entsprechenden Verdünnungen 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 und 350 ng, 400 ng, 450 ng, 500 ng) verwendet. Nach einer Stunde wurde die Reaktion mit 1 % SDS und Proteinase K gestoppt und die Reaktionsprodukte im Agarosegel ohne Ethidiumbromid analysiert. Die DNA wurde

durch Nachfärbung mit Ethidiumbromid (2 µg/ml) sichtbar gemacht. Die rekombinante Topoisomerase I wurde von Herrn Prof. Boege (Düsseldorf) und die gereinigte Thioredoxin Reduktase 1 von Frau Prof. K. Becker (Giessen) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

D. Ergebnisse

1 Expression von Fusionsproteinen

1.1 Klonierung und Herstellung der Expressionsvektoren

1.1.1 Thioredoxin

Um das Thioredoxin Gen untersucht zu werden, wurde von HepG2-Zellen Gesamt-RNA isoliert, revers transkribiert und die cDNA wurde weiter verwendet für die Amplifikation des humanen Thioredoxin mit EcoRI-Trx und BamHI-Trx Primern (siehe Tabelle 6) mittels PCR. Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel aufgetrennt.

Die Bande wurde aus dem Gel eluiert und anschließend in die EcoRI- und BamHI-Schnittstellen des pGEM-Vektors (Promega, 3,9 kb) kloniert. Um die Sequenz der klonierten Bande zu überprüfen, wurde das Insert von beiden Seiten sequenziert. Die Sequenzierung ergab eine 100 %ige Übereinstimmung mit der publizierten Sequenz (Genbank-Nummer AY004872, cDNA bp 11-439).

Das Insert wurde aus dem Klonierungsvektor geschnitten, in einem Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel eluiert. Es erfolgte dann die Ligation in den EGFP-Vektor am C- und am N-Terminus bzw. in den pDsRed2-N1. Als Beispiel wird in Abbildung 7 die Restriktion des Trx-N1-EGFP Vektors mit den Enzymen EcoRI und BamHI dargestellt. Der Vektor wurde auch von beiden Seiten sequenziert um die richtige Orientierung im Leseraster zu überprüfen.

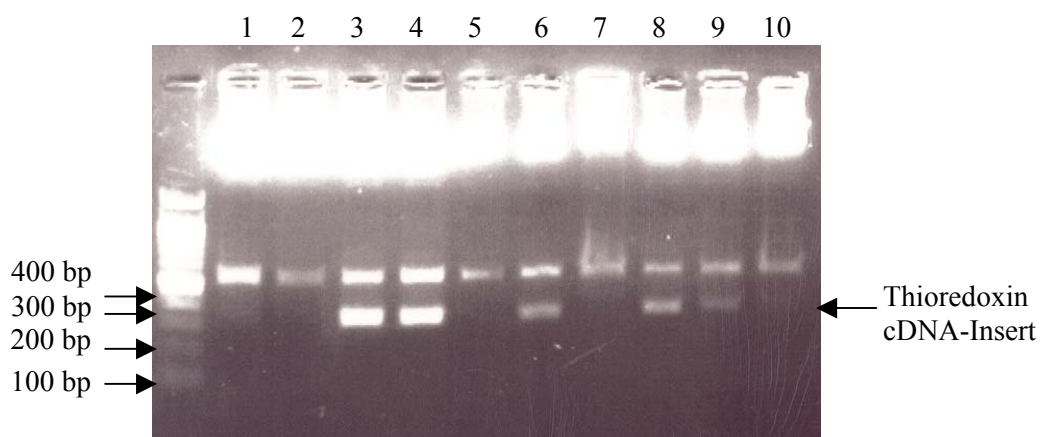


Abb. 7) Restriktion verschiedener Klone (1-10) des Trx-N1-EGFP-Vektors mit EcoRI und BamHI; das Insert ist Thioredoxin. Aus den positiven Klonen 3, 4, 6, 8 und 9 wurde Klon 4 sequenziert und für weitere Experimente verwendet.

1.1.2 Thioredoxin Reduktase

1.1.2.1 Klonierung der Thioredoxin Reduktase 1 aus hFOB-Zellen

Für die Klonierung der TrxR1 wurde zuerst Gesamt-RNA von hFOB-Zellen isoliert, revers transkribiert und die cDNA wurde weiter verwendet für die Amplifikation der humanen Thioredoxin Reduktase 1 mit den Primern FwhTrxR1(1ATG)-RevSTOPhTrxR1 und FwhTrxR1(2ATG)-RevSTOPhTrxR1 mittels PCR (Material und Methoden 2.2.3.1.) Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel aufgetrennt. Die Bande wurde aus dem Gel eluiert und anschließend in den pCR 2.1-TOPO-Vektor (Invitrogen, 3,9 kb) kloniert. Um die Sequenz der klonierten Bande zu überprüfen wurde das Insert von beiden Seiten sequenziert. Die Sequenzierungen ergaben eine 100 %ige Übereinstimmung mit der publizierten Sequenz von Koishi *et al.* (Genbank-Nummer D88687, cDNA bp 97-1746; cDNA bp 233-1746, von der eigenen Arbeitsgruppe Genbank-Nummer AJ001050, cDNA bp 38-1531). Die Produkte der Restriktion vom Klonierungsvektor wurden im Agarosegel aufgetrennt, gereinigt und in die Expressionsvektoren N1-EGFP, C1-EGFP und pDsRed2N1 kloniert (siehe unten). Die Ergebnisse von der Restriktion des Klonierungsvektors sind in Abbildung 8 dargestellt.

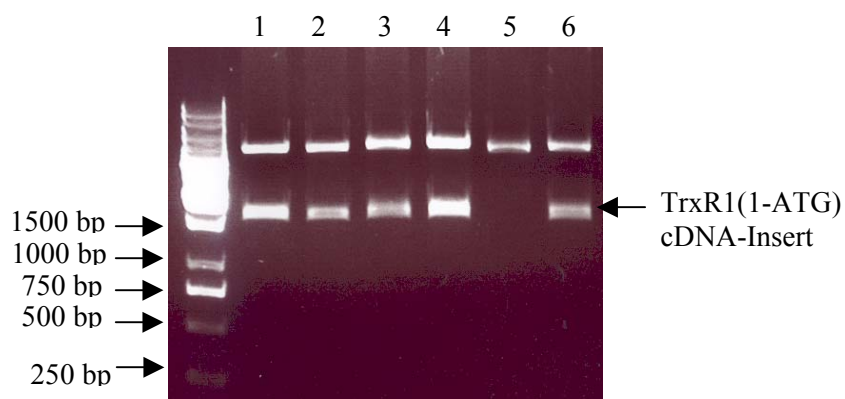


Abb. 8) Restriktion verschiedener Klone (1-6) des pCR 2.1 Topo-Vektors mit EcoRI (Insert TrxR1 (1-ATG)). Von den positiven Klonen 1, 2, 3, 4 und 6 wurde Klon 1 sequenziert und für weitere Experimente verwendet.

1.1.2.2 Herstellung der Expressionskonstrukte

Nach der selben Prozedur wie für Thioredoxin wurde das Insert (die zwei Isoformen von Thioredoxin Reduktase 1) in den N1-EGFP-Vektor (beide Fragmente) und in den pDsRed2-N1 (TrxR vom 2. ATG) kloniert. Die Inserts wurden von beiden Seiten sequenziert, um die Orientierung im Leseraster zu überprüfen. Das SP-N1-EGFP Konstrukt (1.ATG-2.ATG EGFP) wurde von Frau Dr. A. Baur hergestellt und die

Sequenzierung bewies eine 100%ige Übereinstimmung mit der publizierten Sequenz (Genbank-Nummer D88687 bp 97-252) (Daten nicht dargestellt).

1.2 Westernblot-Analyse

Die hergestellten Konstrukte wurden weiter in verschiedene Zelllinien transfiziert. Um die Expression der gewünschten Gene zu überprüfen, wurden die Proteine mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

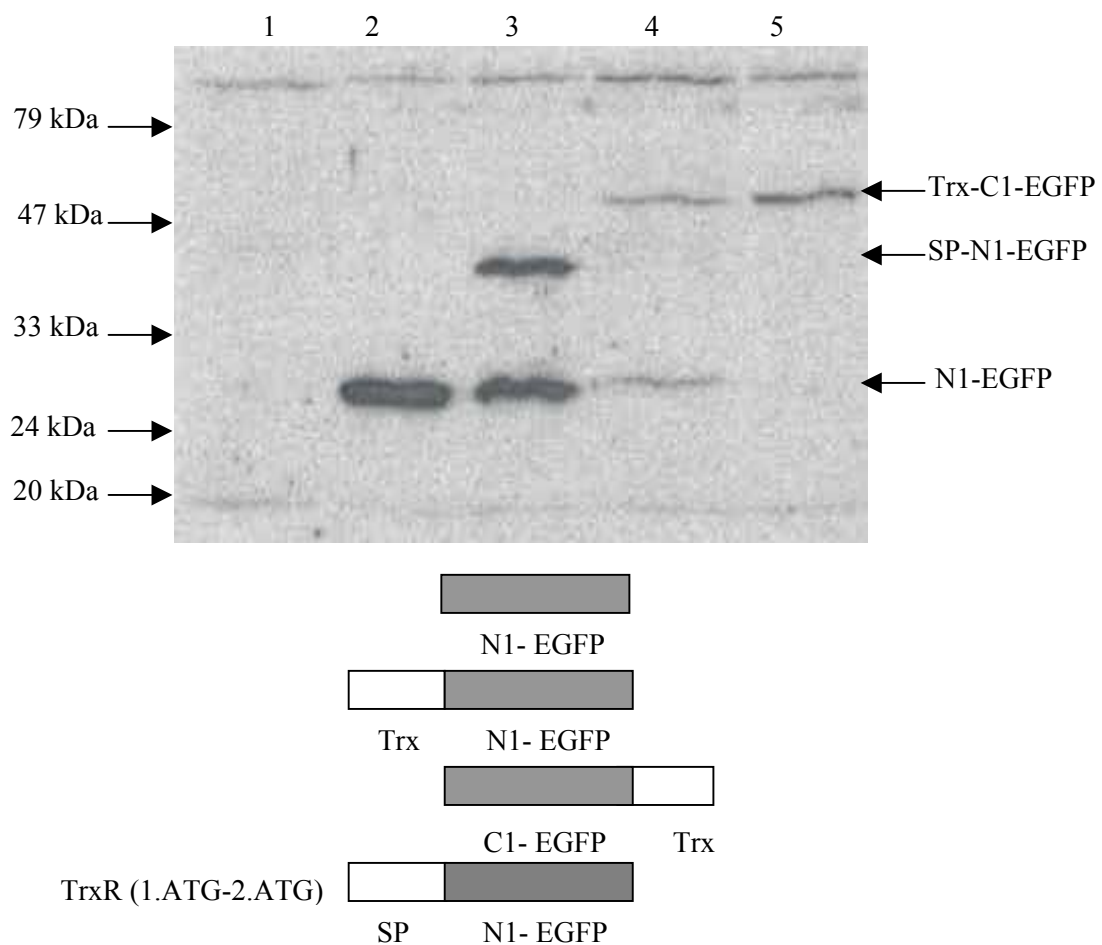


Abb. 9) Kontrolle der Expression von Fusionsproteinen in COS7-Zellen vor der Mutation des internen ATG im Westernblot mittels Antikörper gegen GFP (Clontech): 1-Ko (-); 2: N1-EGFP; 3: SP-N1-EGFP; 4: Trx-N1-EGFP; 5: Trx-C1-EGFP. Die Darstellung von zwei Banden in Spur 3 und 4 zeigt, dass auch das interne ATG des EGFP genutzt wurde, so dass neben dem Fusionsprotein auch jeweils GFP allein exprimiert wurde.

Die ersten Ergebnisse zeigten, dass nach Transfektion von Trx-N1-EGFP zwei Banden vorhanden waren (Abb. 9): eine für das Trx-GFP-Fusionsprotein von ungefähr 39 kDa und die andere für das N1-EGFP-Protein von ungefähr 27 kDa. Das interne ATG (Transkriptionstart der EGFP-Sequenz) wurde daher zu GTC) mutiert, um die Translation von diesem ATG zu verhindern.

Die Transfektionen wurden anschließend mit den neuen Konstrukten durchgeführt. Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse sind in den Abbildungen 10 und 11 dargestellt. Der Westernblot (Abb. 10) zeigte eine einzige Bande (39 kDa) entsprechend dem Trx-N1-EGFP-Fusionsprotein und für die Kontrolle eine Bande von 27 kDa (pN1-EGFP). Nach der Transfektion der TrxR-Isoformen und des Fragments zwischen dem 1. und dem 2. ATG in hFOB-Zellen wurden folgende Proteine aufgetrennt: 27 kDa (pN1-EGFP), ungefähr 39-40 kDa (SP-N1-EGFP), 82 kDa (TrxR-N1-EGFP, vom 2. ATG) und 85 kDa (TrxR-N1-EGFP, vom 1. ATG). Dies zeigt, dass nur die gewünschten Proteine exprimiert werden.

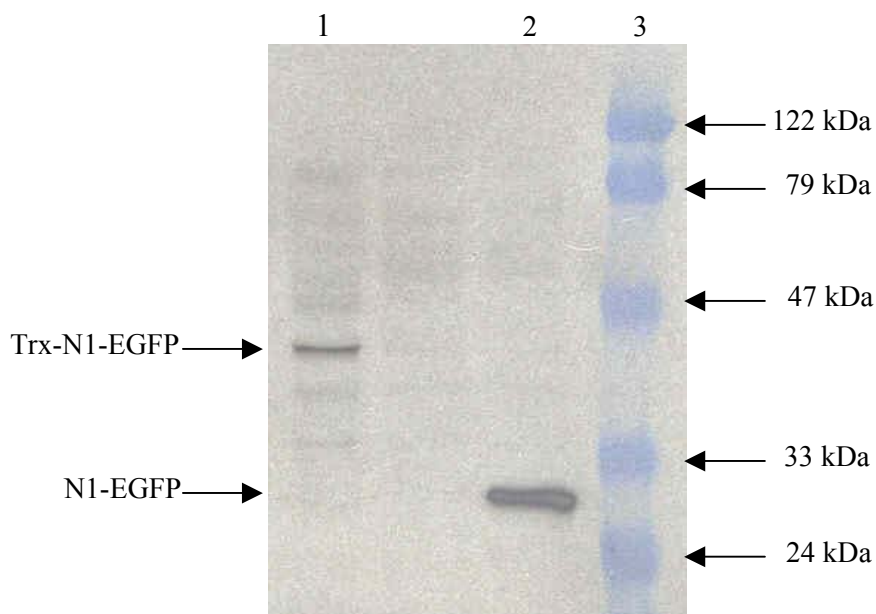


Abb. 10) Immunchemische Darstellung in hFOB Zellen exprimierter Fusionsproteine im Westernblot unter Verwendung eines Antikörper gegen GFP (Clontech). 1: Trx-N1-EGFP; 2: N1-EGFP; 3: Protein-Marker (peqLab). Die Abbildung zeigt, dass nach Mutation des ATGs für EGFP (ATG→GTC) nur noch Trx-EGFP-Fusionsprotein exprimiert wurde.

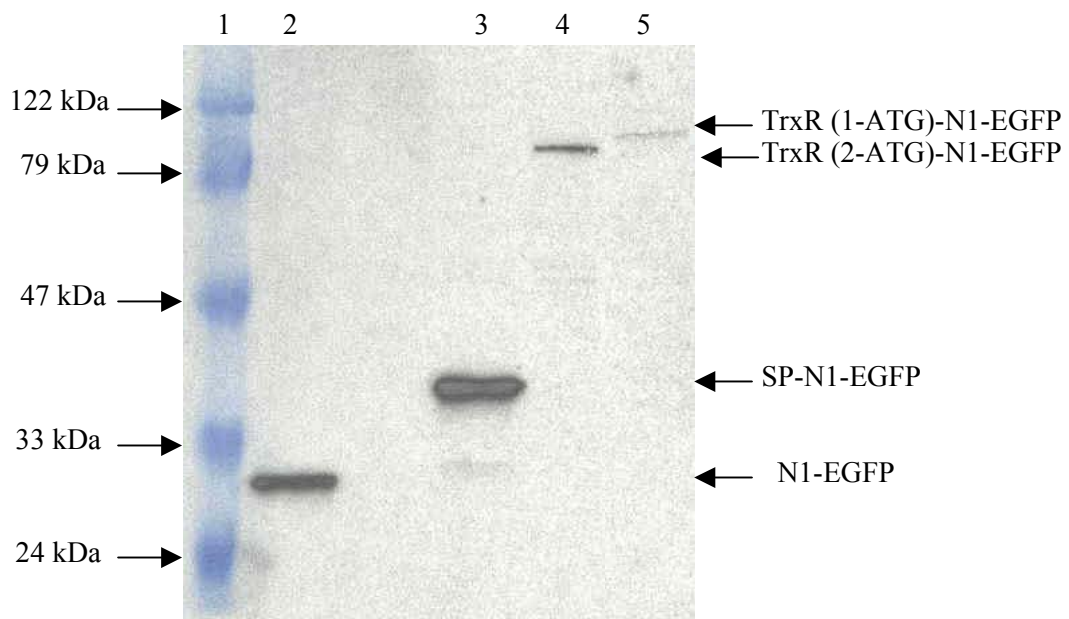


Abb. 11) Immunchemische Darstellung exprimierter Fusionsproteine im Westernblot unter Verwendung eines Antikörper gegen GFP (Clontech): 1-Protein-Marker; 2: N1-EGFP; 3: SP-N1-EGFP; 4: TrxR (2-ATG)-N1-EGFP; 5: TrxR (1-ATG)-N1-EGFP. Es zeigt sich jeweils nur eine Bande erwarteter Größe für die exprimierten Fusionsproteine.

2 Subzelluläre Lokalisation des Thioredoxin/Thioredoxin Reduktase-Systems

2.1 Thioredoxin (Trx)

2.1.1 Transiente Transfektion von Trx in COS7-, HepG2- und hFOB-Zellen

Um die Expression von Fusionsproteinen mit Trx/GFP zu untersuchen, wurden die Trx/N1-EGFP, C1-EGFP und pDsRed2N1 Konstrukte in verschiedenen Zellen transient transfiziert.

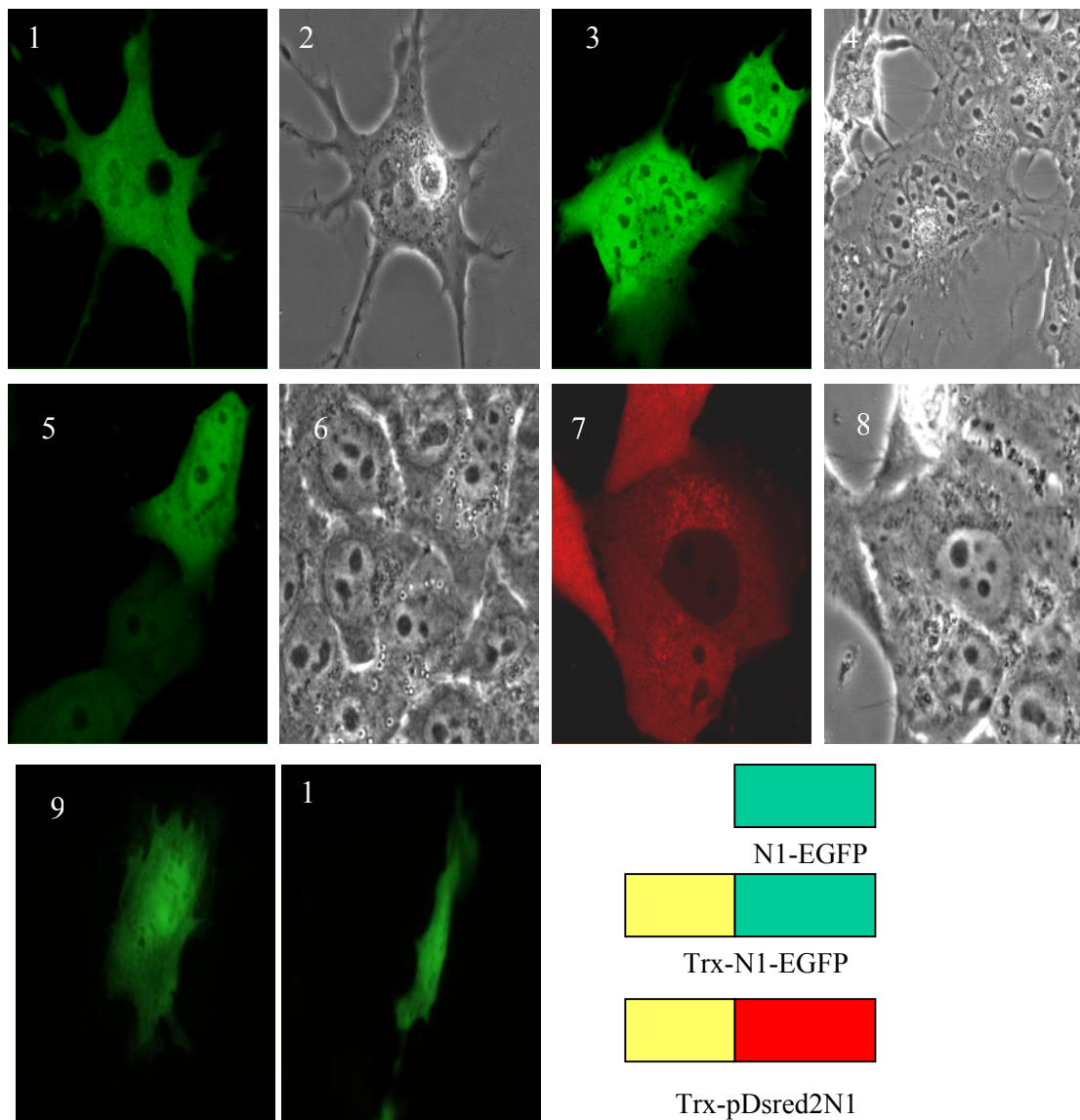


Abb. 12) Transfektion von Trx-N1-EGFP in COS7-, HepG2- und hFOB-Zellen. Mit Ausnahme von HepG2 (7) findet sich das Fusionsprotein immer zytosolisch und nucleär. Die Bilder 1-8 wurden mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen, 9 und 10 mit einem Zeiss-Fluoreszenzmikroskop. 1 und 2: N1-EGFP in COS7-Zellen; 3 und 4: Trx-N1-EGFP in COS7-Zellen; 5 und 6: N1-EGFP in HepG2-Zellen; 7 und 8: Trx-pDsred2N1 in HepG2-Zellen; 9: N1-EGFP in hFOB-Zellen; 10: Trx-N1-EGFP in hFOB-Zellen.

Die transiente Transfektion erfolgte wie im Protokoll beschrieben (Material und Methoden 2.2.3.9). Nach der Transfektion wurden die Zellen mit einem Olympus-Fluoreszenzmikroskop und mit einem Konfokalen Mikroskop nach 36 h untersucht. Beispiele von verschiedenen Zellen sind in Abbildung 12 zu sehen. Die Transfektion zeigte in allen transfizierten Zellen eine homogene nucleäre und zytosolische Verteilung. Eine Ausnahme waren die HepG2-Zellen, in denen die Expression von Trx-pDsRed2-N1 in den meisten Zellen nur zytosolisch war.

2.1.2 Immunfluoreszenz-Untersuchungen in Zellkultur für Trx

Mittels Antikörper gegen Thioredoxin (Stratagene) wurde nach Protokoll (Material und Methoden 2.4) eine Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt.

Die Präparate wurden mit einem Zeiss oder Olympus-Fluoreszenzmikroskop bzw. einem Konfokalen Mikroskop aufgenommen. Als Beispiel werden in Abbildung 13 MG63 (eine Osteosarkoma-Zelllinie), hFOB und COS7-Zellen gezeigt.

Insgesamt zeigte die transiente Transfektion mit Trx-GFP-Fusionsprotein bezüglich die subzelluläre Lokalisation identische Muster verglichen mit der immunchemischen Darstellung des endogenen Trx (Abb. 12 und 23).

Somit waren auch immunzytochemisch HepG2-Zellen eine Ausnahme bezüglich der nucleären Lokalisation von Trx, hier fand sich das Peptid nur sehr selten nucleär.

