

# Expression und Regulation $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin $\text{D}_3$ responsiver Gene in monozytären Zellen

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Regina Ebert-Dümig**

aus

Lohr am Main

Würzburg, 2000

Eingereicht am: 03.07.2000

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. W. Goebel

Gutachter: PD Dr. F. Jakob

Gutachter: Prof. Dr. P.-F Röseler

Tag des Promotionskolloquiums: \_\_\_\_\_

Doktorurkunde ausgehändigt am: \_\_\_\_\_

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und dabei keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Alle aus der Literatur ganz oder annähernd entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Weiter erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation weder vollständig, noch teilweise einer anderen Fakultät mit dem Ziel vorgelegt worden ist, einen akademischen Titel zu erwerben. Hiermit bewirbe ich mich erstmals um den Doktorgrad der Naturwissenschaften der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Würzburg, den 21.06.2000

---

Regina Ebert-Dümig

Danken möchte ich:

- Herrn PD Dr. Franz Jakob für die Bereitstellung des Themas, für die intensive und lehrreiche Betreuung und die Begutachtung dieser Arbeit
- Herrn Prof. Dr. Peter-Frank Röseler für die Übernahme des Korreferates und die Vertretung der Arbeit an der Fakultät für Biologie der Universität Würzburg
- Herrn Prof. Dr. Josef Köhrle für die erregte wissenschaftliche Diskussion und die Durchsicht des Manuskriptes
- Herrn Dr. Jochen Seufert für die gute Zusammenarbeit
- allen ehemaligen und der zeitigen Mitgliedern der Klinischen Forschergruppe für den regen Gedankenaustausch
- Mein besonderer Dank gilt Frau Doris Schneider für ihre Unterstützung

## Zusammenfassung

Das Steroid Vitamin D<sub>3</sub> wird durch die Nahrung aufgenommen oder im Organismus synthetisiert, wobei eine Reaktion in der Haut durch einen photochemischen Prozess katalysiert wird. Durch zwei Hydroxylierungsschritte in Leber und Niere wird Vitamin D<sub>3</sub> über 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> zum aktiven 1, 25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Hormon. 1, 25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> hat eine wichtige Funktion im Knochenstoffwechsel, es reguliert die Ca<sup>2+</sup>-Resorption im Dünndarm. Die 1, 25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Synthese in der Niere wird durch Parathormon (PTH) kontrolliert. Ist die Serum Ca<sup>2+</sup>-Konzentration niedrig, wird PTH ausgeschüttet und die 1- $\alpha$ -Hydroxylase, das 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub>-aktivierende Enzym, stimuliert.

Das Prinzip der (Seco)steroid-Aktivierung und -Inaktivierung in glandulären Organen, wie Leber und Niere mit anschließender Freisetzung der aktiven Hormone und Transport zu den jeweiligen Zielgeweben gilt heute nicht mehr eingeschränkt. Auch Endozellen sind in der Lage Steroid-modifizierende Enzyme, die Hydroxylasen und Dehydrogenasen, zu exprimieren. Monozytäre Zellen exprimieren das 1, 25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-aktivierende und das -inaktivierende Enzym, die 1- $\alpha$ -Hydroxylase und die 24-Hydroxylase. Sie sind somit in der Lage, 1, 25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> zu sezernieren, welches parakrin auf Nachbarzellen wirken kann.

In diesem Zusammenhang wurde die Expression und Regulation der 1- $\alpha$ -Hydroxylase in peripheren Blutmonozyten (PBM) und monozytären THP1-Zellen untersucht. Durch Supplementation der Zellen mit dem Substrat 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> konnte die Produktion an aktivem 1, 25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Hormon in PBM signifikant gesteigert werden. In PBM konnte im Gegensatz zum systemischen Ca<sup>2+</sup>-Stoffwechsel nur ein geringer Einfluss auf die 1- $\alpha$ -Hydroxylase-Aktivität beobachtet werden. Durch RT-PCR-Amplifikation konnte eine Expression des PTH Rezeptors Typ 1 (PTHr1) in PBM und Dendritischen Zellen nachgewiesen werden. Ein weiterer Ligand des PTHr1 ist PTH related Protein (PTHrP), ein Faktor der die Tumorerkrankung parakrin propagiert. Durch Markierungsexperimente mit fluoreszenz-markiertem PTHrP konnte gezeigt werden, dass PTHrP an die Zellmembran von PBM und Dendritischen Zellen bindet und in den Zellkern von Dendritischen Zellen transportiert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-responsive Gene in Monozyten/Makrophagen untersucht. Die Expression der 24-Hydroxylase wird innerhalb der Differenzierung von myeloischen THP1-Zellen zu Makrophagen- bzw. Osteoklasten-ähnlichen Zellen transient induziert. Als weiteres 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-responsives Gen wurde die Expression von Osteopontin (OPN) untersucht. OPN ist ein vor allem in Knochen vorkommendes Matrixprotein, das wesentlich an der Zelladhäsion beteiligt ist. OPN wird in THP1-Zellen im Zuge der Differenzierung zunehmend exprimiert. Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte OPN in Granulomen von Morbus Crohn- und Lebererkrankungen detektiert werden. Es spielt hier eine wesentliche Rolle bei der Granulomentstehung. Die Thioredoxin Reduktase 1 (TR1) ist ein Selenoenzym, welches maßgeblich an der Reduktion von Disulfidbindungen in Proteinen beteiligt ist. Es moduliert Protein/Protein- und Protein/DNA-Interaktionen wie die Bindung der Transkriptionsfaktoren AP1 und NF $\kappa$ B an DNA-responsive Elemente. Die Expression der TR1 wird in THP1-Zellen im Rahmen der Differenzierung induziert und ist in differenzierten Zellen maximal. Aktivitätsmessungen deckten sich mit dieser Beobachtung. In peripheren Blutmonozyten steigt die TR-Aktivität alleine durch Adhäsion der Zellen an das Kulturgefäß und nach Behandlung mit 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten eine Abhängigkeit der TR-Aktivität vom Differenzierungsgrad der Zellen und der Supplementation des Mediums mit dem Spurenelement Selen. Die Expression weiterer Selenoproteine in monozytären Zellen wurde nachgewiesen. So konnten durch <sup>75</sup>Selenit-Markierungsexperimente neun Selenoproteine in THP1-Zellen detektiert werden, von denen fünf sezerniert werden. Ein weiteres, in monozytären Zellen charakterisiertes Selenoprotein ist die zelluläre Glutathionperoxidase. Ihre Aktivität konnte in Selenit-supplementierten Zellen um das 70fache gesteigert werden. Die Kultivierung monozytärer Zellen unter Selenit-Supplementation beeinflusst die Funktion dieser Zellen wesentlich. So konnte beobachtet werden, dass die Anzahl an phagozytierenden, zu Makrophagen differenzierten THP1-Zellen nach Selenit-Supplementation abnahm, während die Phagozytoserate der einzelnen Zellen anstieg.

Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass monozytäre Zellen mit Komponenten des 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> Stoffwechsels ausgestattet sind und aktives 1, 25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Hormon produzieren, sezernieren und inaktivieren können. Die lokale Kontrolle der 1, 25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> Synthese und Inaktivierung reguliert die Expression 1, 25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-responsiver Gene, wie die Expression

## Summary

The secosteroid 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> is either taken up by our daily diet or it is formed by a photochemical process in the skin. In liver and kidney vitamin D<sub>3</sub> is hydroxylated in two steps to 25(OH) vitamin D<sub>3</sub> and the active hormone 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>. 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> plays an important role in bone metabolism. It is a key regulator of the resorption of Ca<sup>2+</sup> in the intestine. In the kidney 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> synthesis is controlled by parathyroid hormone (PTH). When the concentration of serum Ca<sup>2+</sup> is low, PTH is secreted and 1 $\alpha$ -hydroxylase, the 25(OH) vitamin D<sub>3</sub> activating enzyme is induced in kidney.

The picture of (seco)steroid activation and inactivation in glandular organs, like the liver and kidney, and the release and transport of the activated hormone to the target tissues has been modified recently. Single cells are also able to express steroid-modifying enzymes like hydroxylases and dehydrogenases. Monocytes express the 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>-activating and the inactivating enzyme, i.e. the 1 $\alpha$ -hydroxylase and the 24-hydroxylase. Thus they are able to build and secrete 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> which can act on neighbouring cells in a paracrine way.