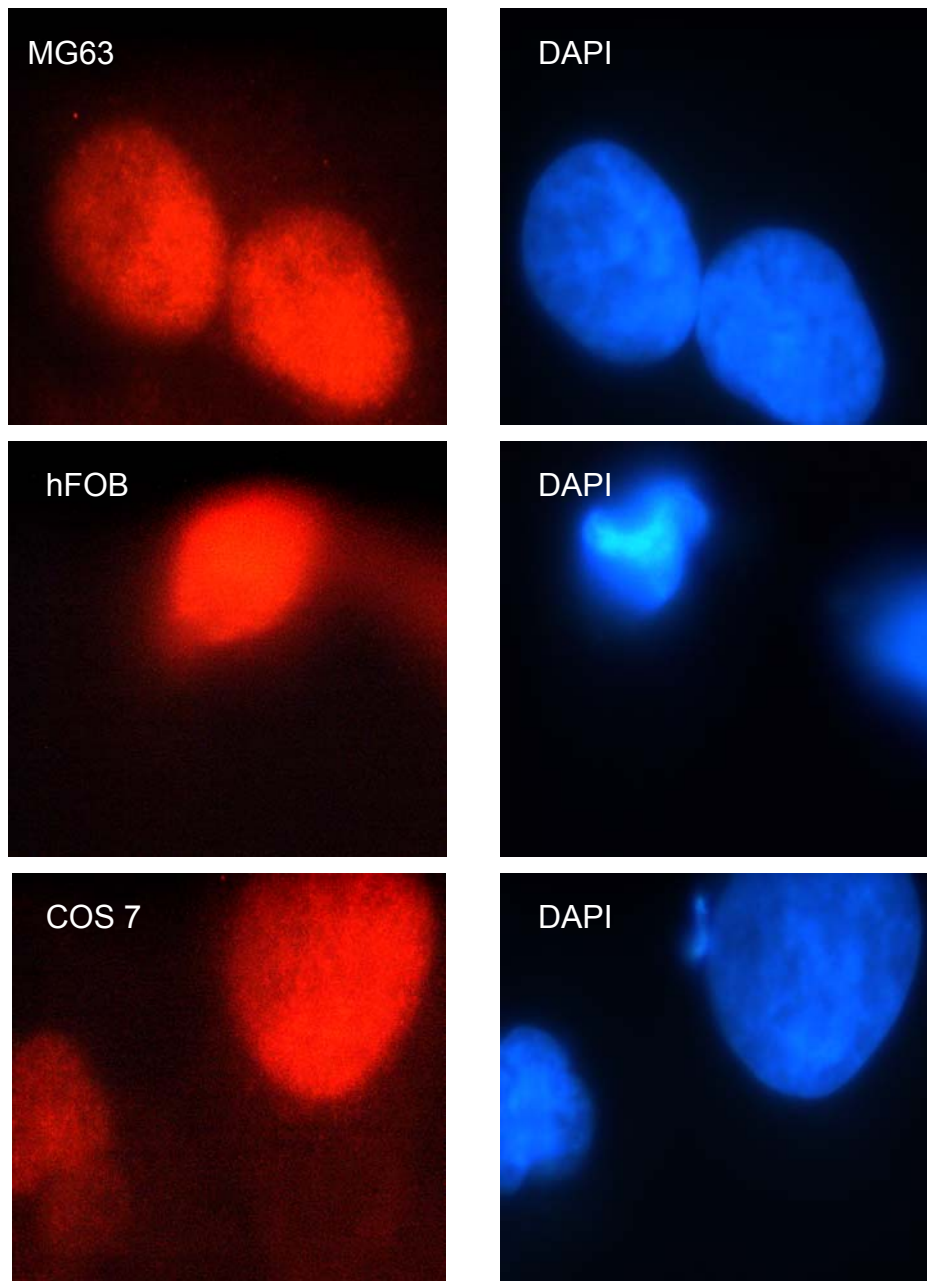


Abb. 13) Immunofluoreszenz in verschiedenen Zelllinien unter Verwendung von Antikörper gegen Trx, (100x). In einer Reihe befindet sich jeweils die selbe Zelle, links Texas-Färbung mit einem Cy3 markierten Antikörper; rechts die DAPI-Färbung zur Darstellung der Zellkerne (Fluoreszenzmikroskop Zeiss).

2.2 Thioredoxin Reduktase

2.2.1 Expression von Thioredoxin Reduktase-Isoformen

2.2.1.1 PCR-Nachweis in verschiedenen Zelllinien und Westernblot-Analyse

Um zu überprüfen, ob Thioredoxin Reduktase 1 als Isoformen vorhanden ist, wurden verschiedene cDNAs (hFOB, HepG2, MG63, T/C28a2) nach Protokoll (Material und Methoden 2.2.3.1) synthetisiert. Mittels PCR wurde die TrxR mit passenden Primern amplifiziert. (cDNA von HEK-293 wurde von Frau D. Schneider synthetisiert). Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt. In allen untersuchten Zelllinien finden sich beide mRNA-Isoformen.

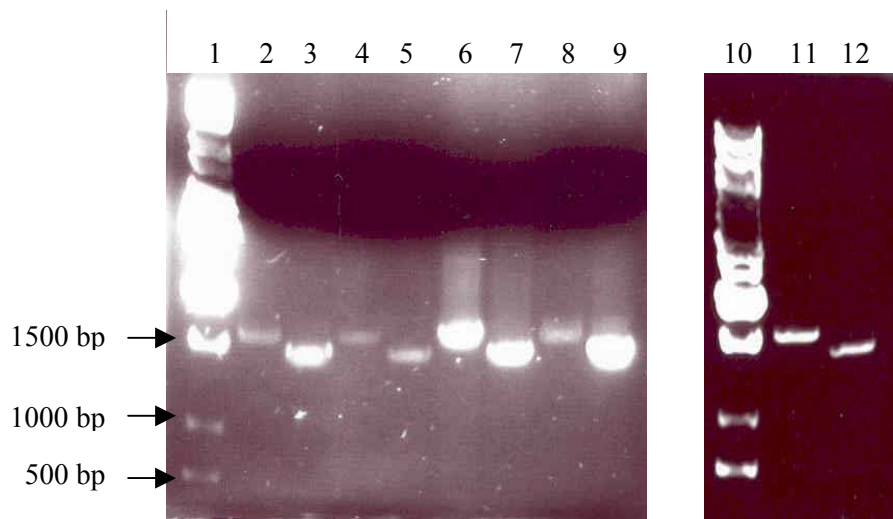


Abb. 14) RT-PCR in verschiedenen Zelllinien: 1 und 10: 1kb Marker (peqLab); 2: TrxR (1-ATG)-hFOB; 3: TrxR (2-ATG)-hFOB; 4: TrxR (1-ATG)-MG63; 5: TrxR (2-ATG)-MG63; 6: TrxR (1-ATG)-T/C-28a2; 7: TrxR (2-ATG)-T/C-28a2; 8: TrxR (1-ATG)-HEK-293; 9: TrxR (2-ATG)-HEK-293; 11: TrxR (1-ATG)-HepG2; 12: TrxR (2-ATG)-HepG2.

Weiter wurde die Expression endogener TrxR in Kernen und im Zytosol untersucht, um zu sehen ob die zwei Isoformen auch auf Protein-Ebene vorhanden sind. Von den selben Zellen wurden die Kerne (Material und Methoden 2.3.2) vom Zytosol getrennt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot (Antikörper gegen TrxR) analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt. Man kann beobachten, dass in fast allen Fällen zwei Banden erwarteter Größe vorhanden waren.

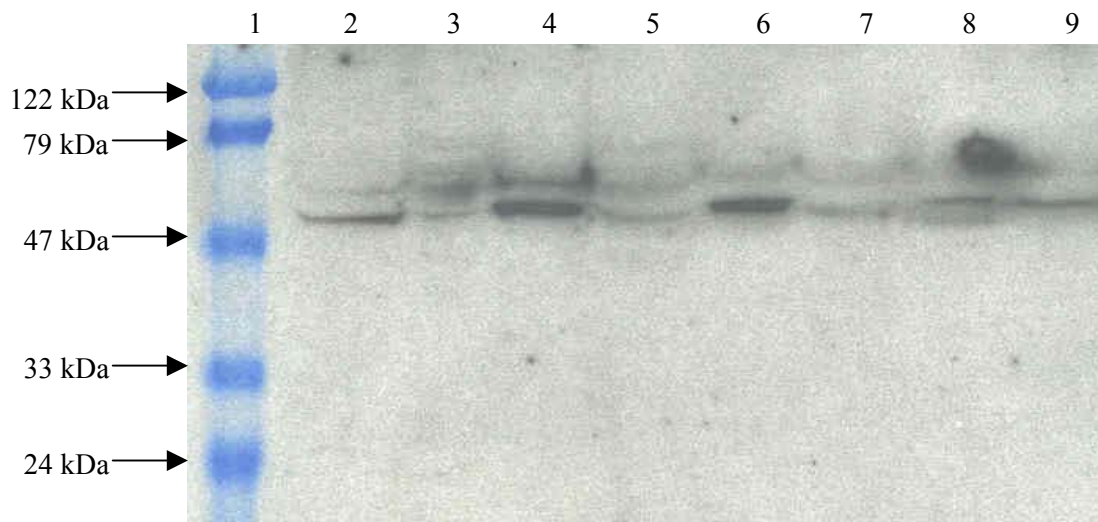


Abb. 15) Immunchemische Darstellung der Expression von endogener TrxR unter Verwendung von Antikörper gegen TrxR. 1: Proteinmarker (peqLab); 2: Kernextrakte von hFOB; 3: Zytosol von hFOB; 4: Kernextrakte von MG63; 5: Zytosol von MG63; 6: Kernextrakte von T/C-28a2; 7: Zytosol von T/C-28a2; 8: Kernextrakte von HEK-293; 9: Zytosol von HEK-293.

2.2.1.2 Transiente Transfektion von TrxR-Isoformen in COS7-, HepG2- und hFOB-Zellen und mögliche Lokalisationssequenzen

Nach der Feststellung der Existenz von zwei Isoformen auf der mRNA-Ebene wurden die Konstrukte (TrxR (2-ATG)/N1-EGFP; TrxR (2-ATG)/pDsRed2N1 und TrxR (1-ATG)/N1-EGFP) von den beiden „in Frame“-ATGs in COS7-, HepG2- und hFOB-Zellen transfiziert das Expressionsmuster wurde mit einem Zeiss-Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. Die Abb. 16 zeigt, dass das Fusionsprodukt TrxR (2. ATG) vorwiegend zytosolisch lokalisiert ist (COS7 80 %, HepG2 70 %; hFOB 80 %), wobei man Ausnahmen findet (siehe Bild 3). In Abb. 17 sind die hFOB-Zellen dargestellt (die Konstrukte TrxR (1-ATG)-N1-EGFP und TrxR (2-ATG)-pDsRed2N1 wurden kotransfiziert); in Abb. 18 bzw. 19 HepG2- und COS7-Zellen transfiziert separat mit TrxR (1-ATG)-N1-EGFP bzw. mit TrxR (2-ATG)-pDsRed2N1. Die Transfektion des Fusionsproteins TrxR (1. ATG) zeigte ein anderes Lokalisationsmuster als dasjenige für das vom 2.ATG translatierte Fusionsprotein. Die Lokalisation des Fusionsproteins TrxR 2.ATG war vorwiegend zytosolisch, diejenige des Fusionsproteins TrxR 1. ATG war sowohl zytosolisch (COS7 35 %; HepG2 15 %; hFOB 35 %) als auch nucleär (COS7 65 %; HepG2 85 %; hFOB 65 %), wobei es für beide vereinzelt Ausnahmen gab (z.B. Abb. 19 Bild 3). Konsistent mit dieser Beobachtung fand sich das Fusionsprotein 1.ATG-2.ATG-EGFP (SP-EGFP) zytosolisch und nucleär.

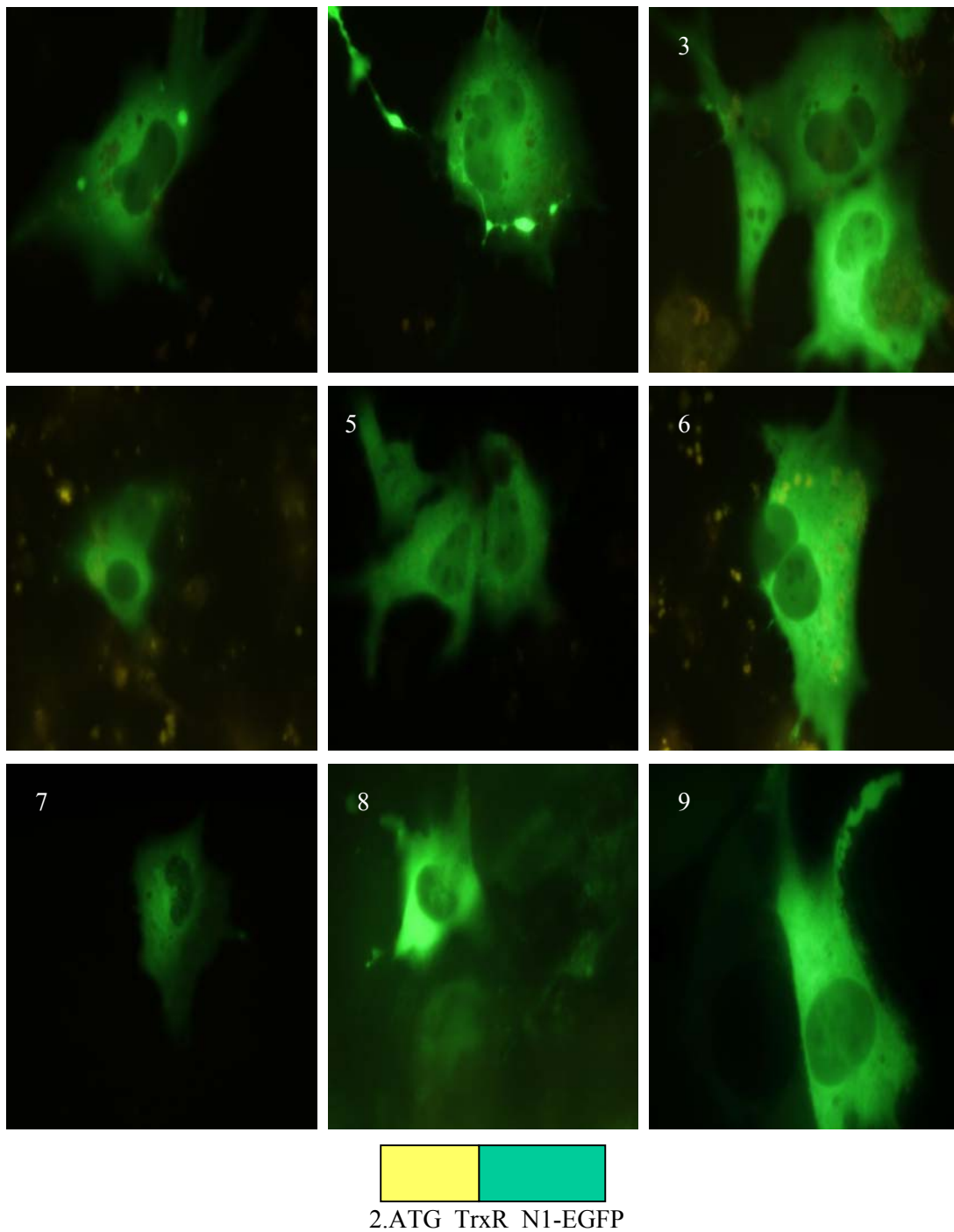


Abb. 16) Transiente Transfektion von TrxR (2.ATG)-N1-EGFP in verschiedene Zellen. 1, 2, 3: COS7, 63x; 4, 5, 6: HepG2, 63x; 7, 8, 9: hFOB-Zellen, 63x. Die Bilder wurden mit einem Olympus-Fluoreszenzmikroskop aufgenommen.

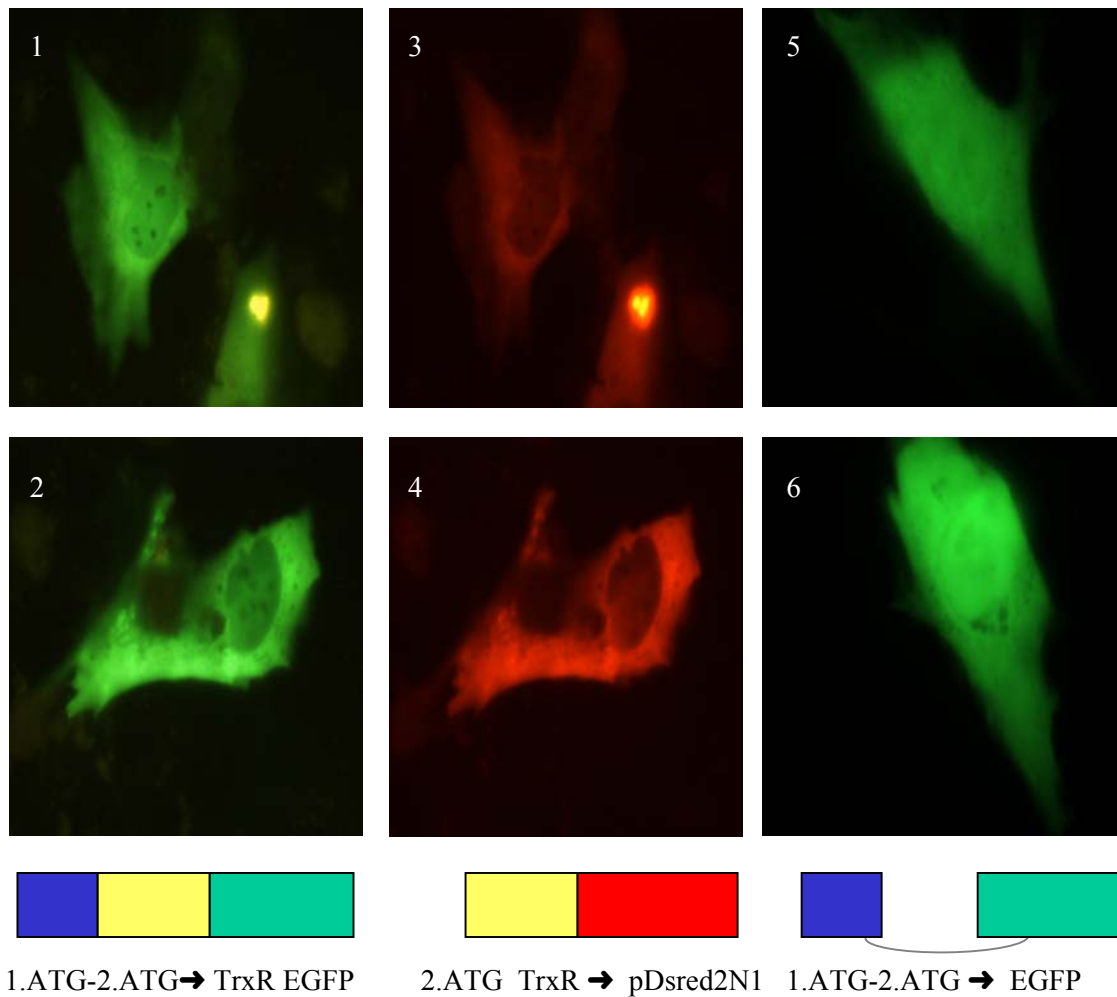


Abb. 17) Transiente Transfektion von Fusionsproteinen in **hFOB**-Zellen. Die Konstrukte TrxR (1.ATG)-N1-EGFP und TrxR (2.ATG1)-pDsRed2N1 wurden kotransfiziert in unterschiedlichen Farben (siehe obenstehende Schema-Zeichnungen). Die Transfektion des kleinen Fragments (1.ATG-2.ATG TrxR) unterscheidet sich besonders deutlich von TrxR 2.ATG. In einer Reihe befinden sich links und in der Mitte jeweils die selbe Zelle. 1, 2: TrxR (1.ATG)-N1-EGFP, 63x; 3, 4: TrxR (2.ATG)-pDsred2N1, 63x; 5, 6: SP-TrxR(1.ATG-2.ATG)-N1-EGFP, 63x. Bilder wurden mit dem Olympus-Fluoreszenz-Mikroskop aufgenommen (siehe Material und Methoden 2.4).

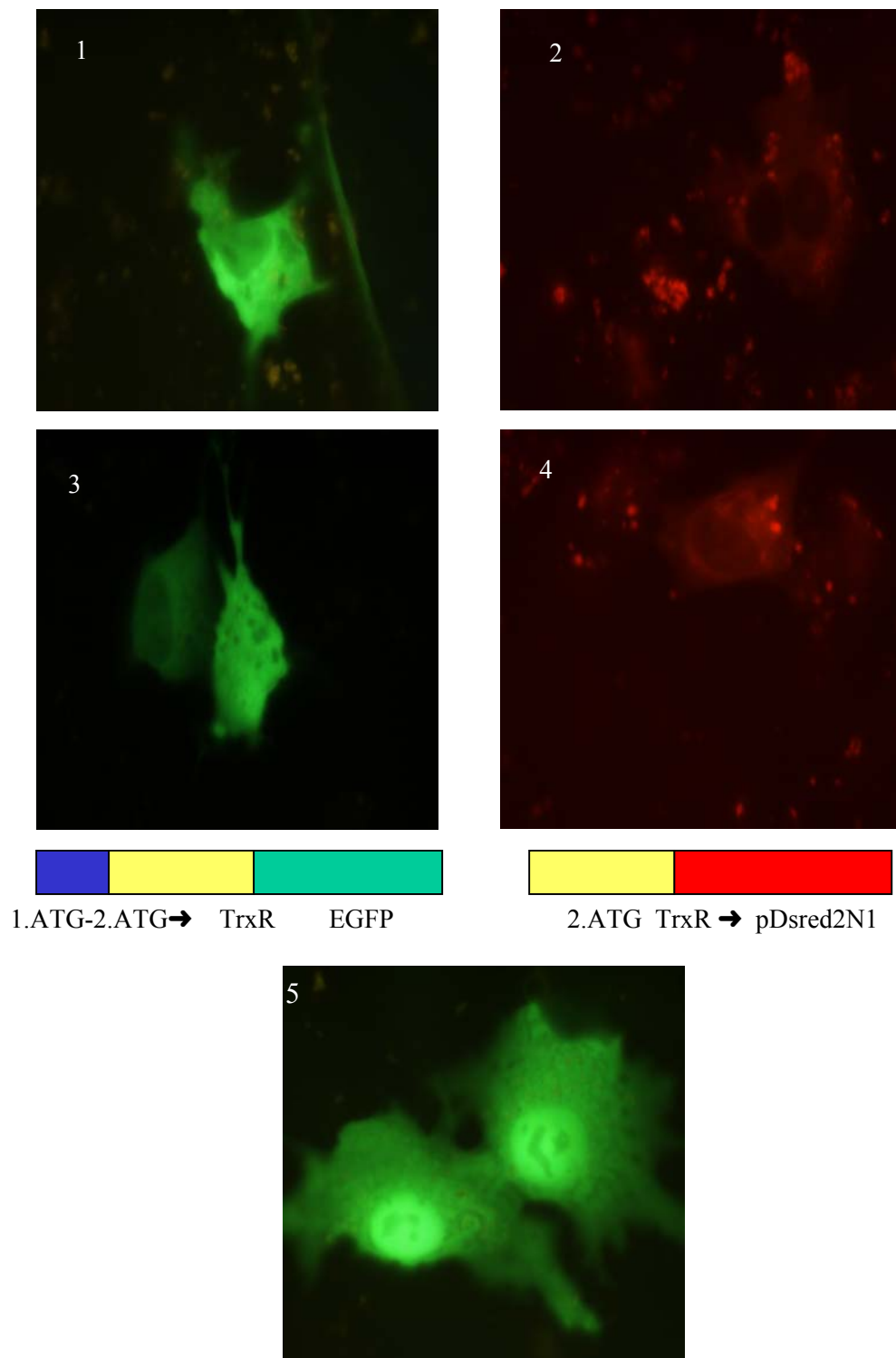


Abb. 18) Transiente Transfektion von Fusionsproteinen in **HepG2**-Zellen. Das Lokalisationsmuster von TrxR (1. ATG) und TrxR (2.ATG) ist in HepG2-Zellen besonders unterschiedlich. Das Fusionsprotein vom 2.ATG zeigt ein ausgeprägtes granuläres Muster im Zytosol. Die Zellen wurden separat mit den beiden Konstrukten transfiziert. 1 und 3: TrxR (1ATG)-N1-EGFP, 63x; 2 und 4: TrxR (2ATG)-pDsred2N1, 63x; 5: N1-EGFP allein (Olympus-Fluoreszenz-Mikroskop)

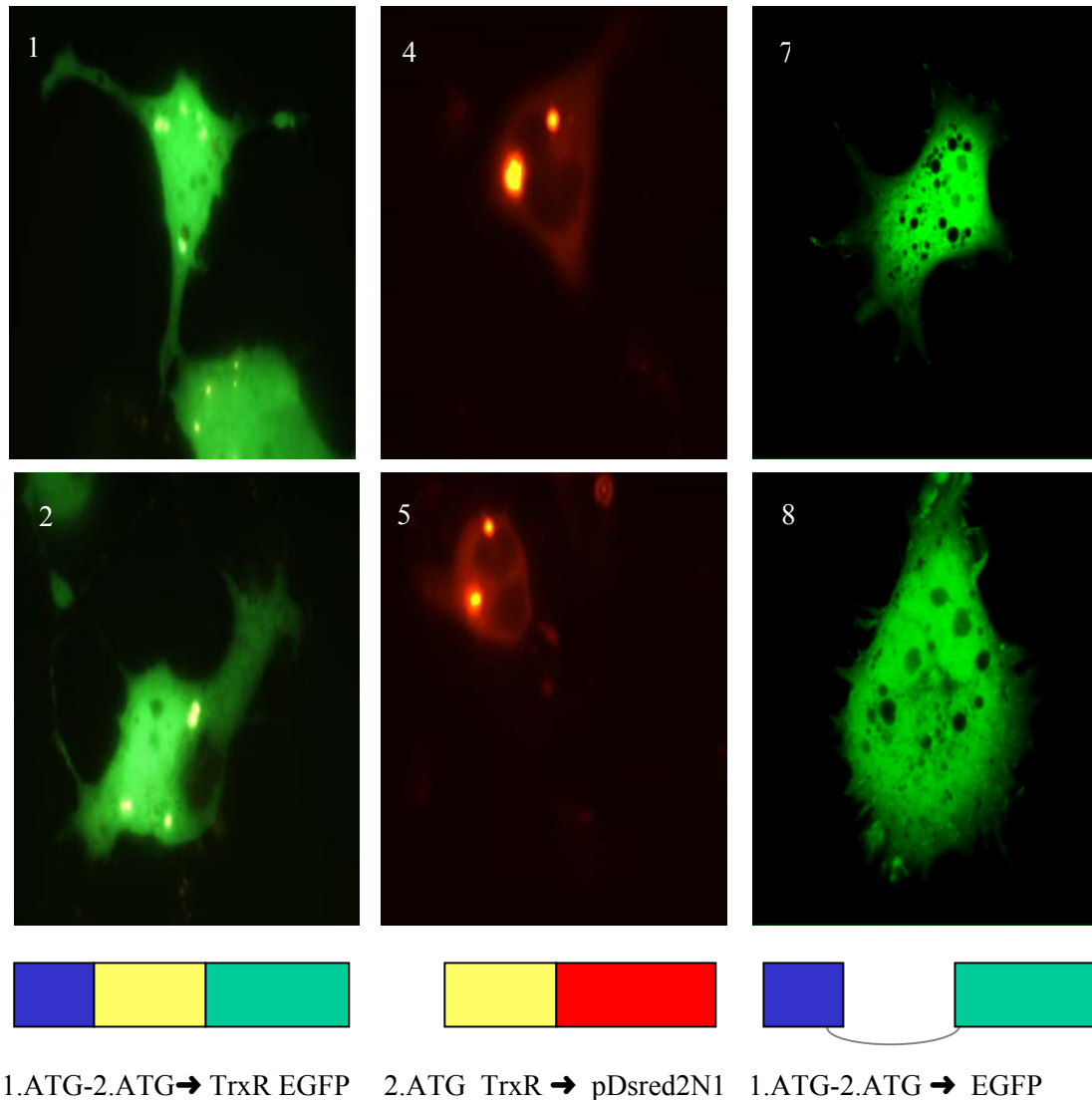


Abb. 19) Transiente Transfektion von Fusionsproteinen in **COS7**-Zellen. Die Konstrukte TrxR (1.ATG)-N1-EGFP und TrxR (2.ATG1)-pDsRed2N1 wurden separat transfiziert in unterschiedlichen Farben (siehe obenstehende Schema-Zeichnungen). Die Transfektion des kleinen Fragments (1.ATG-2.ATG TrxR) unterscheidet sich besonders deutlich von TrxR 2.ATG. In einer Reihe befinden sich verschiedene Zellen. 1, 2: TrxR (1.ATG)-N1-EGFP, Fluoreszenzmikroskop, 63x; 4, 5: TrxR (2.ATG)-N1-EGFP-Fluoreszenzmikroskop, 63x; 7, 8: SP-TrxR (1.ATG-2.ATG)-N1-EGFP-konfokales Mikroskop 100x.

2.2.2 Immunfluoreszenz an Kulturzellen für TrxR1

Um die EGFP-Daten zu verifizieren, wurden Immunfluoreszenzversuche durchgeführt. HFOB-, MG63- und T/C28a2-Zellen wurden auf Deckgläschen in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml ausgesät und am nächsten Tag mittels Immunfluoreszenz gefärbt. Verwendet wurde ein Anti-TrxR Antikörper aus Kaninchen als erster Antikörper und als zweiter Antikörper ein Cy3-markierter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Abbildung 20). In jeder Reihe handelt es sich jeweils um dieselbe Zelle. Der mit DAPI gefärbte Kern wurde auch mit dem spezifischen Antikörper gegen TrxR gefärbt. Zusätzlich wurde auch das Zytosol angefärbt, welches allerdings schwächere Signale hat als der Nucleus. Die Bilder wurden mit einem Olympus-Fluoreszenzmikroskop aufgenommen (63x Vergrößerung).

Diese Zellen wurden auch mit einem Leica TCS NT konfokalen Mikroskop untersucht und fotografiert. In Abbildung 21 sind hFOB, MG63 und COS7-Zellen dargestellt. Es bestätigt sich die Lokalisation im Zellkern und Zytosol.

Die Färbung von T/C28a2-Zellen (Abb. 22) zeigte verschiedene Muster: Zellen, bei denen der Antikörper gegen TrxR vorwiegend den Kern anfärbt, und Zellen bei welchen der Kern ausgespart wurde (Aufarbeitung wie in Abb. 21).

HepG2-Zellen wurden auch nach dem selben Protokoll für die Immunfärbung (Material und Methoden 2.4) mit Antikörper gegen TrxR bzw. Trx angefärbt. Die Präparate wurden mit einem Olympus-Fluoreszenzmikroskop (Abb. 23) aufgenommen bzw. mit dem Leica TCS NT konfokalen Mikroskop (Abb. 24). In Abbildung 23 färbt TrxR-Cy3 in nur wenigen Zellen die mit DAPI gefärbten Kerne an, den meisten Zellen ist die Färbung nur zytosolisch vorhanden. In einer Reihe befinden sich identische Zellen. Ähnliches Muster zeigten auch die TERT4-Zellen (Daten hier nicht gezeigt). Immunfluoreszenzuntersuchungen sollen in den fortführenden Arbeiten zeigen, ob die nucleäre Lokalisation sich z. B. auch Zell-Zyklus-assoziiert verändert.

Die Präparate wurden auch mit dem konfokalen Mikroskop untersucht. Es zeigte sich ebenfalls eine zytosolische Verteilung. Ausnahmen finden sich in Bild 2. Es wurde der selbe Antikörper gegen TrxR bzw. der Cy3-markierte Anti-Kaninchen-Antikörper verwendet. Links sind die HepG2-Zellen mit Texas Färbung und rechts Bilder im Phasenkontrast dargestellt.

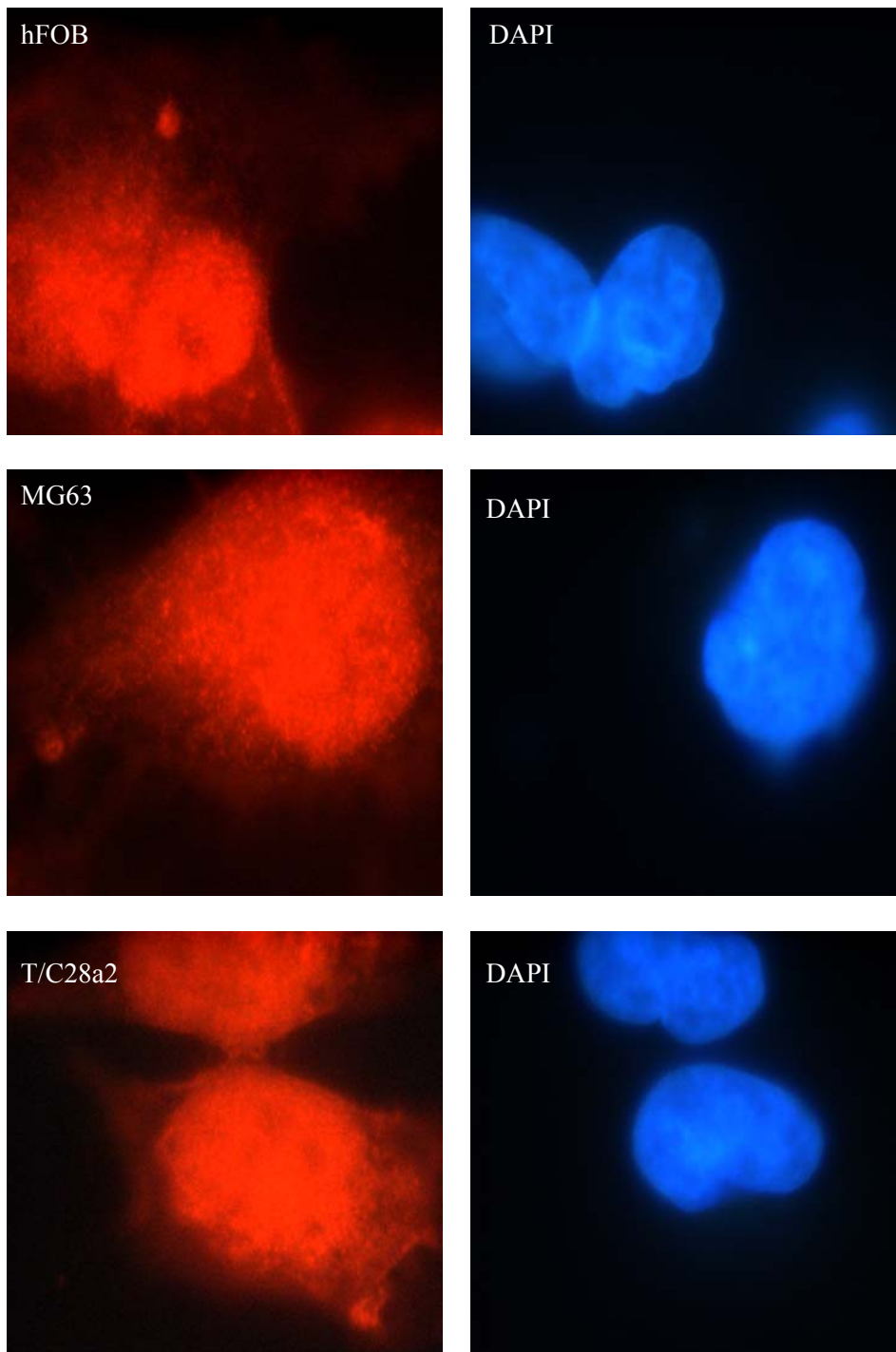


Abb. 20) Immunfluoreszenz in verschiedenen Zelllinien; rechts mit TrxR Antikörper, gekoppelt mit Cy3 und links DAPI-Färbung, 100x. In einer Reihe befinden sich jeweils identische Zellen.

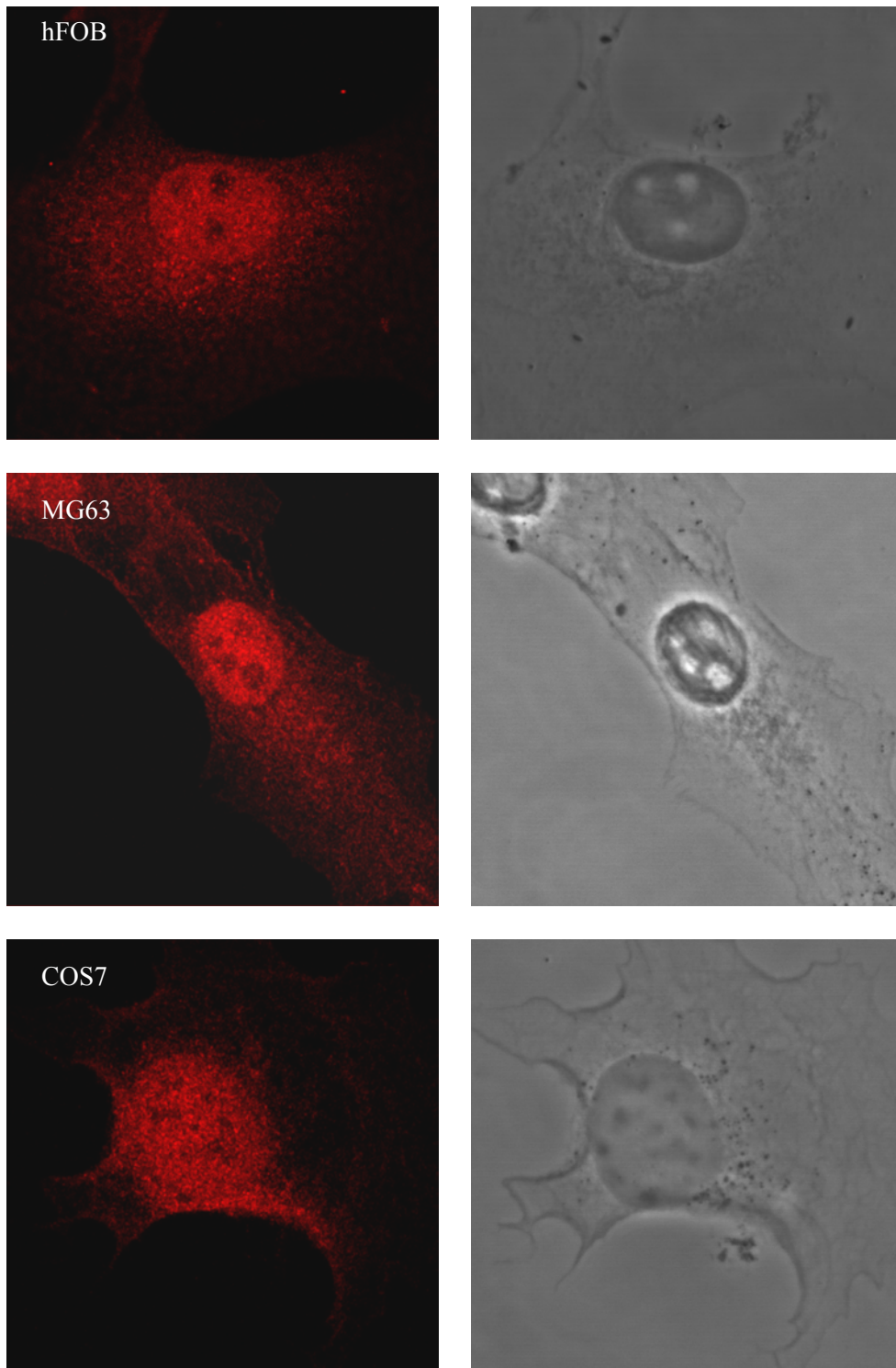


Abb. 21) Färbung von hFOB, MG63 und COS7-Zellen mit TrxR-Anti-Kaninchen Cy3 Antikörper; die Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Mikroskop angefertigt (links Immunfluoreszenz, rechts Phasenkontrast-Darstellung derselben Zelle; Bilder 100x).

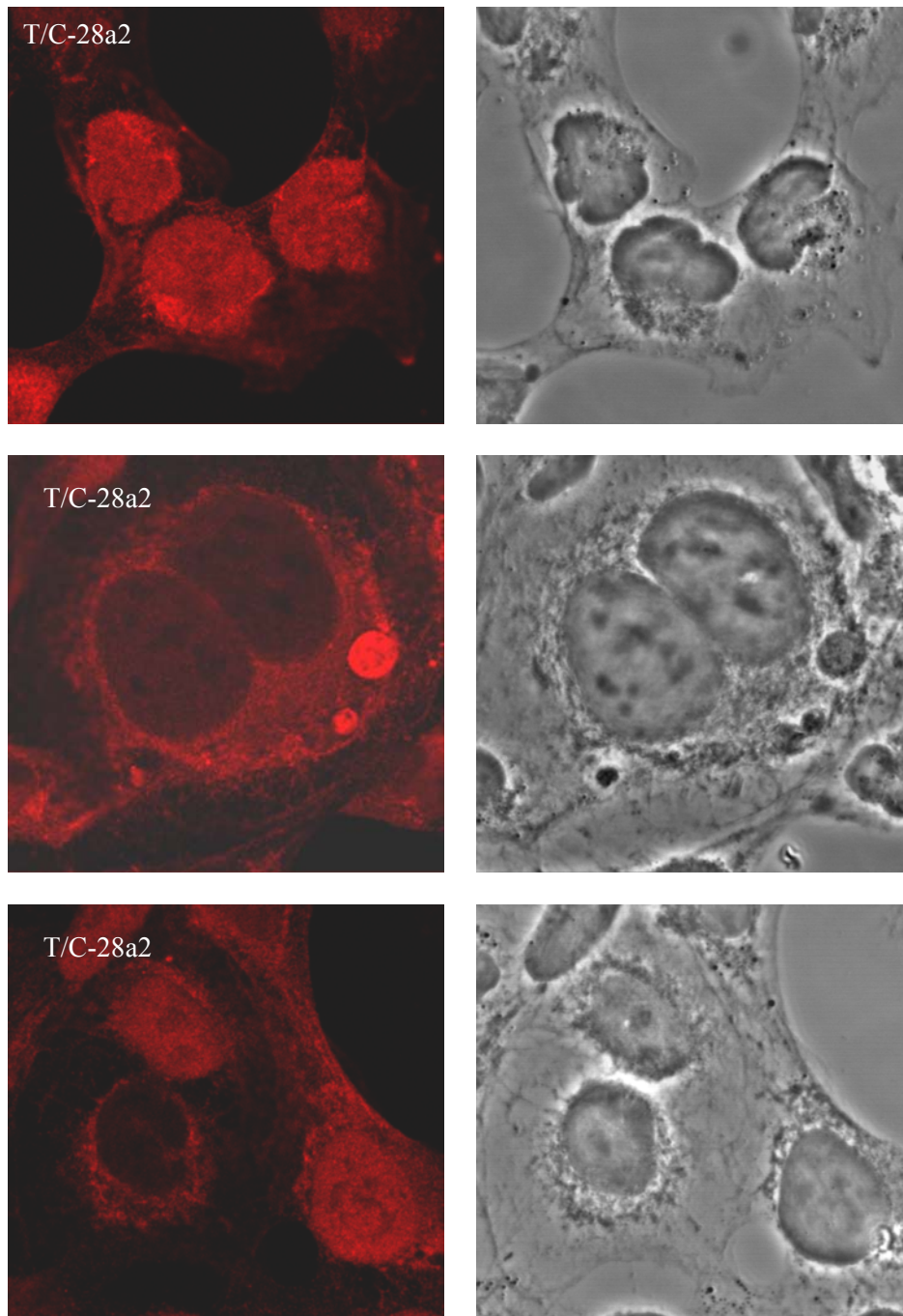


Abb. 22) Immunfluoreszenz in T/C-28a2-Zellen mit Antikörper gegen TrxR; Bilder wurden mit einem Leica TCS NT konfokalen Mikroskop angefertigt. Links Texas Färbung, rechts Bilder im Phasenkontrast, 100x. Es findet sich sowohl zytosolische als auch nucleäre Färbung. Vereinzelt stellen sich auch zytosolische Granula verstärkt gefärbt dar.

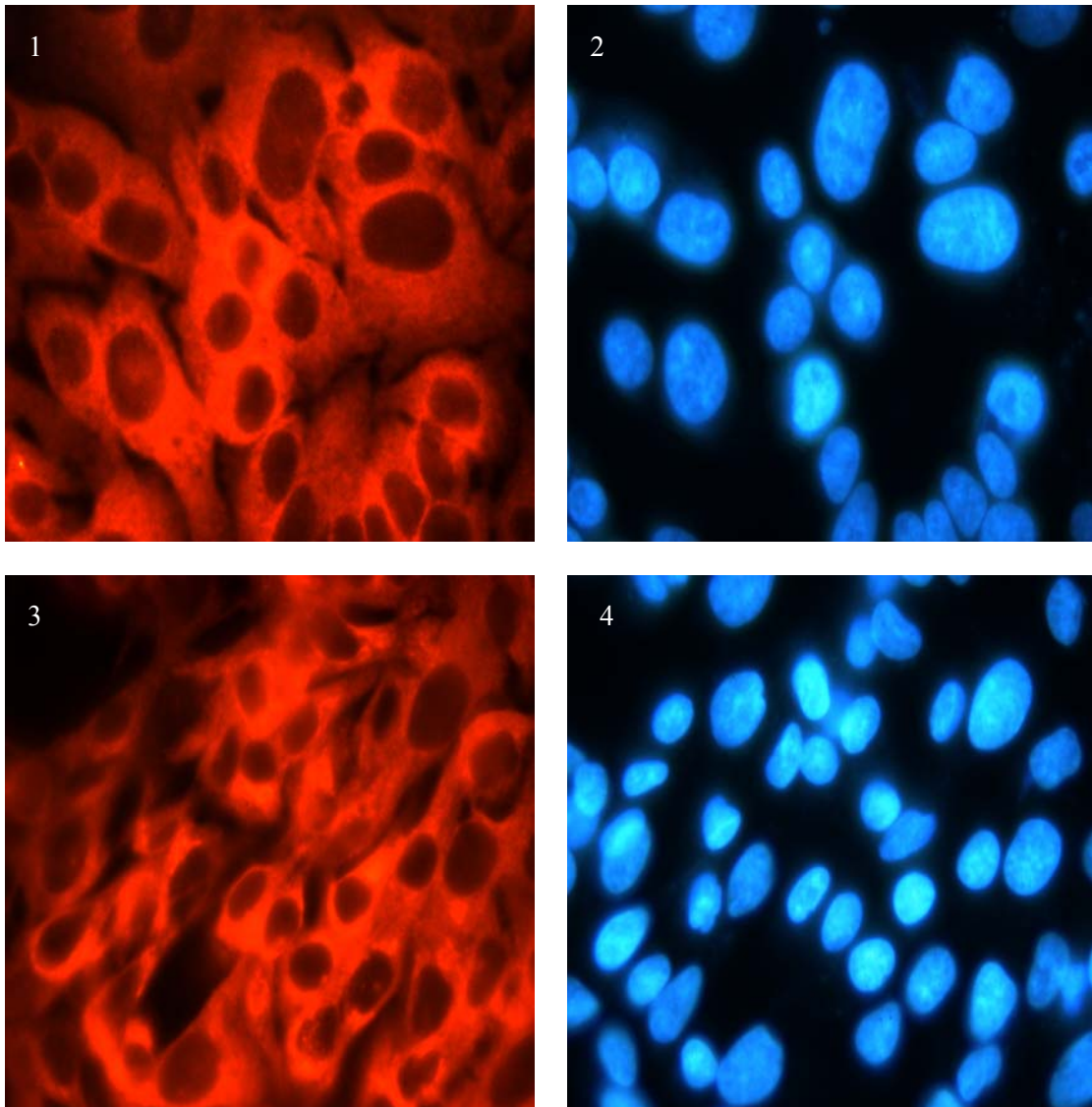


Abb. 23) Immunfluoreszenzmikroskopie in HepG2-Zellen unter Anwendung von Antikörper gegen TrxR-1 (1), 63x und Trx (3): 1, 3: Texas-Färbung; 2,4: DAPI-Färbung. In jeder Reihe befinden sich identische Zellen.