In this context the expression and regulation of the 1 $\alpha$ -hydroxylase in peripheral blood monocytes (PBM) and THP1 cells was investigated. By supplementation of cells with the substrate 25(OH) vitamin D<sub>3</sub> the production of active 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> hormone could be enhanced significantly in PBM. In PBM only a slight influence of PTH on 1 $\alpha$ -hydroxylase activity could be observed, in contrast to the regulation in systemic Ca<sup>2+</sup>-metabolism. An expression of PTH receptor type 1 (PTHr1) could be verified by RT-PCR from whole RNA isolated from PBM and dendritic cells. A further ligand of PTHr1 is PTH related protein (PTHrP), a factor which propagates the humoral hypercalcemia of malignancy. Labeling experiments with a fluorescently marked PTHrP showed clustered membrane staining of PBM and dendritic cells and a transport to the nucleus of dendritic cells.

The expression of 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>-responsive genes in monocytes/macrophages was investigated. 24-hydroxylase is induced transiently during the differentiation of myeloid THP1 cells to macrophages and osteoclast-like cells, respectively. Next, the expression of osteopontin (OPN), a further 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> responsive gene was studied. OPN is a matrix protein that is mainly found in bone, it carries a RGD-motif in its amino acid sequence which can bind to integrins and is involved in cell adhesion. The expression of OPN is increased during differentiation of THP1 cells. By immunohistochemistry OPN could be detected in Crohn's disease and liver granulomas where it also plays an important role in granuloma formation. The thioredoxin reductase 1 (TR1) is a selenoenzyme that is mainly involved in the reduction of disulfide bonds of proteins. It modulates protein/protein and protein/DNA interactions like the binding of the transcription factors AP1 and NF $\kappa$ B to DNA-responsive elements. The expression of TR1 mRNA is induced during differentiation and is maximal in differentiated cells. Activity measurements parallel these observations. In PBM TR-activity is increased by the event of adhesion of cells to the culture dish and after treatment with 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>. A dependence of TR-activity on the degree of differentiation of cells and the supplementation of the medium with the trace element selenium was observed. The expression of further selenoproteins in monocytic cells was investigated. In THP1 cells nine selenoproteins could be detected. By labeling experiments with <sup>75</sup>Selenite. Five were found as secreted proteins in the culture supernatant. In monocytes cellular glutathione peroxidase (cGPx) is a well characterized selenoprotein. Activity could be increased 70 fold by selenite supplementation. Under selenite supplementation the number of differentiated THP1 cells capable of phagocytosis was diminished while the rate of phagocytosis of single cells was enhanced.

Taken together, the experiments clearly indicate that monocytic cells are equipped with the components of 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> metabolism and thus are capable of 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> hormone synthesis, secretion and turnover. Moreover, local control of 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> synthesis and inactivation directly regulates the expression of 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>A EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1 VITAMIN D<sub>3</sub>-METABOLISMUS .....</b>	<b>1</b>
1.1 1,25(OH) <sub>2</sub> VITAMIN D <sub>3</sub> -MANGEL UND KNOCHENSTOFFWECHSEL .....	3
1.2 1,25(OH) <sub>2</sub> VITAMIN D <sub>3</sub> UND GRANULOMATÖSE ERKRANKUNGEN .....	4
<b>2 GENOMISCHE EFFEKTE DES 1,25(OH)<sub>2</sub> VITAMIN D<sub>3</sub> .....</b>	<b>5</b>
2.1 DER NUKLEÄRE 1,25(OH) <sub>2</sub> VITAMIN D <sub>3</sub> -REZEPTOR (NVDR).....	5
<b>3 'NICHTGENOMISCHE' EFFEKTE DES 1,25(OH)<sub>2</sub> VITAMIN D<sub>3</sub>.....</b>	<b>7</b>
<b>4 PRINZIP DER LOKALEN STEROIDAKTIVIERUNG.....</b>	<b>8</b>
<b>5 MYELOISCHE ZELLDIFFERENZIERUNG .....</b>	<b>8</b>
5.1 MAKROPHAGEN UND OSTEOKLASTEN .....	9
5.2 DENDRITISCHE ZELLEN .....	11
<b>6 1,25(OH)<sub>2</sub> VITAMIN D<sub>3</sub>-RESPONSIVE GENE IM KNOCHEN UND IN MONOZYTEN/     MAKROPHAGEN .....</b>	<b>12</b>
6.1 THIOREDOXIN REDUKTASEN – SELENOENZYME.....	14
6.1.1 Einbau von Selenocystein in Proteine .....	15
<b>7 WEITERE EUKARYONTISCHE SELENOPROTEINE.....</b>	<b>16</b>
7.1 GLUTATHIONPEROXIDASEN .....	16
7.2 SELENOPROTEIN P .....	18
7.3 DEIODASEN .....	19
7.4 SELENOPROTEINE UNBEKANNTER FUNKTION .....	20
<b>8 OXIDATIVER STRESS UND ANTIOXIDATIVE SCHUTZMECHANISMEN .....</b>	<b>20</b>
<b>9 REDOX-REGULIERTE TRANSKRIPTIONSFAKTOREN AP1, REF-1 UND NFκB.....</b>	<b>21</b>
<b>B FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>24</b>
<b>C MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>25</b>
<b>1 MATERIAL .....</b>	<b>25</b>
1.1 LÖSUNGEN UND PUFFER .....	25

---

<b>1.3</b>	<b>PLASMIDE .....</b>	<b>25</b>
<b>1.4</b>	<b>OLIGONUKLEOTIDE .....</b>	<b>26</b>
<b>1.5</b>	<b>EUKARYONTISCHE ZELLEN.....</b>	<b>26</b>
1.5.1	THP1-Zellen .....	26
1.5.2	COS7-Zellen.....	27
1.5.3	Monozyten .....	27
1.5.4	Dendritische Zellen .....	27
1.5.5	HEK-293 und HEK-293 Tx-PTHR1 Zellen .....	27
<b>1.6</b>	<b>COMPUTERSOFTWARE .....</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>28</b>
<b>2.1</b>	<b>ZELLKULTUR .....</b>	<b>28</b>
2.1.1	Kulturbedingung und Passagierung .....	28
<b>2.2</b>	<b>ARBEITEN MIT NUKLEINSÄUREN.....</b>	<b>28</b>
2.2.1	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA .....	28
2.2.2	Verwendete cDNA-Sonden.....	28
2.2.3	Arbeiten mit RNA .....	29
2.2.3.1	Isolierung von Gesamt-RNA .....	29
2.2.3.2	DNaseI-Behandlung von RNA .....	29
2.2.3.3	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese und Northern Blot .....	30
2.2.3.3.1	Auftrennung von RNA im denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel .....	30
2.2.3.3.2	Hybridisierung .....	30
2.2.3.3.3	Waschen von Northern Blots und Autoradiographie .....	31
2.2.3.4	Reverse Transkription von RNA.....	31
2.2.4	Arbeiten mit DNA .....	31
2.2.4.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	31
2.2.4.2	Restriktion von DNA.....	32
2.2.4.3	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	32
2.2.4.4	Elution von DNA-Fragmenten .....	33
2.2.4.5	Klonierung von PCR-Produkten .....	33
2.2.4.5.1	Polieren der Enden .....	33
2.2.4.5.2	Phosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	33
2.2.4.5.3	Dephosphorylierung des Vektors .....	33
2.2.4.5.4	Ligation.....	34
2.2.4.6	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien.....	34



2.2.4.6.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ oder JM109.....	34
2.2.4.7	Isolierung von Plasmid-DNA .....	35
2.2.4.7.1	Mini-Präparation .....	35
2.2.4.7.2	Midi-und Maxi-Präparation.....	35
2.2.4.8	Sequenzierung.....	35
2.2.4.9	Radioaktive Markierung von DNA .....	36
2.2.4.9.1	End-Markierung von Oligonukleotiden mit T4-Polynukleotid-Kinase .....	36
2.2.4.9.2	Markierung von cDNA-Sonden und anderen Restriktionsfragmenten .....	36
2.2.4.9.3	Abtrennung der freien Nukleotide.....	36
2.2.4.10	Southern Blot.....	36
2.2.4.11	Transfektion von COS7-Zellen.....	37
<b>2.3</b>	<b>ARBEITEN MIT PROTEINEN.....</b>	<b>37</b>
2.3.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen .....	37
2.3.2	Messung von Thioredoxin Reduktase- und Glutathionperoxidase-Aktivität .....	37
2.3.2.1	Präparation der zytosolischen Fraktion für TR- und GPx-Messung .....	38
2.3.2.2	Messung der Thioredoxin Reduktase-Aktivität.....	38
2.3.2.3	Messung der Glutathionperoxidase-Aktivität.....	38
2.3.3	Metabolische Markierung von Zellen mit <sup>75</sup> Se.....	39
2.3.3.1	SDS-PAGE .....	40
2.3.4	Gel-Shift-Analysen.....	42
2.3.4.1	Präparation von Kernextrakten .....	42
2.3.4.2	Bindungsreaktion .....	43
2.3.4.3	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	44
2.3.5	Rezeptorbindungsassay: Bindung von PTH related Protein (PTHrP) an den PTH Rezeptor Typ 1 (PTHR1).....	44
2.3.5.1	Markierung von PTHrP mit Cy3.5.....	44
2.3.5.2	Anfärben von Monozyten und Dendritischen Zellen mit PTHrP-Cy3.5.....	44
2.3.6	Immunhistochemie.....	45
<b>2.4</b>	<b>PHAGOZYTOSETEST.....</b>	<b>45</b>
<b>2.5</b>	<b>1,25(OH)<sub>2</sub> VITAMIN D<sub>3</sub> RADIOIMMUNOASSAY .....</b>	<b>46</b>
<b>D</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>47</b>
<b>1</b>	<b>1,25(OH)<sub>2</sub> VITAMIN D<sub>3</sub>-RESPONSIVE GENE IN MONOZYTEN UND MAKROPHAGEN .....</b>	<b>47</b>