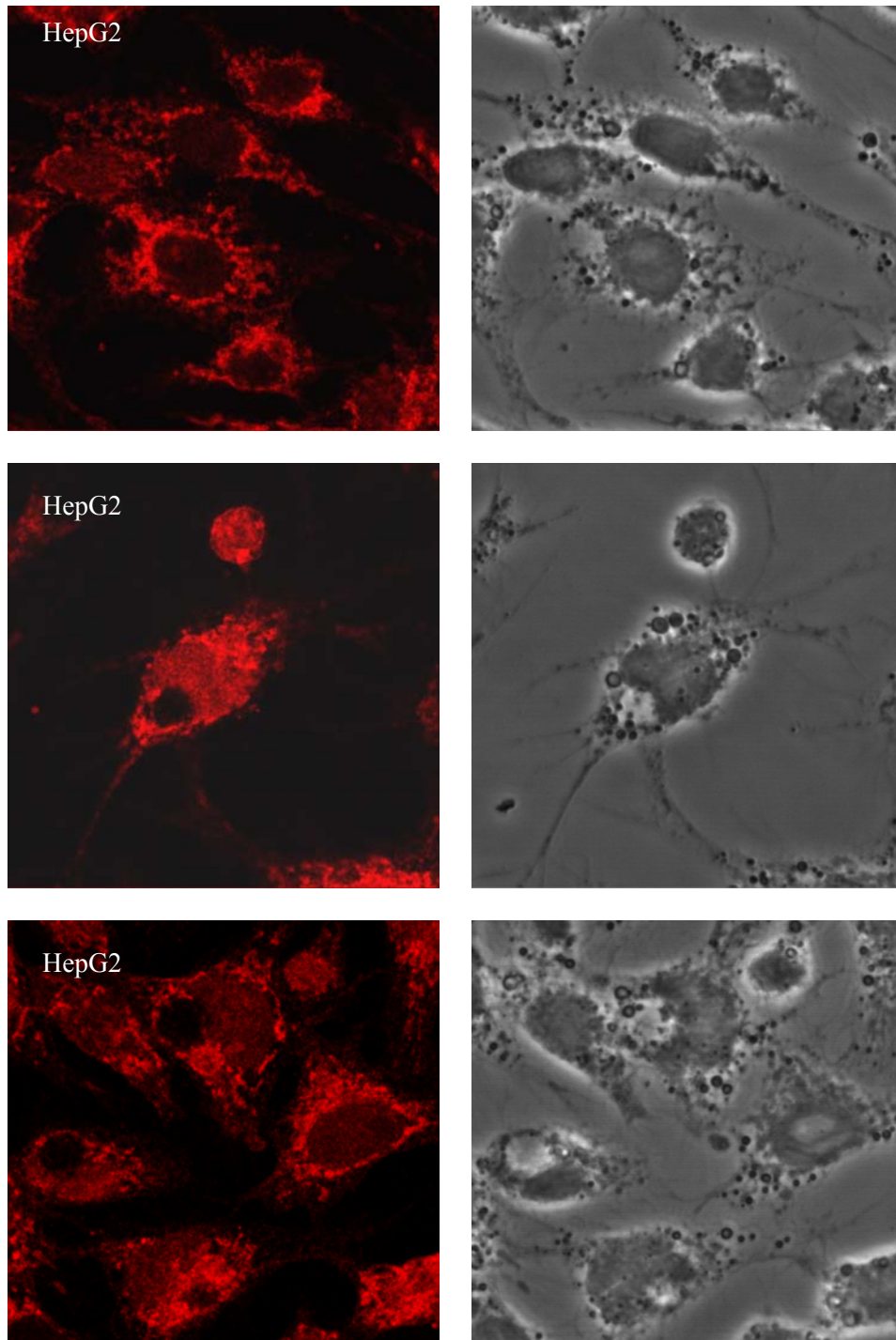


Abb. 24) Färbung von HepG2-Zellen mit TrxR-Antikörper und einem Cy3-markierten Anti-Kaninchen Antikörper; in einer Reihe befinden sich jeweils identische Zellen. Die Bilder sind mit einem Leica TCS NT-konfokalen Mikroskop aufgenommen. Links ist die Immunfluoreszenz-Färbung zu sehen, rechts sind die Zellen in Phasenkontrast dargestellt.

2.3 Kolokalisation des Trx/TrxR-Systems und Topoisomerase I

In verschiedenen Zelllinien wurden parallel transiente Transfektionen, Immunfluoreszenz- und DAPI-Färbungen durchgeführt und die Zellen mittels eines konfokalen Leica TCS NT-Mikroskopes untersucht. Innerhalb des Nucleus ergaben sich keine offensichtlichen Unterschiede im Verteilungsmuster des Systems Trx/TrxR und Topoisomerase I, wobei die Immunfluoreszenz-Färbung des Systems zeigte, dass die Nucleoli ausgespart waren. Topoisomerase I hingegen ist bekannt, in den Nucleoli lokalisiert zu sein. Die beiden Komponenten des Trx/TrxR-Systems in den untersuchten Zellen kolokalisieren, wie in Abbildung 25 in COS7-Zellen dargestellt wird.

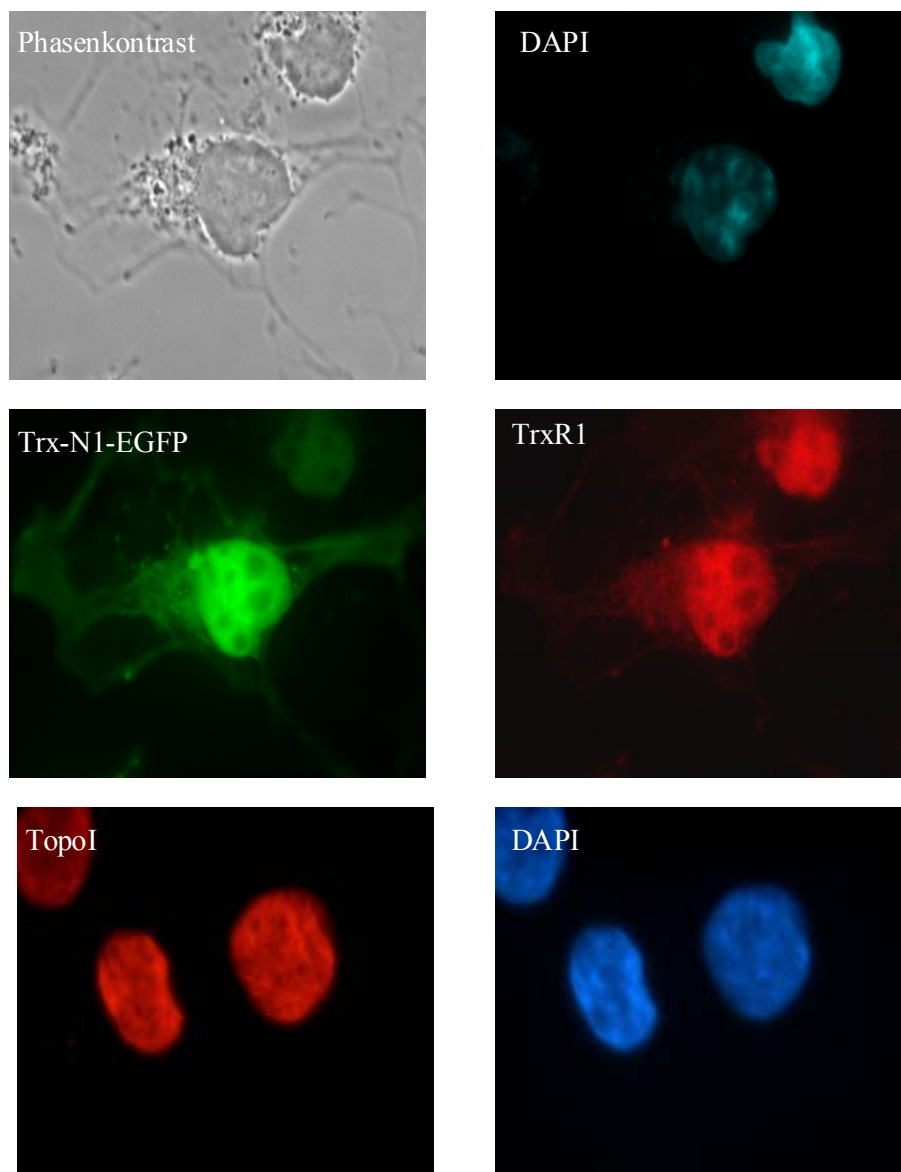


Abb. 25) Subzelluläre Lokalisation von Trx, TrxR und Topoisomerase I in COS 7-Zellen. Trx und TrxR kolokalisieren in allen untersuchten Systemen, hier gezeigt in COS7-Zellen. Topoisomerase I hat ein nucleäres Verteilungsmuster und ist in den Nucleoli lokalisiert.

3 Charakterisierung von nucleären Interaktionspartnern der TrxR

Zur Isolation putativer nucleärer Interaktionspartner der TrxR wurde ein "pull-down Assay" unter Verwendung von Protein A-Agarose und TrxR-Antikörper durchgeführt. Es wurde eine Prozedur für die Gewinnung sauberer Kernpräparationen etabliert, anhand derer wurden von verschiedenen Zelllinien Kernextrakte hergestellt. Diese wurden mit Antikörper gegen TrxR versetzt und mit Protein A-Agarose vermischt. Nach verschiedenen Waschschrritten wurde das Immunpräzipitat durch SDS von der Säule eluiert, auf ein SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Der Proteinnachweis erfolgte auf verschiedenen Membranen durch Silverfärbung und Westernblot. Parallel wurden auch (Spuren 6, 7 und 8) das aus Plazenta gereinigte TrxR, der im Kaninchen hergestellte Antikörper gegen TrxR und die Kernextrakte mit dem Protein A aufgetragen. Die Ergebnisse werden in Abbildung 26 zusammengefasst:

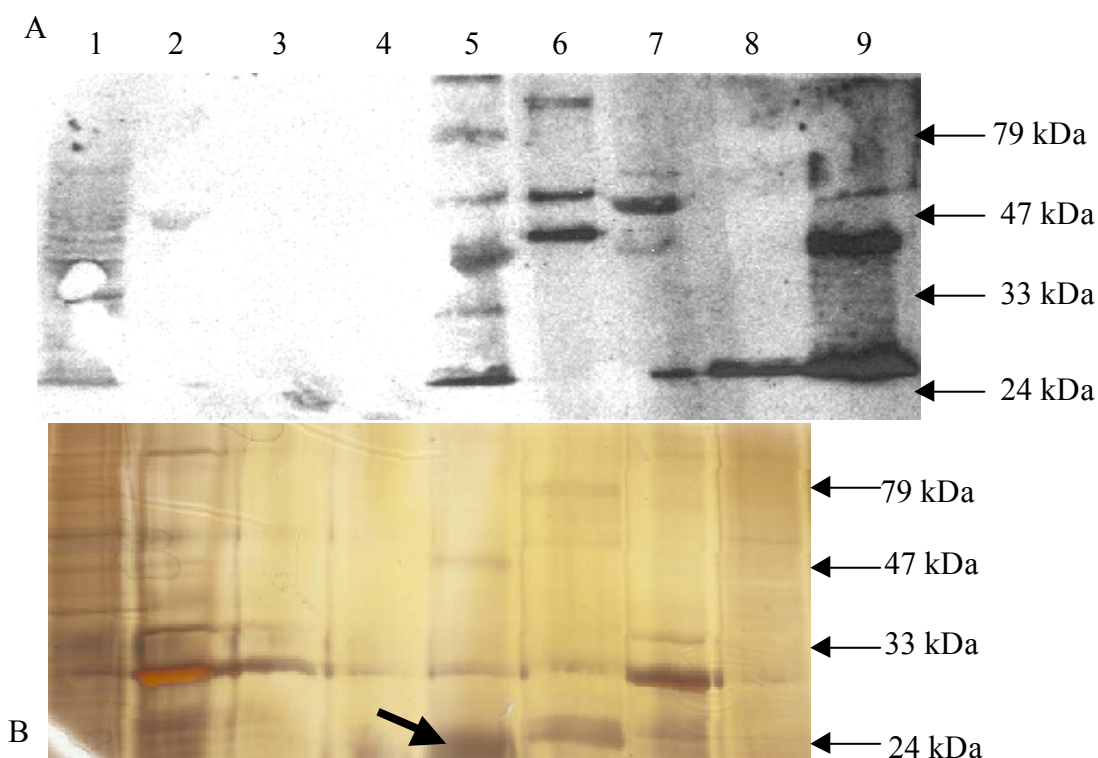


Abb. 26) Immunadsorptionsversuche zur Isolation von Proteinen und zur Charakterisierung von Protein/Protein-Wechselwirkungen mittels Protein A-Agarose und Antikörper gegen TrxR. A: Westernblotanalyse unter Verwendung von Antikörpern gegen TrxR. B: Silberfärbung. Aufgetragene Proben: 1: Kernextrakte von hFOB-Zellen; 2: Wasch 1; 3: Wasch 2; 4: Wasch 3; 5: Prot.A-Agarose-Komplex; 6: humane TrxR; 7: Antikörper gegen TrxR; 8: Protein A-Sepharose und Kernextrakte; 9: Protein A, Kernextrakte und Antikörper gegen TrxR.

Es konnte ein Protein isoliert werden von ungefähr 20 kDa (Abb.26).

Da die Interaktion zwischen Proteinen durch die Salzkonzentration beeinflusst wird, wurde ein ähnliches Experiment wie in Abb. 26 mit 0,1 M NaCl durchgeführt. Es zeigte sich, dass unter diesen Bedingungen (100 mM statt 300 mM) mehrere Proteine kopurifiziert werden konnten, die mit der TrxR interagieren (Abb. 27, Spur 2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt. Der Westernblot eines "pull-down-Assays" mit Topoisomerase I unter Verwendung von Antikörper gegen TrxR ist in Abbildung 28 gezeigt.

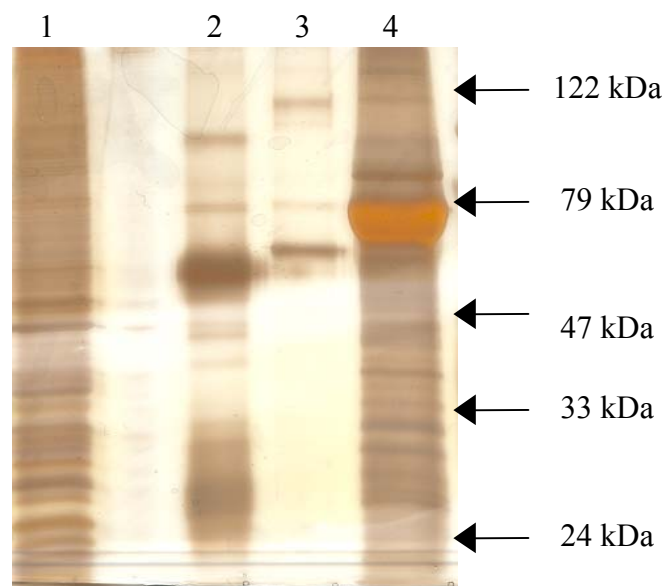


Abb. 27) Pull-down-Assay unter Verwendung von Antikörper gegen TrxR. Mittels niedriger Salzkonzentration (0,1 M NaCl) konnten mehrere Proteine gebunden an den Komplex isoliert werden. 1: Kernextrakte; 2: Protein A-Agarose-Komplex; 3: humane TrxR; 4: Antikörper.

Um zu untersuchen, ob in einem "pull-down Assay" unter Verwendung eines Antikörpers gegen Topoisomerase I umgekehrt auch TrxR kopurifiziert, wurde ein Eluat eines solchen Experiments aus der Arbeitsgruppe Boege im Westernblot untersucht (Straub *et al.*, 1998). Unter Verwendung von Antikörper gegen TrxR konnte man mehrere Banden unterscheiden: eine Bande welche der Größe der hTrxR entspricht (ca. 55 kDa) und weitere zwei Banden, eine von ca. 100 kDa. Diese könnte ein Dimer der TrxR oder ein Komplex zwischen TrxR und anderen nucleären Proteinen sein. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 28 dargestellt.

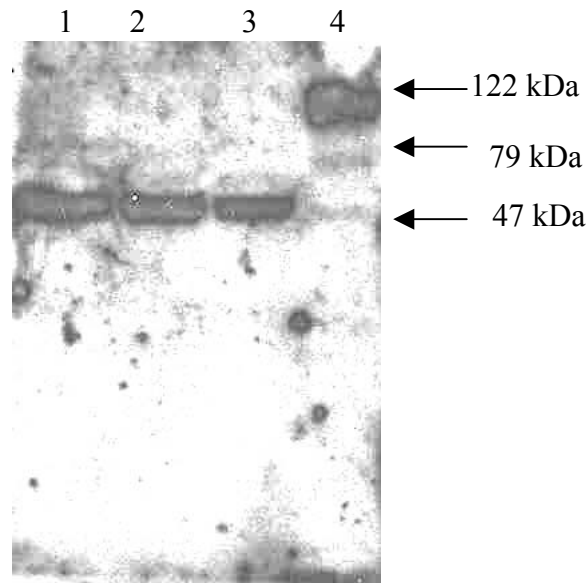


Abb. 28) Immunchemische Darstellung der Expression von endogener TrxR bzw. Charakterisierung von Protein/Protein-Wechselwirkungen unter Verwendung von Antikörper gegen TrxR. 1, 2 und 3: Kernextrakte präpariert mit zunehmender Salzkonzentration (100 mM, 200 mM und 300 mM); 4: Proteinkomplex kopurifiziert mit Antikörper gegen Topoisomerase I. In der 4. Spur unterscheidet sich eine Bande welche der Größe der hTrxR entspricht (ca. 55 kDa) und weitere zwei Banden, eine von ca. 100 kDa. Diese könnte ein Dimer der TrxR oder ein Komplex zwischen TrxR und anderen nucleären Proteinen sein.

4 TrxR und DNA-prozessierende Enzyme

Da sich durch die bisher gezeigten Experimenten die Annahme einer physikalischen Interaktion der beiden Proteinen bestätigte, wurde in Folgenden die Frage untersucht, ob auch eine Funktionelle Interaktion vorliegt. Hierzu wurden Topoisomerase Assays in Anwesenheit und Abwesenheit von TrxR wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt.

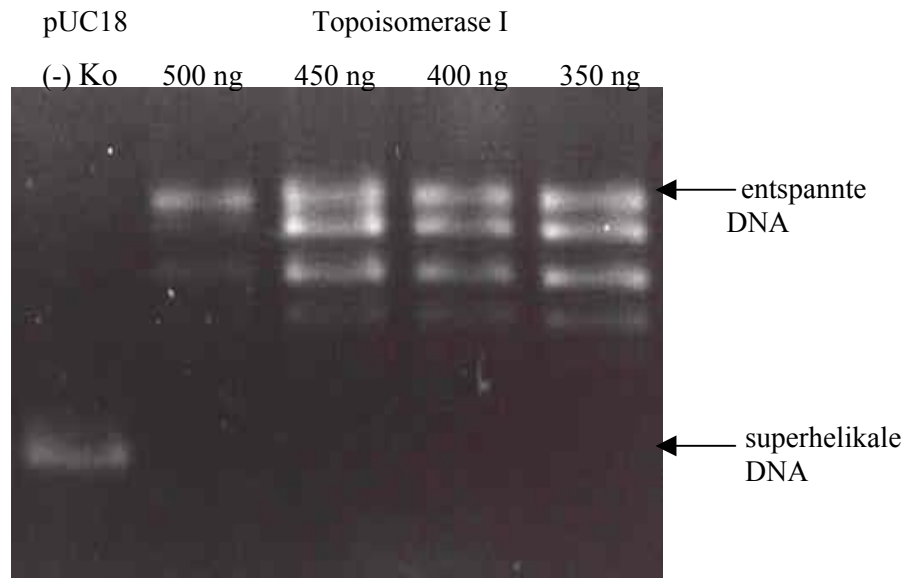


Abb. 29) Topoisomerase-Assay. Die relaxierte Form migriert langsamer, die superhelikale schneller entsprechend der negativen Kontrolle. Die Zwischenstufen entsprechen verschiedenen Relaxationszuständen. Es wurden absteigende Konzentrationen an Topoisomerase I verwendet.

Es wurden Versuche durchgeführt mit zunehmender Konzentration von Topoisomerase I und 150 ng an pUC18 Vektor als Substrat (Abb. 29). Die Ansätze wurden im Agarose-Gel ohne Ethidiumbromid aufgetrennt. Die DNA konnte sichtbar gemacht werden durch Nachfärbung des Geles. Man konnte einen relaxierten (entspannten) Zustand erkennen, der am langsamsten migriert, einen supercoiled, welcher am schnellsten migriert und Zwischenstufen, welche verschiedenen Relaxationsstufen entsprechen. Bei der höchsten Topoisomerase I-Konzentration wird die maximale Relaxation beobachtet.

Es wurden auch Experimente durchgeführt, bei welchen statt Topoisomerase I TrxR verwendet wurde. Das Muster für die Relaxation sah anders aus (Abb. 30 und 31). Um die Ergebnisse zu bestätigen wurde dann der selbe Vektor mit einer Mutante von TrxR, welche statt der Aminosäure Selenocystein in der 498-Stelle ein Cystein hatte, inkubiert. Es war weder eine Relaxation der DNA zu beobachten, noch das Muster

vorhanden, das TrxR (aktive Form) zeigte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 dargestellt.

Um die Ergebnisse besser sichtbar zu machen wurden die selben Versuche wiederholt und der Effekt von Topoisomerase I und TrxR verglichen.

pUC18	Topoisomerase I (ng)					TrxR1(ng)				
(-)Ko	2,5	3,3	5	6,6	10	50	100	150	200	250

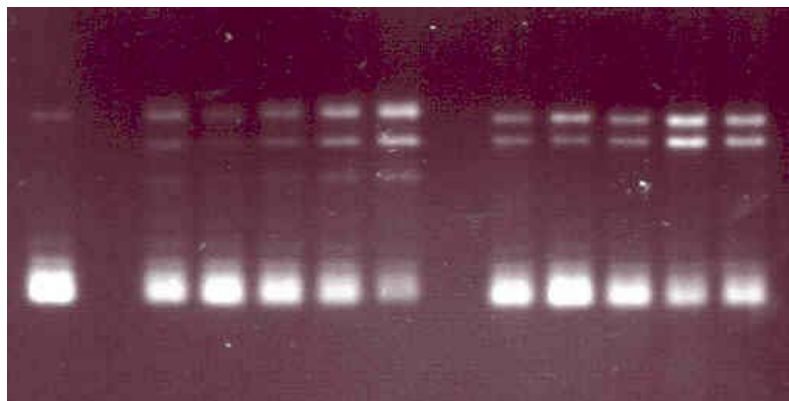


Abb. 30) Relaxationsversuch mit Topoisomerase I links und mit gereinigter TrxR rechts. Es wurden ansteigende Konzentrationen von rekombinantem Topoisomerase I und TrxR verwendet und 150 ng pUC18-Vektor. (Die Konzentrationen sind in ng).

Als nächster Schritt wurden zunehmende Konzentrationen von Topoisomerase I und gleichzeitig von TrxR (aktive Form) verwendet, um zu überprüfen ob es Wechselwirkungen zwischen den Enzymen gibt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 dargestellt.

Die Topoisomerase I führt zur Relaxation der DNA. Man unterscheidet im Gel verschiedene Zustände des Vektors: als Negativkontrolle dient die supercoiled Form, welche der superhelikalen DNA entspricht. Sie wandert am schnellsten und kann als eine einzige Bande identifiziert werden; die total relaxierte Form entspricht der Relaxation des Vektors, ist der Beweis für die maximale Topoisomerase I-Aktivität und wird als die langsamste Bande im Gel identifiziert; die dazwischenliegenden Zustände entsprechen verschiedenen Relaxationsstufen zwischen totaler Entspannung und totaler Verdrillung; sie werden als multiple Banden im Gel identifiziert.

pUC18 gereinigte TrxR1 (ng) TrxR-inaktive Form (ng)
 (-) Ko 50 100 150 200 250 50 100 150 200 250

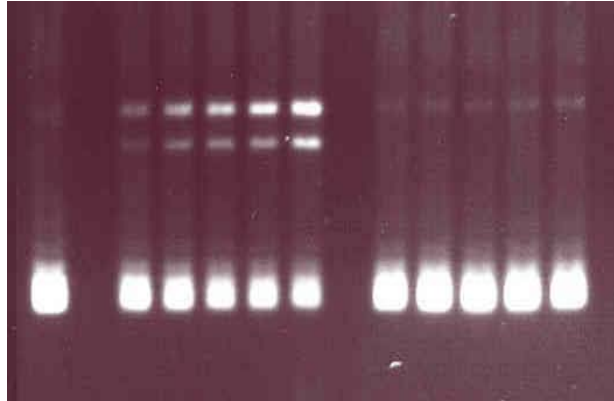


Abb. 31) Relaxationsversuch unter Verwendung von pUC18 Vektor (150 ng) und TrxR1 (links: gereinigte, aktive Form; rechts: mutierte, inaktive Form). Es wurden separat ansteigende Konzentrationen von TrxR1 (aktive und inaktive Form) verwendet.

TopoI	-	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng
TrxR1	-	50 ng	100 ng	150 ng	200 ng	250 ng
pUC18	150 ng	150 ng	150 ng	150 ng	150 ng	150 ng

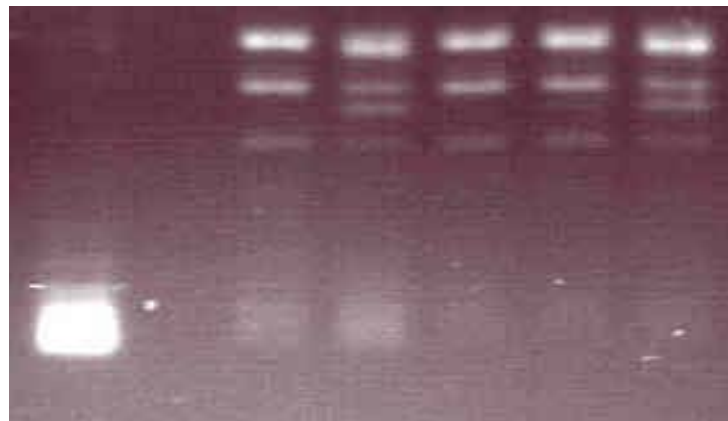


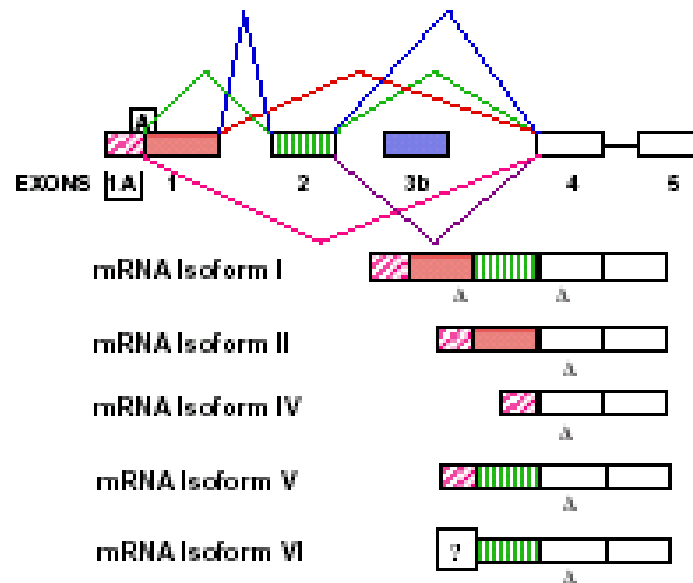
Abb. 32) Topoisomerase I Assay in Anwesenheit von TrxR1 (aktive Form). Es wurden eine konstante Konzentration von Topoisomerase I (10 ng) und ansteigende Mengen an TrxR1 verwendet.

E. Diskussion

1 Molekularbiologie und Proteinstruktur der TrxR1

Das Enzymsystem Thioredoxin-Thioredoxin Reduktase ist aktiv bei der Proteinfaltung, der Ribonucleotidsynthese und der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Steroidhormonrezeptoren (Kortikoid-, Östrogen-Rezeptor), AP-1 und NFκB (Karimpour *et al.*, 2002; Harper, 2001). Als Bestandteil der antioxidativen Systeme der Zelle und gleichzeitig der Ribonucleotid-Synthese bei Zellproliferation erfüllt das System alle Voraussetzungen, eine wichtige Rolle auch bei der DNA-Prozessierung im Rahmen von Zellteilung und DNA-Reparatur zu spielen. Das Muster der Selenoprotein-Expression in verschiedenen Zelllinien war bereits in Vorarbeiten beschrieben worden (Dreher *et al.*, 1997, Jakob *et al.*, 2002). Die Thioredoxin Reduktase 1 (TrxR1) wurde 1995 von Gasdaska *et al.* aus humaner Plazenta kloniert und ein Jahr später aus T-Zellen und Adenokarzinom-Zellen als Selenoprotein identifiziert (Gladyshev *et al.* 1996, Tamura *et al.*, 1995). Koishi *et al.*, 1997 haben eine neue Oxidoreduktase humaner Stromazellen des Knochenmarks kloniert, welche in COS7-Zellen und in den humanen Lungen-Adenokarzinoma-Zellen (A549) transfiziert wurde, und als KDRF (KM-102-derived Reductase-like Faktor) bezeichnet wurde. Miranda-Vizuete *et al.*, 1997 deuteten darauf hin, dass diese jedoch mit der Sequenz der TrxR1 der humanen Plazenta identisch wäre. Im Nachhinein kann man feststellen, dass es sich hier lediglich um die beiden Isoformen des Enzyms handelt, die in Folgenden ausführlich diskutiert werden sollen (unterschiedliche ATG-Start-Codons). Das Enzym setzt sich somit aus homodimeren 55 kDa bzw. 60k Da Untereinheiten aus je 499 Aminosäuren zusammen, wobei sich jeweils an Position 498 ein Selenocystein befindet. Die Dimerisation von Isoformen ist denkbar. Osborne *et al.* haben 2001 die alternativen Spleißvarianten der TrxR1 in Ratten und Menschen beschrieben (siehe Abb. 33). Nach diesen Autoren gibt es verschiedene mRNA-Isoformen, die sich am 5'-Ende unterscheiden und putative Proteine verschiedenen Molekulargewichts kodieren. Nur die Isoformen I und II enthalten die beiden verschiedenen ATG (in Exon 1 und Exon 4). Bei den Isoformen III-VI ist nur Exon 4 enthalten, somit kein PCR-Produkt mit Primern im Exon 1 zu erwarten. Damit kann nur aus den Isoformen 1 und 2 ein grösseres Protein entstehen. Die Translation vom in Exon 4 befindlichen ATG führt zur ursprünglich beschriebenen

TrxR1 (TrxR1-2ATG), während die Translation von dem ersten 5' gelegenen ATG



(TrxR1-1ATG) ein 60 kDa-Protein als Produkt hat.

Abb. 33) mRNA-Isoformen und alternative Spleiß-Stellen von humaner TrxR1 (modifiziert nach Osborne *et al.*, 2001)

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich nun mit den mRNA-Isoformen und Protein-Isoformen. Das PCR-Produkt vom ersten ATG bis zum Stop-Codon wird in der vorliegenden Arbeit Amplikon ATG1 genannt, das vom zweiten ATG ausgehende Amplikon ATG2. Es konnte festgestellt werden, dass die zwei Amplikons in unterschiedlichem Ausmaß vorhanden sind, wahrscheinlich abhängig von den mRNA-Isoformen. In hFOB- und HEK293-Zellen, wo wahrscheinlich die Isoformen III-VI überwiegend vorhanden waren, war Amplikon ATG2 vermehrt vorhanden und in HepG2- und T/C-28a2-Zellen kamen beide Produkte etwa im gleichen Ausmaß vor. Auch im Westernblot (Zytosol von hFOB-Zellen und Kernextrakte von MG63) konnten zwei Protein-Isoformen abhängig von den mRNA-Isoformen nachgewiesen werden. Zweifelsfrei gibt es wie berichtet unterschiedliche mRNA-Species (Osborne *et al.*, 2001).

Aus dieser Tatsache entsteht eine weitere zu überprüfende Arbeitshypothese, nach der die entstehenden Proteine möglicherweise unterschiedliche Lokalisationssequenzen in sich tragen.

2 Subzelluläre Lokalisation des Trx/TrxR-Systems, Isoformen der TrxR1 und mögliche Lokalisationssequenzen

2.1 Subzelluläre Lokalisation

2.1.1 Subzelluläre Lokalisation von Thioredoxin

Die Lokalisation des Systems wurde in der hier vorliegenden Arbeit durch zwei Methoden untersucht: durch transiente Transfektion und durch Immunhistochemie.

Thioredoxin 1 wurde aus cDNA von HepG2-Zellen amplifiziert und in den N1-EGFP, C1-EGFP und pDsRed2-N1 Expressionsvektor kloniert. Das Protein wurde dann in verschiedenen Zelllinien exprimiert. Um die Expression des gewünschten Gens zu überprüfen wurde das Protein durch Westernblot und SDS-PAGE analysiert. Der Westernblot (Abb. 9) zeigte in COS7-Zellen zwei Banden entsprechend dem Trx-N1-EGFP-Fusionsprotein und dem N1-EGFP allein, deshalb wurde als nächster Schritt das interne ATG-Codon des Vektors mutiert. Das neue Konstrukt wurde dann in COS7-Zellen, HepG2-Zellen und hFOB-Zellen transient transfiziert. Die Durchführung eines Westernblots mit den Fusionsproteinen von hFOB-Zellen wies nun eine einzige Bande auf, welche dem Trx-N1-EGFP entspricht. Die Transfektion dieser Konstrukte in COS7-Zellen zeigte ein ähnliches Muster für Trx-C1-EGFP und Trx-N1-EGFP-Fusionsproteine und zwar hauptsächlich eine nucleäre Lokalisation. Die Expression von Trx-pDsRed2-N1 in HepG2-Zellen zeigte verschiedene Muster: Zellen, in denen Trx vorwiegend zytosolisch war oder nucleär.

Anhand des Immunostaining mit Antikörper gegen Trx konnte man die gleiche Verteilung beweisen. Das Immunostaining von mit H₂O₂ behandelten Zellen mit Antikörper gegen Trx zeigte das selbe Muster wie in unbehandelten. (Daten nicht gezeigt)

Diese Befunde stimmen nicht ganz mit der Literatur überein. Die nucleäre Translokation wird vermittelt durch H₂O₂, PMA oder TNF α Behandlung. Funktionell scheint Trx Transkriptionsfaktoren-Aktivität zu modulieren wie z.B. AP-1 (activator protein) (Hirota *et al.*, 1997, 1999; Wie *et al.*, 2000; Soini *et al.*, 2001). Die hier

untersuchten Zellsysteme zeigen überwiegend primär nucleäre Lokalisation von Trx. Es ist möglich, dass dies mit dem Stress der Zellen durch die Kulturbedingungen alleine oder durch die Experimente selbst zusammenhängt.

Es gibt seit kurzem (Karimpour *et al.*, 2002) Beweise für eine neue Funktion der Thioredoxin Reduktase 1. Diese sollte als Antwort auf ionisierende Strahlen via Cystein-Rest die AP-1-Aktivität regulieren. Der Mechanismus dieser Regulierung soll mit der subzellulären Lokalisation von Thioredoxin verknüpft werden.

Insofern stellte sich die Frage nach der Lokalisation respektive Koloalisation der TrxR1 und Trx.

2.1.2 Subzelluläre Lokalisation von TrxR1

Thioredoxin Reduktase 1 wurde aus cDNA von hFOB-Zellen amplifiziert, erst in den Klonierungsvektor pCR2.1-TOPO kloniert und sequenziert und dann in einen Expressionsvektor umkloniert. In der von Koishi *et al.*, 1996 veröffentlichten cDNA (D88687) und von Gasdaska *et al.*, 1996 (S79851) gibt es, wie bereits diskutiert zwei ATG Start-Codons an der Position 97 und an der Position 253 vom 5'-Ende. Der längste offene Leserahmen (ORF-open reading frame) kodiert ein aus 549 Aminosäuren bestehendes Protein und der kurze ein 497 Aminosäuren langes Polypeptid der humanen Thioredoxin Reduktase 1. Koishi *et al.* haben das erste ATG als Startpunkt der Translation bestimmt, ausgehend von der Aminosäuresequenz eines Proteins, welches aus COS7-Zellen nach der Transfektion mit "KM-102-derived Reductase-like Faktor-Expressions-Vektor" gereinigt wurde. Gasdaska *et al.*, haben das zweite ATG als Startpunkt der Translation gewählt, vorausgesetzt sei die N-Terminus-Sequenz von aus humaner Plazenta gereinigter humaner Thioredoxin Reduktase. Miranda-Vizuete *et al.*, haben zum ersten Mal die beiden Sequenzen verglichen. Es wurde vermutet, dass der Unterschied zwischen KDRF (KM-102-derived reductase-like factor) und humaner Thioredoxin Reduktase auf Grund von Verwendung verschiedener translaterter Start-Codons entstehen würde. Die 53-Aminosäuren-Extension in KDRF soll keine mitochondriale oder nucleäre Signallokalisation haben (Miranda-Vizuete *et al.*, 1997). Laut den selben Autoren wären KDRF und die hTrxR (S79851) auf Protein- und Nucleotidebene identisch. Die KDRF-Sequenz enthält im Vergleich zur TrxR1-Sequenz folgende Aminosäureaustausche, welche auf entsprechenden Basenaustauschen

basieren: 1) 28 G→A; 10 Glutaminsäure (Glu)→Lysin (Lys); 2) 624 A→T; 208 Arginin (Arg)→Serin (Ser); 3) 800 A→G; 267 Asparagin (Asp)→Glycin (Gly). Die Sequenzenunterschiede mögen etwa den Lesefehlern in der Sequenz von Gaskaska *et al.* entsprechen oder echte Polymorphismen darstellen, dies muss noch untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden offenen Leseraster (open reading frame-ORF) mit den passenden Primern amplifiziert: das längste von dem ersten ATG (TrxR1-1ATG), welches der Koishi-Sequenz entspricht und das kürzere, vom zweiten ATG (TrxR1-2ATG) in der Koishi-Sequenz, welches in der Datenbank der von Schütze *et al.* (AJ001050) publizierten Sequenz gleich ist.

Es gibt Isoformen der TrxR, die durch alternatives Spleißing und/oder alternative ATG-Nutzung entstehen. Hier wurden die beiden alternativen ATG-Codons in Kontext des vollständigen offenen Leserasters untersucht. Durch RT-PCR konnte bewiesen werden, dass auf RNA-Ebene TrxR1 vermutlich in zwei Isoformen vorhanden ist. Das Experiment wurde mit verschiedenen cDNAs durchgeführt (hFOB, MG63, T/C-28a2, HepG2, HEK293) (siehe Abb. 14). Im Westernblot von Zytosol und Kernextrakten der gleichen Zellen zeigten sich zwei Banden (Abb. 15), eine von ungefähr 55 kDa und eine von ungefähr 60 kDa, die zweier konstitutiven Isoformen entsprechen würden, so dass man davon ausgehen kann, dass die beiden ATG in unterschiedlichem Ausmaß von der Translationsmaschinerie benutzt werden.

Es wurden Konstrukte für die Expression der beiden TrxR1-Isoformen hergestellt ohne 3' UTR, in der das Secis-Element lokalisiert ist. Secys ist die vorletzte Aminosäure und sollte für die Lokalisation irrelevant sein. Ohne Secys ist das Protein allerdings nicht funktionell. Die kurze ORF-Sequenz wurde in N1-EGFP-Vektor und in den pDsRed2-N1 kloniert und die längere in den N1-EGFP. Davon ausgehend, dass das zusätzliche 5'-Fragment unterschiedliche Targetierungssequenzen beinhalten würde, wurde auch das 156-Basen-Fragment (1.ATG-2.ATG TrxR) stromaufwärts von dem zweiten ATG in den N1-EGFP-Vektor kloniert (Die Klonierungsarbeit für dieses Fragment wurde von Frau Dr. A. Baur durchgeführt). Die Sequenzierung ergab für alle DNA-Fragmente eine 100%-ige Übereinstimmung mit den publizierten Sequenzen.

Für die Charakterisierung der zwei Translationsisoformen für die TrxR1 wurden die Konstrukte in verschiedenen Zelllinien transient transfiziert. Es konnten Proteine

nachgewiesen werden, die dem Molekulargewicht der Fusionsproteine entsprechen. Dieses zusammen mit der Westernblot-Analyse deutet darauf hin, dass die beiden Isoformen nicht nur auf RNA-Ebene, sondern auch auf Protein-Ebene vorhanden sind. Nach diesen Beobachtungen stellte sich die Frage, ob die subzelluläre Lokalisation der Proteinisoformen unterschiedlich ist. Ergebnisse der Transfektion der Isoformen (siehe Abbildung 16, 17, 18, 19) zeigen, dass möglicherweise tatsächlich ein Unterschied in der subzellulären Lokalisation besteht.

In der Literatur war das Enzym zunächst selbst nur als zytosolisch beschrieben (Gasdaska *et al.*, 1995, 1999), mittlerweile ist bekannt, dass es z.B. nach Phorbol ester-Stimulation des Systems von normalen aber auch von Tumorzellen sezerniert werden kann (Söderberg, 2000). Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, dass das kürzere offene Leseraster (TrxR1-2ATG) präferentiell im Zytosol exprimiert wird. Wenige Ausnahmen finden sich, die aber auch durch endogene Expression von Proteinisoformen verfremdet worden sein können (Dimerisation von Isoformen, Gromer *et al.*, 2002).

Die Verteilung des TrxR-pDsRed2-N1-Fusionsproteins hatte das selbe Muster bei Verwendung des TrxR-N1-EGFP gezeigt. Diese Aussage wird auch durch die Arbeit von Söderberg *et al.* bestätigt. Die Autoren haben die Verteilung der TrxR1 anhand Immunhistochemie untersucht. In Melanoma-Zellen war das Protein im Zytosol und in der Zellwand verteilt. In PBMC-Zellen (mononucleäre Zellen aus peripherem Blut) wurde das Protein niedriger und diffus exprimiert. In U937-Zellen (eine humane histiozytische/monozytische Leukämie-Zelllinie) war TrxR überexprimiert und sowohl im Zytosol als auch im Kern verteilt, wobei einige Kerne ausgespart wurden. Die Identität der beiden Reduktasen wurde nicht aufgeklärt, aber Miranda-Vizuete *et al.* deuteten darauf hin, dass diese identisch wären.

In der Arbeit von Söderberg *et al.* wurde auch gezeigt, dass nach einer PMA-Stimulation im Zellenlysat zwei verschiedene Proteine aufgetrennt wurden, wovon eines der bekannten Plazenta-Thioredoxin Reduktase entspricht und ein anderes ein höheres Molekulargewicht von ungefähr 58 kDa aufweist. Das letzte wurde aber nicht identifiziert. Das hiesse, dass die zweite Bande erst zu sehen ist, wenn die Zellen bestimmten Stimuli ausgesetzt werden, wie z.B. oxidativer Stress und/oder Kinase-Aktivierung. In Abwesenheit von PMA wurde eine einzige Bande beschrieben.

Um die subzelluläre Lokalisation des Fusionsproteins (1ATG-TrxR-N1-EGFP) untersuchen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit als nächster Schritt die Transfektion des Konstrukts 1ATG-TrxR-N1-EGFP durchgeführt. Es zeigte verschiedene Ergebnisse: teilweise zytoplasmische Verteilung und teilweise nucleäre. Man kann aber behaupten, dass in den meisten untersuchten Zellen (>65%), ausser zytoplasmischer Lokalisation auch eine nucleäre Lokalisation vorhanden war (siehe Abb. 17, 18, 19). Die Expression der Fusionsproteine wurde auch durch Westernblot überprüft. Wenn man die Ergebnisse der Transfektion der Isoform 2.ATG TrxR beobachtet (>70% zytoplasmische Lokalisation), kann man sagen, dass möglicherweise tatsächlich ein Unterschied in der subzellulären Lokalisation besteht, indem das 1.ATG-2.ATG TrxR Fragment die nucleäre Translokation erleichtert.

Konsistent damit zeigte auch die Transfektion des EGFP-Konstrukts, womit 156 TrxR alleine exprimiert wurde, eine homogene intrazelluläre Verteilung, (siehe Abb. 17, 19) in allen Zellen sowohl eine zytoplasmische als auch eine nucleäre. Es gibt keine Unterschiede zwischen EGFP allein und TrxR(1.ATG)-EGFP und SP-EGFP, während TrxR(2.ATG)-EGFP sich deutlich vom EGFP allein unterscheidet.

Prinzipiell bestätigten die Ergebnisse in der Immunhistochemie mit Antikörper gegen TrxR die durch Transfektion erzielten Ergebnisse. In HepG2-Zellen waren verschiedene Muster zu sehen: Zellen, in denen die Verteilung nur zytoplasmisch war und Zellen, in denen die Verteilung homogen zytoplasmisch und nucleär war.

Eine Erklärung dafür wäre eine Zellzyklus-abhängige Lokalisation, weil man beobachten konnte, dass in sich teilenden Zellen, die Verteilung zytoplasmisch war. Um diese Aussage zu bestätigen ist die Durchführung einer Zellzyklus-assozierten Studie notwendig.

2.1.3 Kolokalisation von TrxR1 und Trx

Soweit die Lokalisation von TrxR und Trx in verschiedenen Zelllinien (hFOB, primäre Mesenchymale Stammzellen, MG63, COS7, T/C-28a2) in Rahmen dieser Arbeit charakterisiert wurde, kann man jetzt behaupten, dass diese vorwiegend nucleär ist. Eine Ausnahme sind HepG2-Zellen, bei denen beide Proteine vorwiegend zytoplasmisch lokalisiert sind.

In allen untersuchten Zellen wurde immer eine Kolo­kalisierung von TrxR1 und Trx beobachtet. Anhand des Immunostaining mit Antikörper gegen TrxR und Trx konnte man nachweisen, dass beide (auch in unterschiedlichen Zellsystemen) immer kolo­kalisier­ten.

Diese Ergebnisse bestätigen die von Soini *et al.* publizierten Daten: positive Signale für TrxR waren in der Immunhistochemie sowohl im Kern als auch im Zy­tosol. Auch in dieser Arbeit gab es eine erhebliche Übereinstimmung zwischen zy­tosolischer und nucleärer Lokalisation von TrxR, zwischen Trx- und TrxR-Lokalisation. Bei nicht-tumorösen Geweben wurde eine positive Expression in Zellen des Bronchialepithels, in alveolären Makrophagen und in metaplastischen alveolären epithelialen Zellen festgestellt. Chondrozyten zeigten auch positive Signale für TrxR wie auch für Trx. Diese Ergebnisse wurden auch in adulten Ratten beobachtet (Oberley *et al.*, 2001).

Es bleibt nur die Frage, von welchen Faktoren diese unterschiedliche Lokalisation von den zwei Isoformen abhängig ist; ob es regulatorische Mechanismen für nucleären Transfer von TrxR gibt (z. B. verschiedene Lokalisationen von zwei Isoformen 1-ATG, 2-ATG), und ob das kleine Fragment zwischen dem ersten und dem zweiten ATG dafür verantwortlich ist. Heterodimere zwischen Isoformen könnten hier eine eindeutige Aussage erschweren. Allerdings spricht die Lokalisation des 156 Basenpaar-Fragments nach der Transfektion dafür, dass die nucleäre Lokalisation durch dieses Fragment begünstigt wird, besonders wenn man mit der Lokalisation des TrxR 2.ATG vergleicht. Im Westernblot von Kernextrakten und Zy­tosol konnte gezeigt werden, dass die Isoform TrxR (2-ATG) in den Kernextrakten von hFOB-, MG63-, T/C-28a2 und HEK293-Zellen eine dickere Bande als im Zy­tosol aufwies, was durch eine zy­tosolische Kontamination erklärt werden könnte. Eine andere Erklärung dafür wäre, dass die Heterodimere der TrxR während der Kernextraktpräparation nicht aufgetrennt werden konnten.

Theoretisch besteht auch die Möglichkeit, dass die zusätzliche Sequenzinformation am 5' Ende ein neues Modul in die Proteinsequenz einführt, welches dem Enzym eine Zusatzfunktion verleiht. Ähnliches wird diskutiert bei Glutaredoxin und Thioredoxin Reduktase in *Echinococcus granulosus*, bei dem beide Enzyme eine unterschiedliche N-terminale-Domäne haben, einerseits unabhängig voneinander funktionieren können und

andererseits als Elektronendonator für das andere dienen kann (Agorio *et al.*, 2003 *in press*). Ob es zutrifft bleibt zu prüfen.