---

1.1.1	Expression der 1 $\alpha$ -Hydroxylase und des PTHR1 in Monozyten .....	47
1.1.1.1	PTH-Rezeptor Typ 1 in Dendritischen Zellen und embryonalen Nierenzellen.....	49
1.1.2	Klonierung der 1 $\alpha$ -Hydroxylase und des PTH Rezeptors Typ 1 .....	50
1.1.2.1	1 $\alpha$ -Hydroxylase cDNA.....	50
1.1.2.2	PTH-Rezeptor Typ 1 Fragment.....	51
1.1.3	Überexpression der 1 $\alpha$ -Hydroxylase in COS7-Zellen .....	51
1.1.3.1	PCR-Nachweis der Transkription nach Transfektion .....	51
1.1.4	1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin D <sub>3</sub> Radioimmunoassay (RIA).....	52
1.1.4.1	1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin D <sub>3</sub> Produktion in transfizierten COS7-Zellen .....	52
1.1.4.2	1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin D <sub>3</sub> Produktion in Monozyten .....	53
1.1.4.3	1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin D <sub>3</sub> -Produktion in THP1-Zellen .....	54
1.1.5	Bindungsnachweis von PTHrP an den PTH Rezeptor Typ 1 .....	56
1.1.5.1	Von Monozyten und embryonalen Nierenzellen .....	56
1.1.5.2	Von Dendritischen Zellen.....	57
<b>1.2</b>	<b>24-HYDROXYLASE: MRNA-EXPRESSION.....</b>	<b>57</b>
<b>1.3</b>	<b>OSTEOPONTIN .....</b>	<b>58</b>
1.3.1	mRNA-Expression .....	58
1.3.2	Immunhistochemischer Nachweis von Osteopontin .....	60
<b>1.4</b>	<b>SELENOPROTEIN THIOREDOXIN REDUKTASE 1 (TR1).....</b>	<b>61</b>
1.4.1	mRNA-Expression .....	61
1.4.1.1	In undifferenzierten THP1-Zellen.....	61
1.4.1.2	In differenzierten THP1-Zellen.....	61
1.4.2	TR-Aktivitätsmessungen.....	63
1.4.2.1	Selenitabhängige Aktivitätssteigerung in THP1-Zellen .....	63
1.4.2.2	1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin D <sub>3</sub> -abhängige Aktivitätssteigerung in THP1-Zellen.....	64
1.4.2.3	TR-Aktivität in differenzierten THP1-Zellen.....	65
1.4.2.4	TR-Hemmung durch Aurothioglucose in THP1-Zellen .....	67
1.4.2.5	TR-Aktivität in peripheren Blutmonozyten.....	67
1.4.3	Einfluss der TR1 auf die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren .....	68
1.4.3.1	Aktivierung von AP1 .....	68
1.4.3.2	NF $\kappa$ B Aktivierung in THP1-Zellen nach GMCSF, IL-4 und ATG-Stimulation.	69
1.4.3.3	Einfluss von oxidativem Stress auf die NF $\kappa$ B Aktivierung in THP1-Zellen ....	71
<b>2</b>	<b>WEITERE SELENOPROTEINE IN MONOZYTEN/MAKROPHAGEN.....</b>	<b>72</b>