Zusammenfassend sind die Hauptaussagen der bisher diskutierten Experimente, dass TrxR auch nucleär lokalisiert ist und praktisch immer mit Trx kolokalisiert. Die Mechanismen der Translokation sind noch unklar. Möglicherweise ist die subzelluläre Verteilung abhängig von z.B. ROS und/oder dem Zellzyklus. Die zwei Isoformen könnten ebenfalls in verschiedenen Zellkompartimente unterschiedliche Funktionen erfüllen.

Um die Frage zu klären, mit welchen nucleären Proteinen das System interagiert, wurden immunhistochemische Methoden angewendet. Gemäß der Fragestellung dieser Arbeit ist die Topoisomerase I als DNA-prozessierendes Enzym hierfür ein Kandidat.

3 Charakterisierung von nucleären Interaktionspartnern

Aus der Literatur ist schon lange bekannt, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 teilweise durch die Interaktion zwischen Ref-1 (nuclear signaling protein redox factor-1) und Thioredoxin 1 vermittelt wird (Hirota *et al.*, 1997). Kürzlich wurde bewiesen, dass Thioredoxin Reduktase 1 beim Einwirken ionisierender Strahlen als Signaling-Faktor in der Regulation von AP-1 eine Rolle spielt (Karimpour *et. al.*, 2002). Der Mechanismus dieser Regulation soll mit der subzellulären Lokalisation von Thioredoxin verknüpft sein. Die Thiol-enthaltenden Proteine (Trx, Ref-1, AP-1) spielen eine wichtige Rolle im intrazellulären Gleichgewicht zwischen oxidativem Stress und Reparatur von DNA-Schäden. Es wird vermutet, dass ionisierende Strahlen die redoxsensitiven Signalling-Faktoren aktivieren. Es war daher folgerichtig für die Autoren anzunehmen, dass dieser Signalweg über kritische Cystein-Reste vermittelt wird. In den Zellen, in denen TrxR überexprimiert wurde, konnte man eine konstitutive Zunahme in der AP-1/DNA-Bindung feststellen, während in den Zellen, in denen eine enzymatisch inaktive Mutante überexprimiert wurde, keine Zunahme zu sehen war. Die selben Ergebnisse waren auch in permanent transfizierten Zellen festzustellen. Es wurde berichtet, dass TrxR ein zytosolischer Signalling-Faktor ist, welcher die konstitutive aber auch durch ionisierende Strahlen induzierte AP-1-DNA-Bindungsaktivität reguliert. Auch andere Autoren haben diese TrxR/Trx vermittelte Modulation der AP-1/DNA-Bindung beschrieben (Hirota *et al.*, 1999, Wie *et*

al., 2000). Eine alte Hypothese in der Strahlenbiologie behauptet, dass der Signalweg nach einer Strahlenbelastung im Zytosol eingeleitet wird. Thioredoxin Reduktase gehört zu dieser Signaltransduktionskaskade, welche in die Trx-abhängige AP-1-Aktivierung involviert ist. Deshalb wurde angenommen, dass TrxR als Signalling-Faktor in der von freien Radikalen ausgelösten Kaskade im Zytosol wirkt. Die Kaskade aktiviert die Transkriptionsfaktoren im Nucleus und reguliert wiederum ein Muster von Genen stromabwärts. Die Daten zeigen, dass Cystein-Reste am N-Terminus von Trx und der TrxR für die AP-1-Aktivierung entscheidend sind. Laut Karimpour *et al.* (2002) führen ionisierende Strahlen zu einer Zunahme des Elektronenflusses von NADPH zu Thioredoxin Reduktase, weiter zu einer Zunahme des reduzierten Thioredoxin im Nucleus, welches das Redox-Signal dem Redox-Faktor-1-Protein (Ref-1) weiter übergibt; das letztere Protein aktiviert anschließend AP-1/DNA-Bindungsaktivität und Gentranskription. Somit sind z.B. Transkriptionsfaktoren und/oder Polymerasen als putative Interaktionspartner für TrxR im Nucleus anzusehen.

TrxR1 ist auch in die Apoptose involviert. In einer von Hofmann *et al.*, 1998 publizierten Arbeit wurde bewiesen, dass TrxR entscheidend für die über IFN/RA (Interferon/ *all trans* Retinsäure) induzierte Apoptose ist. Der Transkriptionsfaktor p53 unterdrückt das Wachstum von Tumorzellen, indem er die Zellteilung von geschädigten Zellen verhindert oder den Tod der Zelle induziert. Der Funktionsverlust dieses Protein hat genomische Instabilität und Progression des Tumorwachstums zur Folge. Hu *et al.* haben 2001 berichtet, dass IFN/RA-Komplex p53-abhängige Genexpression und Zelltod durch TrxR1 und Trx begünstigt. p53 hat in der DNA-Bindungsdomäne zwei Cystein-Reste (242 und 176), deren Oxidation seine Transkriptionsaktivität inhibiert. Ref-1 wurde eine Rolle beim Schutz vor Oxidation der Cystein-Reste zugesprochen. Trx soll die Ref-1 abhängige Genexpression durch p53 steigen.

Diese und andere Daten führen zur Hypothese, dass TrxR und ihr Substrat Thioredoxin auch mit anderen Komponenten des Zellkerns wechselwirken.

Gemäß der Arbeitshypothese und entsprechend der Tatsache, dass TrxR auch eine Nucleotid-Reduktase-Funktion hat, waren auch Proteine, welche an der DNA-Prozessierung beteiligt sind prinzipiell putative Protein-Protein-Interaktionspartner für TrxR. Hierfür gibt es in der Literatur nur wenige Daten. Dieser Punkt wird im Abschnitt 4 detaillierter diskutiert.

Zur Isolation putativer nucleärer Interaktionspartner der TrxR wurde ein "pull-down Assay" unter Verwendung von Protein A-Agarose und TrxR-Antikörper durchgeführt. Es zeigte sich (Abb. 26), dass neben der TrxR ein 20 kDa Protein an den Komplex gebunden hatte. Bei Verwendung von „Low-Salt-Extracts“ konnte man sogar 10-20 Proteine an den Komplex gebunden isolieren (Abb. 27). Dadurch wurden putative nucleäre Interaktionspartner für die TrxR isoliert. Die Identifikation soll mittels MALDI-TOF-MS Analyse (Matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometer) in Kooperation mit der GSF in Neuherberg (PD Dr. J. Adamski) erfolgen. Eine andere Methode für die Identifizierung anderer Interaktionspartner wäre die Kandidaten-Analyse fokussiert auf DNA-prozessierende Enzyme.

4 TrxR und DNA-prozessierende Enzyme

Topoisomerase I gehört zu den Enzymen der DNA-Prozessierung. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde speziell die Interaktion zwischen Trx/TrxR-System und Topoisomerase I als Kandidaten-Protein untersucht. Ein Argument für die Aussage, dass es nucleäre Interaktionspartner für TrxR gibt, war der positive Westernblot eines aus einem mit Topoisomerase I "Pull-down-Assay" isolierten Komplexes unter Verwendung der Antikörper gegen TrxR (siehe Abbildung 28). Zusammen mit der Topoisomerase I konnten durch Koimmunpräzipitationsversuche zwei weitere Nucleoproteine kopurifiziert werden: PSF (polypyrimidintraktbindendes Protein-assoziiertes Spleißfaktor) und p54^{nrb} (Straub *et al.*, 1998). Es wurde kürzlich beschrieben, dass PSF mit einer nucleären Fraktion von PKC α (Proteinkinase α) assoziiert wäre und ihr als Substrat dient (Shav-Tal *et al.*, 2002). Es ist aber bekannt, dass PKC α im Zytosol lokalisiert ist. Der Komplex ist auch in der Regulation von Transkriptionsfaktoren aktiv und kann DNA-Bindungsdomänen der Schilddrüsenhormon-Rezeptoren und Retinsäure X-Rezeptoren binden. Man kann annehmen, dass TrxR1 auch indirekt über diesen Komplex (PSF/p54^{nrb}) mit Topoisomerase I interagieren könnte. Das heisst, dass TrxR, ein Bestandteil des mit Topoisomerase I kopurifizierten Komplex, in einer gewissen Weise mit Topoisomerase I als nucleären Interaktionspartner interagiert.

Topoisomerase I endrillt die DNA, bindet sich kovalent an einen Strang der Doppelhelix (dies erlaubt die Rotation um den intakten Komplementärstrang), löst ihre

kovalente Bindung und religiert die DNA. Die Religation kann von Doppelstrangbrüchen, debasierten Nucleotiden, UV-Läsion, Basen-Fehlpaarungen, partiell einzelsträngiger DNA und anderen DNA-Defekten verhindert werden (Pourquier *et al.*, 1997). Zwei Jahre später haben die selben Autoren berichtet, dass 8-oxoG die Topoisomerase I-vermittelte Spaltungsfähigkeit verbessern kann, wenn dieses an Position +1 oder +2 stromaufwärts von der Spaltungsstelle bindet. Das hiesse, dass Topoisomerase I die 8-oxoG-Veränderungen in Anwesenheit von anderen nucleären Proteinen erkennen kann und um die Bindung effizient konkurriert. Die von Topoisomerase I induzierten Spaltungskomplexe im Fall von oxidierten Basen können zu DNA-Schäden oder Zelltod führen (z.B. Camptothecin), zu Rekombination oder mutagenen Effekten. Folge sind suizidale Interaktionen der Topoisomerase I, aus denen kovalente DNA-Intermediate des Enzyms hervorgehen, die durch die Reaktion mit externen DNA-Enden zu Deletionen und Transpositionen führen, oder non-DNA-Nucleophile auf die Strangbrüche übertragen können (Lisby, 1998). Ob dieses mutagene Potential der Topoisomerase I *in vivo* auch zur Aggravation von DNA-Defekten beiträgt, ist weitgehend unbekannt. Es dürfte jedoch in Tumorzellen, die Topoisomerase I überexprimieren, eine gewisse Rolle spielen. Allerdings existieren offenbar auch Schutzmechanismen. Man hat beobachtet, dass Topoisomerase I unter subletaler γ -Bestrahlung und UV-Licht durch einen bisher unbekanntem Mechanismus reversibel inaktiviert wird. Die Gabe von poly(ADP-Ribose)-Transferase-Inhibitoren verhindert die Inhibition von Topoisomerase I in γ -oder UV-bestrahlten Zellen. Dies soll ihre Bindung an DNA-Einzelstrang-Brüche verhindern und den Zugang des DNA-Reparatur-Komplexes zu den Bruchstellen ermöglichen (Boothman, *et al.* 1994). In der Arbeitsgruppe Boege wurde beobachtet, dass die Aktivität der Topoisomerase I *in vitro* durch Redoxzyklen moduliert wird (unpubliziert) und daher wurde vermutet, dass antioxidative Schutzsysteme nicht nur die DNA-Schädigung selbst, sondern auch suizidale Interaktionen der Topoisomerase I mit DNA-Schäden verhindern können.

Es gibt Studien die gezeigt haben, dass Topoisomerase I direkt mit dem Tumorsuppressor p53 wechselwirkt. Man denkt, dass Topoisomerase I und p53 unter Stressbedingungen kooperieren würden. Das hiesse, dass die beiden in die Apoptose und DNA-Reparatur involviert sind (Soe *et al.*, 2002). Die selben Autoren haben bewiesen, dass p53 sowohl die Relaxation als auch die Entstehung des Topoisomerase I-Doppelspaltungs-

Komplexes sechsfach erhöht. Die Aktivierung der Topoisomerase I-Aktivität durch p53 soll via eines zentralen Teils des Enzym stattfinden. Die Schlussfolgerung sei, dass der stimulierende Einfluss von p53 auf Topoisomerase I eine Rolle in der DNA-Rekombination und Reparatur spielt, ebenso wie in der Apoptose. Eine aktuelle Arbeit (Makino, Y., *et al.* 1999) hat gezeigt, dass Thioredoxin unter oxidativem Stress in den Zellkern transloziert und mit der DNA-Bindungsdomäne des Glukokortikoidrezeptors assoziiert, dessen DNA-Bindung dadurch stabilisiert wird. Somit könnte in Situationen gesteigerter DNA-Schädigung ein ähnlicher Mechanismus für die Modulation der Topoisomerase I via p53 sorgen. Folglich könnte ein Einfluß von TrxR auf die Topoisomerase I-Aktivität auch indirekt über p53 erfolgen.

Die Arbeitsgruppe Boege beschäftigt sich seit mehreren Jahren mit verschiedenen Aspekten der DNA-Topoisomerase I. Dies umfasst die Identifikation neuer Inhibitoren, zellzyklusabhängige Relokationsphänomene, die Interaktion mit regulierenden Proteinen, suizidale Interaktionen mit partiell einzelsträngigen DNA-Substraten und die Reaktion solcher Intermediate mit non-DNA-Nucleophilen (Straub *et al.*, 1997; Boege *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 1997). Die letztgenannten Arbeiten bilden den Ausgangspunkt für die in dieser Arbeit aufgestellten Hypothese, nämlich ob die suizidale Interaktion von Topoisomerase I mit DNA-Defekten durch antioxidative Schutzsysteme (i.e. Glutathion, Thioredoxin) und andere zelluläre Systeme beeinflusst wird. Es wurde durch Kontrollversuche und Verwendung sauberer Komponenten für ein *in vitro* Rekonstitutions-System (gereinigte Enzyme) untersucht, ob die beobachteten Effekte auf direkter oder indirekter Interaktion zwischen den beiden Enzymen beruhen, und welcher Mechanismus für die funktionelle Beeinflussung verantwortlich sei.

Die Frage war, ob die gereinigte Thioredoxin Reduktase sich auf die Aktivität von Topoisomerase I auswirkt.

Beispiele von Relaxationsversuchen können in den Abbildungen 29 und 31 gesehen werden. Bei einer steigenden Topoisomerase I-Konzentration nimmt die DNA-Relaxation zu. Bei der Durchführung des selben Experimentes mit Thioredoxin Reduktase konnte man ein anderes Muster feststellen. Es waren im Gel nur zwei Banden zu erkennen, welche bei einer Zunahme der Thioredoxin Reduktase-Konzentration eine zunehmende Intensität haben. Nach der Behandlung des selben

Vektors mit einer Mutante der Thioredoxin Reduktase 1, welche statt Selenocystein in Position 498 Cystein hat, konnte man keinen Effekt beobachten (Abbildung 31).

Die beiden Banden wandern im Agarose-Gel unterschiedlich von allen durch rekombinante Topoisomerase I verursachten Zustände. Da man der TrxR keinesfalls DNA-schneidende Aktivität unterstellen kann, muss es sich hier um Zustandsänderungen des Plasmids handeln, welche ohne Schneiden und Religieren der DNA zustande kommen. Denkbar ist die Reduktion von Basenpaaren, welche im ringförmigen Plasmid eine bestimmte Konfiguration erhalten helfen. Verschiedene Arbeiten beschrieben die Reduktion von Nucleotiden zu Dideoxynucleotiden durch Ribonucleotid Reduktasen. Dieser Mechanismus sollte allerdings im geschlossenen DNA-Ring keine Rolle spielen. Immerhin ist der gezeigte Effekt bei Verwendung einer enzymatisch inaktiven Cys-Mutante der TrxR nicht nachzuweisen und scheint somit abhängig von der Enzymaktivität. Weitere Experimente sind nötig, um dieses Phänomen zu klären.

Als weiteres wurde untersucht, ob Thioredoxin Reduktase in verschiedenen Konzentrationen die Topoisomerase I-Aktivität steigert. Bei hohen Konzentrationen von Thioredoxin Reduktase (250 ng) und niedrigen Konzentrationen von Topoisomerase I (2,5 ng, 3,33 ng, 5 ng, 6,66 ng und 10 ng) kann man sagen, dass keine echte Relaxation vorhanden ist, sondern man erkennt die Zustände des Vektors, die nach der Einwirkung von Thioredoxin Reduktase zu sehen sind (Abbildung 32). Konzentrationsreihen unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von beiden Enzymen lassen keine definitive Kooperation bei der DNA-Prozessierung erkennen, zumindest nicht im verwendeten Setting, vielmehr tauchen nebeneinander die unterschiedlichen Zustände auf. Man kann aber aus den durchgeführten Experimenten schließen, dass die Topoisomerase I-Aktivität durch die Auswirkung von Thioredoxin Reduktase 1 nicht gesteigert wird.

Möglicherweise gibt es einen anderen Mechanismus, welcher für eine Interaktion der Thioredoxin Reduktase 1 mit DNA verantwortlich ist z.B. der oben diskutierte Weg über den dritten Partner p53. Es konnte gezeigt werden, dass Topoisomerase I und das System Thioredoxin/Thioredoxin Reduktase kolokalisieren, aber es bleibt noch unklar inwiefern Topoisomerase I als DNA-prozessierendes Enzym mit dem System wechselwirkt.

Hier konnte gezeigt werden, dass das System TrxR/Trx nucleär lokalisiert sein kann. Es ist zu vermuten, dass die genuinen Funktionen von TrxR und Trx auch vor Ort ausgeführt werden. So kann sicher nucleäres Trx auch im Zellkern regeneriert werden. Die Beeinflussung der Trx-Funktion durch das Trx/TrxR System und auch die Funktion als Ribonucleotid-Reduktase System können effizient im Zellkern stattfinden. Es ist anzunehmen, dass die letztere Funktion eine Rolle spielt bei Prozessen der DNA-Replikation und bei der DNA-Reparatur. Hier gelang es nachzuweisen, dass TrxR mit einem Ensemble von nucleären Proteinen interagiert, von denen eines als die Topoisomerase I identifiziert werden konnte. Die Aufschlüsselung der Protein-Protein-Interaktion, der detaillierten molekularen Mechanismen und ihrer physiologischen Relevanz bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

F. Zusammenfassung

In dieser Doktorarbeit wurde der Beitrag des Systems Trx/TrxR zur DNA-Prozessierung und -Reparatur untersucht. Das System Thioredoxin /Thioredoxin Reduktase (Trx/TrxR) ist ein sehr versatiles System zur Neutralisation reaktiver Sauerstoffspezies, zur Regulation redox-sensitiver Vorgänge und zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Steroidhormonrezeptoren, AP-1 und NFkB. Als Bestandteil der antioxidativen Systeme der Zelle und gleichzeitig der Ribonucleotid-Synthese im Rahmen der DNA-Synthese bei Zellproliferation ist das System prädestiniert, eine wichtige Rolle auch bei der DNA-Prozessierung im Rahmen von Zellteilung und DNA-Reparatur zu spielen.

Das Enzym Thioredoxin Reduktase war zunächst nur als zytosolisches Enzym beschrieben, es ist mittlerweile bekannt, dass es z.B. nach Phorbolster-Stimulation auch sezerniert werden kann. Adäquate Stimuli für die nucleäre Translokation von Trx sind z.B. UV-Licht und TNF-Signalling. Zudem wurde in der vorhandenen Arbeit anhand transienter Transfektion und Immunhistochemischer Untersuchungen nachgewiesen, dass beide Komponenten des Systems auch im Zellkern präsent sind.

Ein Teil der Arbeit stellt die Charakterisierung der subzellulären Lokalisation zweier Isoformen von Thioredoxin Reduktase 1 mit unterschiedlichem N-Terminus dar. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden Isoformen als mRNA und Protein vorhanden sind. Es wurde dann die Interaktion des Enzyms Thioredoxin Reduktase mit anderen Komponenten des Zellkerns, hier speziell mit Enzymen der DNA-Prozessierung untersucht. Zudem wurde in einem Immunpräzipitationsansatz („Pull-Down-Assay“) nucleäre Interaktionspartner des Enzyms charakterisiert. Diese Partner sollen nach 2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF-Analyse identifiziert werden.

Zu den DNA-Prozessierungsenzyme zählt auch Topoisomerase I. Durch Antikörpervermittelte "pull-down Assays" gelang es nachzuweisen, dass Topoisomerase I mit TrxR eine Protein-Protein-Wechselwirkung eingeht. In einem Rekonstruktionssystem mit rekombinanter Topoisomerase I und gereinigter TrxR ergab sich jedoch keiner Hinweis für eine funktionelle Interaktion in DNA-Relaxations-Assay. Die Aufschlüsselung der Protein-Protein-Interaktion, der detaillierten molekularen Mechanismen und ihrer physiologischen Relevanz bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

G. Abkürzungen

8-OxoG-	8-Oxoguanin
8-Oxo-GTP-	8-Oxodeoxyguanosin-Triphosphat
A	Adenin
Apaf-1-	Apoptose-Protease-Aktivator-Faktor (apoptotic protease- activating factor 1)
AB	Antikörper
AP-Endonuclease-	Apyrimidin, Apurin-Endonuclease
AP-Stellen-	Apyrimidin, Apurin-Stellen
AT-like	Ataxia Telangiectasia-ähnlich
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	ATM-related (ATR), Werner syndrome gene (WRN), Bloom WRN Werner Syndrom Gen
BLM	Bloom Syndrom Gen, Tip60
BRCA1	Brust-Krebs-Asoziiertes-Gen 1 (breast cancer-associated gene 1)
C	Cytosin
C/EBP—CCAAT/	„enhancer Bindungsprotein“
Chk1/Chk2	Checkpoint-Kinasen 1,2
CuZn-SOD	SOD1 Kupfer, Zink SOD
cyt c	cytochrome c;
dATP, dGTP	deoxyriboseATP;
dCTP, dTTP, dUTP	deoxyriboseATP;
DNA-PK	DNA-abhängige Protein Kinase;
dRPase	Deoxyribophosphodiesterase
EC-SOD	SOD3 extrazellulär SOD
Egr-1—	early growth response-1
ERCC	excision repair cross complementing
FAD	Flavinadenin-Dinucleotid
FADH ₂	Flavinadenin-Dinucleotid (reduzierte Form)
FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE,	

FANCF, FANCG	Fanconi Anämia complementation groups A,C,D2,E,F und G;
G	Guanosin
GGR	global genomic repair (eine Form von Nucleotide-Exzision-Reparatur)
GRE	Glucocorticoid Responsive Element
hMLH1	humane MutL Homolog 1;
hMSH2, hMSH6	humane MutS Homologe 2 und 6,
hPMS2	Human post-meiotische Segregation 2;
HSF	„heat shock factor“
IFN- γ	Interferon γ
IFN/RA	Interferon/ All trans Retinsäure/all trans retinoic acid
kDa	Kilodaltons
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometer
MMR	Mismatch Reparatur
Mn-SOD	SOD2, Manganese SOD
NAD ⁺	Nicotinamid Adenin Dinucleotid (oxidierte Form);
NADH	reduzierte Form Von NAD ⁺ ;
NBS	Nijmegen breakage Syndrom;
NF- κ B	„nuclear factor kappa B“
OH-	Hydroxyl-Radikal
p53	Protein p53
PARP	Poly-(ADP-Ribose-)Polymerase
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
RA	all trans retinoic acid
Rad51, Rad 52	radiation Mutante
recA,B,C,D	Rekombinationsproteine
ROS	„reactive oxygen species“, Reaktive Sauerstoff Spezies
RPA	eukaryotische Einzelstrang-Bindeprotein,Replication Protein A
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RTS	Rothmund-Thomson Syndrom;
RuvA,B,C,D-Protein	Resistenz gegenüber UV

SOD	Superoxiddismutase
SSB-Protein	Einzelstrang-Bindeprotein (single strand binding)
T	Thymin
TCR Reparatur)	transcription coupled repair (eine Form von Nucleotide-Exzision-
TNF- α	Tumor Nekrosis Faktor α
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxin Reduktase
UV	Ultraviolett
UvrA,B,C,D	UV-Reparatur Gene(uv-repair)
XPA	Xeroderma Pigmentosum
XPA, XPB, XPC, XPD, XPF, XPG und G;	Xeroderma Pigmentosum complementation groups A, B, C, D, F
XRCC	X ray repair cross complementing

H. Literaturverzeichnis

- **Abate C.**, Patel L., Rauscher F. J., 3rd and Curran T., Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science* 249 (1990), pp. 1157-1161
- **Adamski J.**, Leenders F., Carstensen J. F., Kaufmann M., Markus M.M., Husen B., Tesdorpf J.G., Seedorf U., de Launoit Y. & Jakob F. (1997) *Steroids* 62, 1-5.
- **Aebi H.**, Catalase, *Methods of enzymatic analyses*, Academic Press, New York (1974), pp. 673-683.
- **Agorio A.**, Chalar C, Cardozo S, Salinas G., Alternative mRNAs arising from trans-splicing code for mitochondrial and cytosolic variants of Echinococcus granulosus thioredoxin glutathione reductase. *J Biol Chem* 2003 Jan 21; [*in press*]
- **Allen R.G.** und Tresini M, Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic. Biol. Med.* 28 (2000), pp. 463-499.
- **Al-Taie O.**, Mörk H., Seufert J., Treis H., Jakob F., Scheurlen M., Hereditäres Non-Polyposis kolorektales Karzinom (HNPCC) Aktuelle Übersicht zur Ätiologie, Klinik, Diagnostik und Therapie, 2001;96:529–38 (Nr. 9), © Urban & Vogel, München 529, ÜBERSICHT
- **Andrew P.J.** und Mayer B., Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res.* 15 (1999), pp. 521-531.
- **Arnelle D.R.** und Stamler J.S., NO⁺, NO, and NO⁻ donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch. Biochem. Biophys.* 318 (1995), pp.179-185.
- **Arner E.S.**, Holmgren A., Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase., *Eur J Biochem.* 2000 Oct;267(20):6102-9. Review.
- **Arrigo A.P.**, Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic. Biol. Med.* 27 (1999), pp. 936-944.
- **Babior B.M.**, NADPH oxidase: an update. *Blood* 93 (1999), pp. 1464-1476.
- **Baeuerle P.A.** und Henkel T., Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 12 (1994), pp. 141-179.
- **Barra D.**, Schinina M.E., M. Simmaco, Bannister J.V., Bannister W.H., Rotilio G. und Bossa F., The primary structure of human liver manganese superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 259 (1984), pp. 12595-12601

- **Beck K.F.**, Eberhardt W., Frank S., Huwiler A., Messmer U.K., Muhl H. und Pfeilschifter J., Inducible NO synthase: role in cellular signalling. *J. Exp. Biol.* 202 (1999), pp. 645-653.
- **Beckman J.S.** und Koppenol W.H., Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* 271 (1996), pp. C1424-C1437
- **Beckman K.B.**, Ames BN. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 1997;272:19633-19636.
- **Bernstein C.**, Bernstein H., Paynea C.M. und Garewalb H., DNA repair/proapoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, Volume 511, Issue 2, June 2002, Pages 145-17
- **Bessho T.** & Sancar A., Human DNA damage checkpoint protein hRad9 is a 3' to 5' exonuclease. *J. Biol. Chem.* 275, 7451-7454 (2000)
- **Betteridge D.J.**, What is oxidative stress? *Metabolism* 49 (2000), pp. 3-8
- **Boege F.**, Straub T., Kehr A., Boesenberg C., Christiansen K., Andersen A., Jakob F. & Köhrle J. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 2262-2270.
- **Bogdan C.**, Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol.* 11 (2001), pp. 66-75,
- **Boothman D.A.**, Fukunaga N, Wang M., Down-regulation of topoisomerase I in mammalian cells following ionizing radiation., *Cancer Res* 1994 Sep 1;54(17):4618-26
- **Bredt D.S.**, Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic. Res.* 31 (1999), pp. 577-596
- **Buermeyer A.B.**, Deschênes S. M., Baker S.M., und Liskay R.M., mammalian DNA mismatch repair, *Annu. Rev. Genet.* 1999. 33:533-564.
- **Butterfield D.A.**, Koppal T., Howard B., Subramaniam R., N Hall N., Hensley K., Yatin S., Allen K., Aksenov M., Aksenova M. und Carney J., Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butyl-alpha-phenylnitron and vitamin E. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 854 (1998), pp. 448-462.
- **Cabrele C.**, Fiori S., Pegoraro S. und Moroder L., Redox-Active Cyclic Bis(cysteiny)lpeptides as Catalysts for In Vitro Oxidative Protein Folding, *Chemistry & Biology* Volume 9, Issue 6, June 2002, Pages 731-740

- **Cadenas E.** und Davies K.J., Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29 (2000), pp. 222-230
- **Chae H.Z.**, Kim H.J., Kang S.W. und Rhee S.G., Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 45 (1999), pp. 101-112.
- **Chae H.Z.**, Kang S. W.und Rhee S.G., Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Methods Enzymol.*300 (1999), pp. 219-226.
- **Champoux J.J.**, DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:369-413. Review.
- **Chang L.-Y.**, Slot J.W., Geuze H.J. und Crapo J.D., Molecular immunocytochemistry of the Cu/Zn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *J. Cell Biol.* 107(1988), pp. 2169-2179
- **Cheng W.-H.**, Fu Y.X., Porres J.M., Ross D.A., Lei X.G. (1999) Selenium-dependent cellular glutathione peroxidase protects mice against a pro-oxidant-induced oxidation of NADPH, NADH, lipids, and protein. *FASEB J.* 13(11), 1467-1475.
- **Cheng W.-H.**, Ho Y.-S., Ross D.A., Han A., Combs G.F. Jr., Lei X.G. (1997a) Overexpression of cellular glutathione peroxidase does not affect expression of plasma glutathione peroxidase or phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mice offered diets adequate or deficient in selenium. *J. Nutr.* 127, 675-680.
- **Cheng W.-H.**, Ho Y.-S., Ross D.A., Valentine B.A., Combs G.F. Jr., Lei X.G. (1997b) Cellular glutathione peroxidase knockout mice express normal levels of selenium-dependent plasma and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases in various tissues. *J. Nutr.* 127, 1445-1450.
- **Cheng W.-H.**, Ho Y.-S., Valentine B.A., Ross D.A., Combs Jr. G. F., Lei X.G. (1998) Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice. *J. Nutr.* 128, 1070-1076.
- **Chomzynski P.**, Sacchi N., Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction, *Analytical Biochemistry* Vol. 162, No. 1, April 1, 1987, pp. 156-159

- **Chou K.M.**, Kukhanova M. & Cheng Y.C. A novel action of human apurinic/aprimidinic endonuclease excision of L-configuration deoxyribonucleoside analogs from the 3' termini of DNA. *J. Biol. Chem.* 275, 31009-31015 (2000)
- **Chowdhury K.**, One step 'miniprep' method for the isolation of plasmid DNA., *Nucleic Acids Res.* 1991 May 25;19(10):2792. 1991
- **Christensen M.O.**, Barthelmes H.U., Boege F., Mielke C., The N-terminal domain anchors human topoisomerase I at fibrillar centers of nucleoli and nucleolar organizer regions of mitotic chromosomes., *J Biol Chem* 2002 Sep 27;277(39):35932-8
- **Christensen M.O.**, Barthelmes H.U., Feineis S., Knudsen B.R., Andersen A.H., Boege F., Mielke C., Changes in mobility account for camptothecin-induced subnuclear relocation of topoisomerase I., *J Biol Chem* 2002 May 3;277(18):15661-5
- **Chung D. W. et al.**, Primary structure of the catalytic subunit of human DNA polymerase and chromosomal location of the gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 11197-11201 (1991)
- **Church S.L.**, Grant J.W., Meese E.U. und Trent J.M., Sublocalization of the gene encoding manganese superoxide dismutase (MnSOD/SOD2) to 6q25 by fluorescence in situ hybridization and somatic cell hybrid mapping. *Genomics* 14 (1992), pp. 823-825
- **Cowan D. B.**, Weisel R.D., William W.G., Mickle D.A.G. (1993) Identification of oxygen responsive elements in the 5'-flanking region of the human glutathione peroxidase gene. *J. Biol. Chem.* 268, 26904-26910.
- **Crapo J.D.**, Oury T., Rabouille C., Slot J.W. und Chang L.-Y., Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992), pp. 10405-10409
- **Dalton T.P.**, Shertzer H.G. und Puga A., Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39 (1999), pp. 67-101.
- **Das K.C.**, Guo X.L und White C.W., Protein kinase Cdelta-dependent induction of manganese superoxide dismutase gene expression by microtubule-active anticancer drugs. *J. Biol. Chem.* 273 (1998), pp. 34639-34645
- **de Boer J.**, Andressoo J.O., de Wit J., Huijmans J., Beems R.B., van Steeg H., Weeda G., van der Horst G.T., van Leeuwen W., Themmen A.P., Meradji M., Hoeijmakers J.H., Premature aging in mice deficient in DNA repair and transcription., *Science.* 2002 May 17;296(5571):1276-9.

- **de Murcia G.**, Menissier dM. Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem Sci* 1994;19:172-176.
- **Dimmeler S.**, Hermann C., Galle J.und Zeiher A.M., Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19 (1999), pp. 656-664.
- **Dougall W.C.**, Nick H.S., Manganese superoxide dismutase: a hepatic acute phase protein regulated by interleukin-6 and glucocorticoids. *Endocrinology* 129 (1991), pp. 2376-2384
- **Dreher I.**, Schmutzler C., Jakob F. & Köhrle J. (1997) *Trace Elem. Biol. Med.* 11, 83-91.
- **Dreher I.**, Schmutzler C., Jakob F., Köhrle J. (1997a) Expression of selenoproteins in various rat and human tissues and cell lines. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 11, 83-91
- **Dreher I.**, Schütze N., Köhrle J. & Jakob F. (1998) *BBRC* 245, 101-107.
- **Dynan W.S.**, Promoters for housekeeping genes. *TIG* 2 (1986), pp. 196-197
- **Farin F.M.**, Hitois Y., Hallagan S.E., Kushleika J., Woods J.S., Janssen P.S., Smith-Weller T., Franklin G.M., Swanson P.D.und Checkoway H., Genetic polymorphisms of superoxide dismutase in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 16 (2001), pp. 705-707.
- **Finkel T.**, Holbrook N.J., Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408 (2000)
- **Finkel T.**, Oxygen radicals and signaling. *Curr. Opin. Cell. Biol.*10(1998), pp.248-253
- **Foletta V.C.**, Segal D.H.und Cohen D.R., Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1. *J. Leukoc. Biol.* 63 (1998), pp. 139-152.
- **Folz R.J.**, Crapo J.D., Extracellular superoxide dismutase (SOD3): tissue-specific expression, genomic characterization, and computer-assisted sequence analysis of the human EC SOD gene. *Genomics* 22 (1994), pp. 162-171.
- **Frei B.**, On the role of vitamin C and other antioxidants in atherogenesis and vascular dysfunction. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222 (1999), pp. 196-204.
- **Fridovich I.**, Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 893 (1999), pp. 13-18.

- **Furchgott R.F.**, A research trail over half a century. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35 (1995), pp. 1-27
- **Galter D.**, Mihm S. und Dröge W., Distinct effects of glutathione disulphide on the nuclear transcription factor kappa B and the activator protein-1. *Eur. J. Biochem.* 221 (1994), pp. 639-648.
- **Genschel J.**, Bazemore L.R. & Modrich P. Human exonuclease I is required for 5' and 3' mismatch repair. *J. Biol. Chem.* 277, 13302-13311 (2002)
- **Ghosh R.**, Mitchell D.L., Effect of oxidative DNA damage in promoter elements on transcription factor binding. *Nucleic Acids Res.* 27 (1999), pp.3213-3218
- **Gladyshev V. N.**, Jeang K.-T., Wootton J.C., und Hatfield D.L. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 8910-8915
- **Goto S.**, Takahashi R., Kumiyama A.A., Radak Z., Hayashi T., Takenouchi M., Abe R., Implications of protein degradation in aging, *Ann N Y Acad Sci* 2001 Apr;928:54-64
- **Grue P.**, Gräßer A., Sehested M., Jensen P.B., Uhse A., Straub T., Ness W. & Böge F. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 33660-33666.
- **Haan De J.B.**, Bladier C., Griffiths P., Kelner M, O'Shea R.D., et al. 1998. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 273:22528-36
- **Halligan B.D.**, Teng M., Guilliams T.G., Nauert J.B., Halligan N.L., Cloning of the murine cDNA encoding VDJP, a protein homologous to the large subunit of replication factor C and bacterial DNA ligases, *Gene* 1995 Aug 19;161(2):217-22.
- **Halliwell B.**, Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.* 1 (1987), pp. 358-364.
- **Halliwell B.**, The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis* 23 Suppl. 1 (1993), pp. 118-126.
- **Halliwell B.**, Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic. Res.* 31 (1999), pp. 261-272.
- **Halliwell B.**, Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* 16 (1996), pp. 33-50.

- **Harman D.**, A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11: 298–300 oxidative stress on the aged tissues. *Arch Biochem Biophys* 362, (1956)
- **Harrington L.A.**, Harley C.B., *Mech. Ageing Dev.* **43**, 71 (1988).
- **Harris C.A.**, Derbin K.S., Hunte-McDonough B., Krauss M.R., Chen K.T., Smith D.M. und Epstein L.B. , Manganese superoxide dismutase is induced by IFN-gamma in multiple cell types. Synergistic induction by IFN-gamma and tumor necrosis factor or IL-1. *J. Immunol.* 147 (1991), pp. 149-154.
- **Harris L.R.**, Cake M.H. und Macey D.J., Iron release from ferritin and its sensitivity to superoxide ions differs among vertebrates. *Biochem. J.* 301 (1994), pp.385-389.
- **Hass M.A.**, Massaro D., Regulation of the synthesis of superoxide dismutases in rat lungs during oxidant and hyperthermic stresses. *J. Biol. Chem.* 263 (1988), pp. 776-778
- **Hatfield D.L.**, Vadim N. Gladyshev, How Selenium Has Altered Our Understanding of the Genetic Code, *Molecular and Cellular Biology*, June 2002, p. 3565-3576, Vol. 22
- **Hazra T.K.**, Izumi T., Boldogh I., Imhoff B., Kow Y. W., Jaruga P., und Dizdaroglu M. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 3523-3528
- **Hendrickson D.J.**, Fisher J.H., Jones C. und Ho Y.-S., Regional localization of human extracellular superoxide dismutase gene to 4pter-q21. *Genomics* 8 (1990), pp. 736-738
- **Hirota K.**, Matsui M., Iwata S., Nishiyama A., Mori K. und Yodoi J., AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997), pp. 3633-3638.
- **Hirota K.**, Murata M., Sachi Y., Nakamura H., Takeuchi J., Mori K. und Yodoi J. Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* 274 (1999), pp. 27891-27897.
- **Hogg N.**, Kalyanaraman B., Nitric oxide and low-density lipoprotein oxidation. *Free Radic. Res.* 28 (1998), pp. 593-600.
- **Höss M.** *et al.* A human DNA editing enzyme homologous to the Escherichia coli DnaQ/MutD protein. *EMBO J.* 18, 3868-3875 (1999).
- **Hu J.**, Ma X., Lindner D.J., Karra S., Hofmann E.R., Reddy S.P., Kalvakolanu D.V., Modulation of p53 dependent gene expression and cell death through thioredoxin-

thioredoxin reductase, by the Interferon-Retinoid combination., *Oncogene* 2001 Jul 12;20(31):4235-48

- **Huang S.** *et al.* The premature ageing syndrome protein, WRN, is a 3'-5' exonuclease. *Nature Genet.* 20, 114-116 (1998).
- **Huang Y.,** He T., Domann F.E., Decreased expression of manganese superoxide dismutase in transformed cells is associated with increased cytosine methylation of the SOD2 gene. *DNA Cell Biol.* 18 (1999), pp. 643-652
- **Huang Y.,** Peng J., Oberley L.W. und Domann F.E., Transcriptional inhibition of manganese superoxide dismutase (SOD2) gene expression by DNA methylation of the 5' CpG island. *Free Radic. Biol. Med.* 23 (1997), pp. 314-320
- **Huang S.** *et al.* Characterization of the human and mouse WRN 3'-5' exonuclease. *Nucleic Acids Res.* 28, 2396-2405 (2000).
- **Hübscher U.,** Maga G. & Spadari S., Eukaryotic DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 133-163 (2002).
- **Ignarro L.J.,** Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signaling. *Pharmacol. Toxicol.* 67 (1990), pp. 1-7.
- **Ikeda S.,** Biswas T., Roy R., Izumi T., Boldogh I., Kurosky A., Sarker A.H., Seki S., und Mitra S. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 21585-21593
- **Inoue N.,** Ramasamy S., Fukai T., Nerem R.M. und Harrison D.G., Shear stress modulates expression of Cu/Zn superoxide dismutase in human aortic endothelial cells. *Circ. Res.* 79 (1996), pp. 32-37.
- **Isoherranen K.,** Peltola V., Laurikainen L., Punnonen J., Laihia J., Ahotupa M. und Punnonen K., Regulation of copper/zinc and manganese superoxide dismutase by UVB irradiation, oxidative stress and cytokines. *J. Photochem. Photobiol. B* 40 (1997), pp. 288-293.
- **Jackson A. L. &** Loeb L. A., The mutation rate and cancer. *Genetics* 148, 1483-1490(1998)
- **Jahns R.,** Jahns V., Siegmund C., Inselmann G., Lohse M.J. & Böge F. (1999) *Circulation*, 99, 649-654.
- **Jakob F.,** Siggelkow H., Homann D., Köhrle J., Adamski J. & Schütze N. (1997) *J. Ster. Biochem. Mol. Biol.* 61, 167-174.

- **Jakob F.**, Becker K, Paar E., Ebert-Duemig R., Schutze N., Expression and regulation of thioredoxin reductases and other selenoproteins in bone., *Methods Enzymol.* 2002;347:168-79.
- **Jeggo P.A.**, DNA repair: PARP-another guardian angel? *Curr Biol* 1998;8:R49-R51.
- **Jiang D.**, Hatahet Z., Blaisdell J.O., Melamede R.J., und Wallace S.S. (1997) *J. Bacteriol.* 179, 3773-3782
- **Jones N.C.**, Rigby P.W.J.und Ziff E.B., Trans-acting protein factors and the regulation of eukaryotic transcription: lessons from studies on DNA tumor viruses.*Genes Dev.* 2 (1988), pp. 267-281
- **Kamata H.**und Hirata H., Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* 11 (1999), pp. 1-14.
- **Karimpour S.**, Lou J, Lin L.L., Rene L.M., Lagunas L., Ma X., Karra S., Bradbury C.M., Markovina S., Goswami P.C., Spitz D.R., Hirota K., Kalvakolanu D.V., Yodoi J., Gius D., Thioredoxin reductase regulates AP-1 activity as well as thioredoxin nuclear localization via active cysteines in response to ionizing radiation., *Oncogene.* 2002 Sep 12;21(41):6317-27.
- **Keller G.-A.**, Warner T.G., Steimer K.S.und Hallewell R.A., Cu,Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells.*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991), pp. 7381-7385
- **Kesti T.**, Frantti H. & Syväoja J.E., Molecular cloning of the cDNA for the catalytic subunit of human DNA polymerase . *J. Biol. Chem.* 268, 10238-10245 (1993).
- **Kiberstis P.**und Jean M., The Unstable Path To Cancer, *Science* 2002 July 26; 297: 543
- **Kim H.**, Jen J, Vogelstein B., Hamilton S.R., Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences., *Am J Pathol.* 1994 Jul;145(1):148-56.
- **Kim H.T.**, Kim Y.H., Nam J.W., Lee H.J., Rho H.M.und Jung G., Study of 5'-flanking region of human Cu/Zn superoxide dismutase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201 (1994), pp. 1526-1533

- **Kirkman H.N.**, Rolfo M., Ferraris A.M. und Gaetani G.F., Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J. Biol. Chem.* 274 (1999), pp. 13908-13914.
- **Kirkman H.N.**, Gaetani G.F., Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984), pp.4343-4347.
- **Kiyoe U.** und Hayes J.J., Nucleotide excision repair and chromatin remodeling, *European Journal of Biochemistry*, Volume 269 Issue 9 Page 2288-2293 May 2002, MINIREVIEW
- **Koishi R.**, Kawashima I., Yoshimura C., Sugawara M. und Serizawa N., Cloning and Characterization of a Novel Oxidoreductase KDRF from a Human Bone Marrow-derived Stromal Cell Line KM-102, *J. Biol. Chem.*, 272: 2570-2577, 1997
- **Kontos H.A.**, Wie E.P., Ellis E.F., Jenkins L.W., Povlishock J.T., Rowe G.T. und Hess M.L., Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. *Circ. Res.* 57 (1985), pp. 142-151
- **Köhrle J.**, Jakob F., Contompré B., Dumont J.E., Selenium, the Thyroid and the Endocrine System, *Endo.Rev.*(in press);
- **Kroemer G.**, Dallaporta B. und Resche-Rigon M., The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60 (1998), pp.619-642.
- **Kroncke K.D.**, Suschek C.V. und Kolb-Bachofen V., Implications of inducible nitric oxide synthase expression and enzyme activity. *Antioxid. Redox Signal.* 2 (2000), pp. 585-605.
- **Kumaraswamy E.**, Malykh A., Korotkov K.V., Sergei Kozyavkin, Hu Y., Kwon S.Y., Moustafa M.E., Carlson B.A., Berry M.J., Lee B.J., Hatfield D.L., Diamond A.M., und Gladyshev V.N., *J. Biol. Chem.*, Vol. 275, Issue 45, 35540-35547, November 10, 2000 L.J. Marnett, Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21 (2000)
- **Kunkel T. A.**, Exonucleolytic proofreading. *Cell* 53, 837-840 (1988).
- **Kuppusamy P.**, Zweier J.L., Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J. Biol. Chem.* 264 (1989), pp. 9880-9884.
- **Kyriakis J.M.**, Activation of the AP-1 transcription factor by inflammatory cytokines of the TNF family. *Gene Expr.* 7 (1999), pp. 217-231.
- **Larsen P.L.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 8905 (1993).

- **Leccia M.T.**, Yaar M., Allen N., Gleason M. und Gilchrest B.A., Solar simulated irradiation modulates gene expression and activity of antioxidant enzymes in cultured human dermal fibroblasts. *Exp. Dermatol.* 10 (2001), pp. 272-279.
- **Levanon D.**, Lieman-Hurwitz J., Dafni N., Wigderson M., Sherman L., Bernstein Y., Laver-Rudich Z., Danciger E., Stein O. und Groner Y. Architecture and anatomy of the chromosomal locus in human chromosome 21 encoding the Cu/Zn superoxide dismutase. *EMBO J.* 4 (1985), pp. 77-84
- **Lewis S.M.**, The mechanism of V(D)J joining: lessons from molecular, immunological, and comparative analyses. *Adv. Immunol.* 56(1994)27-150.
- **Lieber M. R.**, The FEN-1 family of structure-specific nucleases in eukaryotic DNA replication recombination and repair. *Bioessays* 19, 233-240 (1997).
- **Lindahl T.**, Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 1993;362:709-715. *Nature* 1993;362:709-715.
- **Liou W.**, Chang L.Y., Geuze H.J., Strous G.J., Crapo J.D. und Slot J.W., Distribution of CuZn superoxide dismutase in rat liver. *Free Radic. Biol. Med.* 14(1993), pp. 201-207
- **Lisby M.**, Ohlsen-Krogh B., Böge F., Westergaard O. & Knudsen B.R. (1998) *Biochemistry*, 37, 10815-10827.
- **Lowther W.T.**, Brot N., Weissbach H., Honek J.F. und Matthews B.W., Thiol-disulfide exchange is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000), pp. 6463-6468. Direct association with thioredoxin allows redox regulation of glucocorticoid receptor function., *J Biol Chem* 1999 Jan 29;274(5):3182-8
- **Lu R.**, Nash H. M. und Verdine G. L. (1997) *Curr. Biol.* 7, 397-407
- **Ly D.H.**, Lockhart D.J., Lerner R.A., Schultz P.G., Mitotic Misregulation and Human Aging, 31 March. 2000 Vol. 287, *Science*.
- **Makino Y.**, Yoshikawa N., Okamoto K., Hirota K., Yodoi J., Makino I., Tanaka H.
- **Marklund S.L.**, Bjelle A. und Elmqvist L.G., Superoxide dismutase isoenzymes of the synovial fluid in rheumatoid arthritis and in reactive arthritides. *Ann. Rheum. Dis.* 45 (1986), pp. 847-851
- **Marklund S.L.**, Holme E. und Hellner L., Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin. Chim. Acta* 126 (1982), pp. 41-51

- **Marklund S.L.**, Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982), pp. 7634-7638.
- **Marshall H.E.**, Merchant K.und Stamler J.S., Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *FASEB J.* 13 (2000), pp. 1889-1900.
- **Martindale J.L.**, Nikki J., Holbrook J., *Cell. Physiol.* 192: 1–15, 2002.
- **Masato F.**, Yoshida M.C., Oda H., Tajiri T., Nakabeppu Y, Tsuzuki T., Sekiguchi M., Genomic Structure and Chromosome Location of the Human mutT Homologue Gene MTH1 Encoding 8-Oxo-dGTPase for Prevention of A:T to C:G Transversion, *Genomics* Vol. 24, No. 3, December 1, 1994
- **Masuda A.**, Longo D.L., Kobayashi Y., Appela E., Oppenheim J.J.und Matsushima K., Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase by interleukin 1. *FASEB J.* 2 (1988), pp. 3087-3091.
- **Mates J.M.**, Perez-Gomez C.und Nunez de Castro I., Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 32 (1999), pp. 595-603.
- **Mazur D. J.** & Perrino F. W., Identification and expression of the TREX1 and TREX2 cDNA sequences encoding mammalian 3'-5' exonucleases. *J. Biol. Chem.* 274, 19655-19660(1999).
- **McCord J.M.**und Fridovich I., Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 244 (1969), pp. 6049-6055.
- **McIntyre M.**, Bohr D.F. und Dominiczak A.F., Endothelial function in hypertension. *Hypertension* 34 (1999), pp. 539-545
- **Melov S.**, Schneider J.A., Day B.J., Hinerfeld D., Coskun P., Mirra S.S., J.D. Crapo und D.C. Wallace, A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* 18 (1998), pp. 159-163.
- **Melov S.**, Ravenscroft J., Gill S.M.M.S., Walker D.W., Clayton P.E., Wallace D.C., Malfroy B., Doctrow S.R., Lithgow G.J., Extension of Life-Span with Superoxide Dismutase/Catalase Mimetics, 1 Sep. 2000 Vol. 289 *Science*
- **Meyer K.N.**, Kjeldsen E., Straub T., Knudsen B.R., Hickson I.D., Kikuchi A., Kreipe H.& Boege F. (1997) *J. Cell Biol.* 136, 775-788.
- **Migliaccio E.** *et al.*, *Nature* **402**, 309 (1999).
- **Mills G. G.**, (1959) The purification and properties of glutathione peroxidase of erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 234, 502-506.

- **Miranda-Vizuet** A., Spyrou G., The novel oxidoreductase KDRF is identical to human thioredoxin reductase. *Biochem. J.*, 325: 287-288, 1997.
- **Mohaghegh P**, Hickson I.D., Premature aging in RecQ helicase-deficient human syndromes., *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 Nov;34(11):1496-501. Review.
- **Morel Y.** und Barouki R., Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem. J.* 342 (1999), pp. 481-496.
- **Mörk H.**, Barth T., Kreipe H., Kraus M., Al-Taie O., Jakob F.& Scheurlen M. (1998) *Scand. J.Gastroenterol.* 33, 1130-1134.
- **Mörk H.**, Jakob F., Al-Taie O., Gassel A.E. & Scheurlen M. (1997) *J. Clin. Gastroenterol.* 24(4), 270-273.
- **Mörk H.**, Lex B., Scheurlen M., Dreher I., Schütze N., Köhrle J. & Jakob F. (1998) *Nutr. Cancer* 32, 64-70.
- **Morrison A.**, Johnston A.L., Johnston L.H. & Sugino A., Pathway correction DNA replication errors in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 12, 1467-1473 (1993)
- **Mummenbrauer T.** *et al.* p53 protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. *Cell* 85,1089-1099 (1996)
- **Nakamura K.**, Yodoi N.und J., Redox regulation of cellular activation. *Annu. Rev. Immunol.* 15 (1997), pp. 351-369.
- **Nauseef W.M.**, The NADPH-dependent oxidase of phagocytes. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 111 (1999), pp. 373-382.
- **Nikitovic D.**und Holmgren A., S-nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide. *J. Biol.Chem.* 271 (1996), pp. 19180-19185.
- **Norbury C.J.**und Hickson I.D., Cellular responses to DNA damage, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001. 41:367-401. *Biol Chem* 2002 Jun;383(6):873-92
- **Nordberg J.**, Arner E.S., Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system., *Free Radic Biol Med.* 2001 Dec 1;31(11):1287-312. Review.
- **Nordberg J.**und Arnéra E.S.J., *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 31
- **Nose K.**, Shibanuma M., Kikuchi K., Kageyama H., S. Sakiyama S. und Kuroki T., Transcriptional activation of early-response genes by hydrogen peroxide in a mouse osteoblastic cell line. *Eur. J. Biochem.* 201 (1991), pp. 99-106.

- **Oberley T.D.**, Verwiebe E., Zhong W., Kang S.W., Rhee S.G., Localization of the thioredoxin system in normal rat kidney., *Free Radic Biol Med* 2001 Feb 15;30(4):412-24
- **Ohlemiller K.K.**, McFadden S.L., Ding D.L., Flood D.G., Reaume A.G., Hoffman E.K., Scott R.W., Wright J.S., Putcha G.V. und Salvi R.J., Targeted deletion of the cytosolic Cu/Zn-superoxide dismutase gene (Sod1) increases susceptibility to noise-induced hearing loss. *Audiol. Neurootol.* 4 (1999), pp.237-246.
- **Orr W.C.** und Sohal R.S., *Science* **263**, 1128 (1994).
- **Orrell R.W.**, Amyotrophic lateral sclerosis: copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) gene mutations. *Neuromuscul. Disord.* 10 (2000), pp. 63-68.
- **Osborne SA**, Tonissen K.F., Genomic organisation and alternative splicing of mouse and human thioredoxin reductase 1 genes., *BMC Genomics.* 2001;2(1):10.
- **Ozolins T.R.**, Hales B.F., Oxidative stress regulates the expression and activity of transcription factor activator protein-1 in rat conceptus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280 (1997), pp. 1085-1093.
- **Palmer R.M.**, Ferrige A.G. und Moncada S., Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327 (1987)
- **Parboosingh J.S.**, Rouleau G.A., McKenna-Yasek M.V.D., Brown R.H., Jr und Figlewicz D.A., Absence of mutations in the Mn superoxide dismutase or catalase genes in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromuscul. Disord.* 5 (1995), pp. 7-10.
- **Parker A. E. et al.**, A human homologue of the *Schizosaccharomyces pombe* rad1+checkpoint gene encodes an exonuclease. *J. Biol. Chem.* 273, 18332-18339 (1998)
- **Parkes T.L. et al.**, *Nature Genet.* **19**, 171 (1998).
- **Parkes T.L.**, Elia A.J., Dickinson D., Hilliker A.J., Phillips J.P., Boulianne G.L., Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motorneurons. *Nat Genet.* 1998 Jun;19(2):171-4.
- **Patel J.M.**, Zhang J. und Block E.R., Nitric oxide-induced inhibition of lung endothelial cell nitric oxide synthase via interaction with allosteric thiols: role of thioredoxin in regulation of catalytic activity. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 15 (1996), pp. 410-419.

- **Patel R.P.**, Moellering D., Murphy-Ullrich J., Jo H., Beckman J.S. und Darley-Usmar V.M., Cell signaling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* 28 (2000), pp. 1780-1794
- **Paul T. T.** & Gellert M., A mechanistic basis for Mre11-directed DNA joining at microhomologies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 6409-6414 (2000)
- **Perrino F. W.**, Miller H. & Ealey K.A., Identification of a 3'-5' exonuclease that removes cytosine arabinoside monophosphate from 3' termini of DNA. *J. Biol. Chem.* 269,16357-16363 (1994), *J Biol Chem* 1999 Mar 26;274(13):8516-23
- **Pourquier P**, Ueng L.M., Fertala J., Wang D., Park H.J., Essigmann J.M., Bjornsti M.A., Pommier Y., Induction of reversible complexes between eukaryotic DNA topoisomerase I and DNA-containing oxidative base damages. 7, 8-dihydro-8-oxoguanine and 5-hydroxycytosine.
- **Rader C.P.**, Sterner T., Schütze N., Jakob F. & Eulert J. (1999) *J. Arthroplasty*
- **Radi R.**, Peluffo G., Alvarez M.N., Naviliat M. und Cayota A., Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* 30 (2001)
- **Rhee S.G.**, Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp. Mol. Med.* 31 (1999), pp. 53-59
- **Robson C. N.**, & Hickson, I. D. Isolation of cDNA clones encoding a human apurinic/aprimidinic endonuclease that corrects DNA repair and mutagenesis defects in *Escherichia coli* xth (exonuclease III) mutants. *Nucleic Acids Res.* 19, 1087-1092 (1991)
- **Ropp P.A.** & Copeland W.C., Cloning and characterization of the human mitochondrial DNA polymerase, DNA polymerase . *Genomics* 36, 449-458 (1996).
- **Rosen D.R.**, Siddique T., Patterson D., Figlewicz D.A., Sapp P., Hentati A., Donaldson D., Goto J., O'Regan J.P., Deng H.X. *et al.*, Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362 (1993), pp. 59-62.
- **Rosen H.**, Orman J., Rakita R.M., Michel B.R., Van Devanter D.R., Loss of DNA-membrane interactions and cessation of DNA synthesis in myeloperoxidase-treated *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990), pp. 10048-10052.
- **Rosenblum J.S.**, Gilula N.B. und Lerner R.A., On signal sequence polymorphisms and diseases of distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996), pp.4471-4473

- **Rossi F.**, Bellavite P., Berton G., Grzeskowiak M. und Papini E., Mechanism of production of toxic oxygen radicals by granulocytes and macrophages and their function in the inflammatory process. *Pathol. Res. Pract.* 180 (1985), pp. 136-142.
- **Rotruck J. T.**, Pope A.L., Ganther H.E., Swanson A.B., Hafeman D.G., Hoekstra W.G. (1973), Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179, 588-590
- **Rubbo R.**, Anselmi R.D., Kirk M., Barnes S., Butler J., Eiserich J.P. und Freeman B.A., Nitric oxide reaction with lipid peroxyl radicals spares alpha-tocopherol during lipid peroxidation. Greater oxidant protection from the pair nitric oxide/alpha-tocopherol than alpha-tocopherol/ascorbate. *J. Biol. Chem.* 275 (2000), pp. 10812-10818.
- **Rundlof A.K.**, Carlsten M., Arner E.S., The core promoter of human thioredoxin reductase 1: cloning, transcriptional activity, and Oct-1, Sp1 and Sp3 binding reveal a housekeeping-type promoter for the AU-rich element-regulated gene., *J Biol Chem* 2001 Aug 10;276(32):30542-51
- **Saitoh M.**, Nishitoh H., Fujii M., Takeda K., Tobiume K., Sawada Y., Kawabata M., Miyazono K. und Ichijo H., Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.* 17 (1998), pp. 2596-2606.
- **Schenk H.**, Klein M., Erdbrugger W., Droge W. und Schulze-Osthoff K., Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-B and AP-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994), pp. 1672-1676.
- **Schomburg L.**, U. Schweizer, B. Holtmann, L. Flohé, M. Sendtner, J. Köhrle, Gene disruption discloses role of Selenoprotein P in selenium delivery to target tissues, *Biochemical Journal Immediate Publication* 2003 (in press)
- **Schreck R.**, Albermann K. und P.A. Baeuerle, Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic. Res. Commun.* 17 (1992), pp. 221-237.
- **Schreck R.**, Rieber P. und Baeuerle P.A., Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10 (1991), pp. 2247-2258.
- **Schütze N.**, Bachthaler M., Lechner A., Köhrle J. & Jakob F. (1998) *Biofactors* 7, 299-310.

- **Schütze N.**, Lechner A., Groll C., Köhrle J. & Jakob F. (1998) *Endocrinology* 139, 1761-1770.
- **Sekiguchi J.**, Frank K, V(D)J recombination, *Curr Biol* 1999 Nov 18;9(22)
- **Sen C.K.**, Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochem. Pharmacol.* 55 (1998), pp. 1747-1758.
- **Sen C.K.**, Packer L., Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 10 (1996), pp. 709-720.
- **Shall S.**, de Murcia G., Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat Res* 2000;460:1-15.
- **Shav-Tal Y.** und Zipori D., PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins., *FEBS Lett.* 2002 Nov 6;531(2):109-14. Review.
- **Shevelev I.V.**, Hübscher U., *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3, 364-376 (2002)
- **Shevelev I. V.**, Kravetskaya T.P., Legina O.K. & Krutyakov V.M. External proofreading of DNA replication errors and mammalian autonomous 3'-5' exonucleases. *Mutat. Res.* 352,51-55 (1996)
- **Shevelev I.V.**, Ramadan K. & Hubscher U., The TREX2 3'-5' exonuclease physically interacts with DNA polymerase and increases its accuracy. *The Scientific World Journal* 2, 275-281 (2002).
- **Singh N.** und Aggarwal S., The effect of active oxygen generated by xanthine/xanthine oxidase on genes and signal transduction in mouse epidermal JB6 cells. *Int. J. Cancer* 62 (1995), pp. 107-114.
- **Smith G.C.M.**, Jackson S.P., 1999. The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.* 13:916–34
- **Söderberg A.**, Sahaf B. und Rosén A., Thioredoxin Reductase, a Redox-active Selenoprotein, Is Secreted by Normal and Neoplastic Cells: Presence in Human Plasma, *Cancer Research* 60, 2281-2289, April 15, 2000
- **Sohal R.S.**, Ku H.H., Agarwal S., Forster M.J. und Lal H. (1994b) Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation, and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech Ageing Dev* 74: 121–133
- **Soini Y.**, Kahlos K., Napankangas U., Kaartenaho-Wiik R., Saily M., Koistinen P., Paaakko P., Holmgren A., Kinnula V.L., Widespread expression of thioredoxin and

thioredoxin reductase in non-small cell lung carcinoma., *Clin Cancer Res.* 2001 Jun;7(6):1750-7.

- **St. Clair D.K.**, Oberley T.D., Muse K.E. und St Clair W.H., Expression of manganese superoxide dismutase promotes cellular differentiation. *Free Radic. Biol. Med.* 16 (1994), pp. 275-282
- **Stadtman E.R.**, Berlett B.S., Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab. Rev.* 30 (1998), pp. 225-243.
- **Stadtman E.R.** und Levine R.L., Protein oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899 (2000)
- **Stamler J.S.**, Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78 (1994), pp. 931-936.
- **Steinberg D.**, Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* 272 (1997), pp. 20963-20966.
- **Straub T.**, Boesenberg C., Gekeler V. & Boege F. (1997) *Biochemistry* 36, 10777-10783.
- **Straub T.**, Grue P., Uhse A., Lisby M., Knudsen B.R., Tange T., Westergaard O. & Boege F. (1998), The RNA-splicing factor PSF/p54 controls DNA-topoisomerase I activity by a direct interaction., *J. Biol. Chem.*, 273, 26261-26264.
- **Sun J.** und Tower J., *Mol. Cell. Biol.* **19**, 216 (1999).
- **Sundaresan M.**, Yu, Z.X., Ferrans V.J., Irani K. und Finkel T., Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 270 (1995), pp. 296-299
- **Sunde R. A.**, (1994) Intracellular glutathione peroxidases- Structure, regulation, and function. In: Burk, R.F. (ed.). *Selenium in Biology and Human Health* pp.45-77, Springer-Verlag, New York
- **Tamura T.**, Stadtman T.C., Mammalian thioredoxin reductases., *Methods Enzymol.* 2002;347:297-306
- **Thannickal V.J.** und Fanburg B.L., Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279 (2000), pp. L1005-1028
- **Thomas E.L.**, Lehrer R.I. und Rest R.F., Human neutrophil antimicrobial activity. *Rev. Infect. Dis.* 10 (1988), pp. S450-S456

- **Timblin C.R.**, Janssen Y.M., Goldberg J.L.und Mossman B.T., GRP78, HSP72/73, and cJun stress protein levels in lung epithelial cells exposed to asbestos,cadmium, or H₂O₂. *Free Radic. Biol. Med.* 24 (1998), pp. 632-642.
- **Tomkins J.**, Banner S.J., McDermott C.J.und Shaw P.J., Mutation screening of manganese superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport* 12 (2001), pp. 2319-2322
- **Tran H. T.**, Gordenin D.A. & Resnick M.A., The 3'5' exonucleases of DNA polymerases and the 5'-3' exonuclease Exo1 have major roles in postreplication mutation avoidance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2000-2007 (1999)
- **Uhlmann F.**, Gibbs E., Cai J., O'Donnell M., Hurwitz J., Identification of regions within the four small subunits of human replication factor C required for complex formation and DNA replication, *The Journal of Biological Chemistry* Volume 272, Issue 15, April 11, 1997, Pages 10065-10071
- **Van den Bosch M.**, Lohman P.H., Pastink A., DNA double-strand break repair by homologous recombination, *Biol Chem* 2002 Jun;383(6):873-92
- **Van Landeghem G.F.**, Tabatabaie P., Beckman G., Beckman L.und Andersen P.M., Manganese-containing superoxide dismutase signal sequence polymorphism associated with sporadic motor neuron disease. *Eur. J. Neurol.* 6 (1999), pp. 639-644
- **Vanfleteren J.R.**, *Biochem. J.* **292**, 605 (1993).
- **Visner G.A.**, Chesrown S.E., Monnier J., Ryan U.S.und Nick H.S., Regulation of manganese superoxide dismutase: IL-1 and TNF induction in pulmonary artery and microvascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188 (1992), pp. 453-462.
- **Visner G.A.**, Dougall W.C., Wilson J.M., BurrI.A. und Nick H.S., Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* 265 (1990), pp. 2856-2864
- **Wang J.C.**, Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective., *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Jun;3(6):430-40. Review.
- **Ward J.E.**, Nature of Lesions Formed by Ionizing Radiation. In Nickoloff JA, Hoekstra MF. eds; *DNA Damage and Repair Vol 2: DNA Repair in Higher Eukaryotes*. Totowa NJ: Human Press Inc.; 1998. p. 65-84.

- **Wei S.J.**, Botero A., Hirota K., Bradbury C.M., Markovina S., Laszlo A., Spitz D.R., Goswami P.C., Yodoi J., Gius D., Thioredoxin nuclear translocation and interaction with redox factor-1 activates the activator protein-1 transcription factor in response to ionizing radiation., *Cancer Res* 2000 Dec 1;60(23):6688-95
- **Weichselbaum R.R.**, Hallahan D., Fuks Z.und Kufe D., Radiation induction of immediate early genes: effectors of the radiation-stress response. *Int. J. Radiat.Oncol. Biol. Phys.* 30 (1994), pp. 229-234.
- **Weisiger R.A.**, Fridovich I., Mitochondrial superoxide dismutase:site of synthesis and intramitochondrial localization. *J. Biol. Chem.* 248 (1973), pp.4793-4796.
- **Wiedau-Pazos M.**, Goto J.J., Rabizadeh S., Gralla E.B., Roe J.A., Lee M.K., Valentine J.S. und Bredesen D.E., Altered reactivity of superoxide dismutase infamilial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 271 (1996), pp. 515-518.
- **Wingler K.**, Brigelius-Flohe R., Gastrointestinal glutathione peroxidase, *Biofactors* 1999;10(2-3):245-9
- **Wink D.A.**und Mitchell J.B., Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic.Biol. Med.* 25 (1998), pp. 434-456.
- **Winterbourn C.C.**, Vissers M.C. und Kettle A.J., Myeloperoxidase. *Curr. Opin. Hematol.* 7 (2000), pp. 53-58.
- **Winzer R.**, Schmutzler C., Jakobs T.C., Ebert R., Rendl J., Reiners C., Jakob F. & Köhrle J. (1998) *Thyroid* 8 (11), 981-987.
- **Wispe J.R.**, Warner B.B., Clark J.C., Day C.R., Neuman J., Glasser S.W., Crapo J.D., Chang L.-Y. und Whittsett J.A., Human Mn-superoxide dismutase in pulmonary epithelial cells of transgenic mice confers protection from oxygen injury. *J. Biol. Chem* 267 (1992), pp. 23937-23941
- **Wong G.H.W.**, Goeddel D.V., Induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science* 242(1988), pp. 941-944.
- **Yamaoka K.**, Sato E.F.und Utsumi K., Induction of two species of superoxide dismutase in some organs of rats by low dose X-irradiation. *Physiol. Chem.Phys. Med. NMR* 26 (1994), pp. 205-214.
- **Ylä-Herttuala S.**, Oxidized LDL and atherogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 874 (1999)

- **Yoo H.Y.**, Chang M.S. und Rho H.M., Heavy metal-mediated activation of the rat Cu/Zn superoxide dismutase gene via a metal-responsive element. *Mol. Gen. Genet.* 262 (1999), pp. 310-313.
- **Yoo H.Y.**, Chang M.S. und Rho H.M., The activation of the rat copper/zinc superoxide dismutase gene by hydrogen peroxide through the hydrogen peroxide-responsive element and by paraquat and heat shock through the same heat shock element. *J. Biol. Chem.* 274 (1999), pp. 23887-23892.
- **Yoshimura S.**, Suemizu H., Taniguchi Y., Arimori K., Kawabe N., Moriuchi T., The human plasma glutathione peroxidase-encoding gene: organization, sequence and localization to chromosome 5q32, *Gene* 1994 Aug 5;145(2):293-7
- **Yost F.J.J.**, Fridovich I., An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 248 (1973), pp. 4905-4908.
- **Zelko I.N.**, Mariani T.J. und Folz R.J., *Free Radical Biology and Medicine* Volume 33, Issue 3, 1 August 2002, Pages 337-349
- **Zhang J.**, Li Y.D., Patel J.M. und Block E.R., Thioredoxin overexpression prevents NO-induced reduction of NO synthase activity in lung endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 275 (1998), pp. L288-L293.
- **Zharkov D.O.**, Rieger R.A., Iden C.R., und Grollman A.P., (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 5335-5341
- **Zhu C.H.**, Huang Y., Oberley L.W. und Domann F.E., A family of AP-2 proteins down-regulate manganese superoxide dismutase expression. *J. Biol. Chem.* 276 (2001), pp. 14407-14413.
- **Zhu L.** & Halligan B.D., Characterization of a 3'-5' exonuclease associated with VDJP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259, 262-270 (1999)
- **Zimmerman B.J.**, Granger D.N., Mechanisms of reperfusion injury. *Am. J. Med. Sci.* 307 (1994), pp. 284-292.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Labor der Klinischen Forschergruppe der Medizinischen Poliklinik und im Labor für Experimentelle und Klinische Orthopädie der Universität Würzburg, Osteologiezentrum unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Franz Jakob angefertigt. Ihm gilt mein besonderer Dank für die Bereitstellung des Themas, für die intensive und lehrreiche Betreuung und die Begutachtung dieser Arbeit.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Manfred Gessler für die Übernahme des Korreferates.

Frau Dr. Regina Ebert danke ich insbesondere für die gute Zusammenarbeit, für die Unterstützung und für die Hilfe bei der Korrektur und Zusammenstellung der Methoden. Weiterhin möchte ich mich bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Klinischen Forschergruppe und des Osteologiezentrums für den interessanten Gedankenaustausch bedanken.

Danken möchte ich auch meinen Freunden Elena und Michael, meinen Eltern und dem Graduiertenkolleg 639 ohne deren Hilfe die Durchführung dieser Promotion nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Name: Paunescu
Vorname: Karina
Geburtsdatum: 31.08.1973
Geburtsort: Bukarest/Rumänien

1976-1979 Kindergarten
1979-1987 Grundschule
1987-1991 Gymnasium
1991 Abitur am Lyzeum für Mathematik und Physik "Horia Hulubei", Bukarest
1991-1997 Studium der Humanmedizin an der Universität "Carol Davila", Bukarest
1997 Abschlussprüfung (Lizenzprüfung)
1/1998-3/1999 Anstellung als Ärztin im Praktikum (Stagiar) in der Universitätskrankenhaus Bukarest
4/1999-1/2000 Praxis Dr. Liliana Voinea und Universitätskrankenhaus Bukarest als Assistenzärztin in der Augenheilkunde
2/2000-7/2000 Gastärztin Augenklinik und Poliklinik Würzburg
8/2000-1/2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin Augenklinik der Universität Würzburg
ab 2/2001 Mitglied des Graduiertenkollegs 639 "Molekulare und Strukturelle Grundlagen der Tumorstabilität" Würzburg



Unterschrift