---

2.2	AKTIVITÄT DER GLUTATHIONPEROXIDASE (GPx) IN THP1-ZELLEN .....	73
3	EINFLUSS VON SELENIT AUF DIE PHAGOZYTOSE VON THP1-ZELLEN .....	74
<b>E</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>76</b>
1	1,25(OH) <sub>2</sub> VITAMIN D <sub>3</sub> RESPONSIVE GENE IN MONOZYTÄREN ZELLEN .....	77
1.1	1 $\alpha$ -HYDROXYLASE .....	78
1.1.1	Rolle von PTHrP in Monozyten und Dendritischen Zellen .....	80
1.2	24-HYDROXYLASE .....	82
1.3	OSTEOPONTIN .....	83
1.4	THIOREDOXIN-REDUKTASEN - SELENOPROTEINE .....	84
2	SELENOPROTEINE IN MONOZYTEN/MAKROPHAGEN .....	86
2.1	GLUTATHIONPEROXIDASEN .....	86
2.2	SELENOPROTEIN P .....	87
2.3	WEITERE SELENOPROTEINE .....	87
3	BIOLOGISCHE RELEVANZ ANTIOXIDATIVER SELENOPROTEINE IN ZELLEN DES IMMUNSYSTEMS.....	88
4	EINFLUSS VON SELEN AUF DIE PHAGOZYTOSE.....	89
5	EINFLUSS VON SELEN AUF DIE AKTIVIERUNG VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN .....	90
5.1	AP1 .....	90
5.2	NF $\kappa$ B, TNF $\alpha$ UND PATHOLOGISCHE IMMUNREAKTIONEN .....	90
<b>F</b>	<b>VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>93</b>
<b>G</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>95</b>

---

# A Einleitung

## 1 Vitamin D<sub>3</sub>-Metabolismus

Vitamin D<sub>3</sub> wurde 1920 von Mellanby entdeckt und in den zwanziger Jahren als fettlösliches Vitamin, das essentiell für die normale Entwicklung des Skelettes ist, eingestuft (Bouillon, 1995). Bereits zu dieser Zeit war bekannt, dass Vitamin D<sub>3</sub> in der Haut durch Sonneneinstrahlung gebildet werden und Rachitis heilen kann. Erst 1932 wurde die chemische Struktur aufgeklärt und Vitamin D<sub>3</sub> der Familie der Secosteroide zugeordnet.

In der Haut wird durch Lichtenergie der Wellenlänge 290-315 nm das dort gespeicherte 7-Dehydrocholesterol zu Prävitamin D<sub>3</sub> photolytisch gespalten. In einem temperaturabhängigen Prozess isomerisiert Prävitamin D<sub>3</sub> zu Vitamin D<sub>3</sub> (Holick *et al.*, 1980; MacLoughlin *et al.*, 1982). Das biologisch inerte Vitamin D<sub>3</sub> bindet an das Vitamin D-bindende Protein (DBP) im Serum, wird abtransportiert und steht für weitere Stoffwechselprozesse zur Verfügung. Vitamin D<sub>3</sub> wird in mehreren Stufen zum aktiven Hormon 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> hydroxyliert. Der erste Schritt erfolgt in der Leber. Vitamin D<sub>3</sub> wird von der 25-Hydroxylase zu dem ebenfalls biologisch inerten 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (25(OH) Vitamin D<sub>3</sub>) umgewandelt. In den proximalen Tubuluszellen der Niere, wo der Transport ebenfalls über das DBP erfolgt, wird durch einen weiteren Hydroxylierungsschritt an Position 1 des Secosteroidgerüsts das aktive Hormon 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> gebildet. Das aktive Hormon wird von der 24-Hydroxylase in vielen Geweben weiter metabolisiert. Dieses Enzym wird durch das Substrat, 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> induziert. Es kann auch 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> umsetzen und liefert als Produkt 1,24,25(OH)<sub>3</sub> Vitamin D<sub>3</sub> oder 24,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>. Diese Metabolite galten lange Zeit als inaktiv. Neuere Daten zeigen jedoch Wirkungen, die unterschiedlich zu den klassischen 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> Effekten sind (Schwartz *et al.*, 2000). In der Niere wird die Synthese von 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> vor allem durch Parathormon (PTH) stimuliert, das in den Nebenschilddrüsen gebildet wird. Über den Ca<sup>2+</sup>-Sensor der Nebenschilddrüse wird die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration des Serums gemessen. Bei einer niedrigen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration wird die PTH-Synthese gesteigert und in der Niere die 1 $\alpha$ -Hydroxylase stimuliert. Das in der Niere gebildete 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> hemmt seinerseits die Ausschüttung von PTH aus den Nebenschilddrüsen. Im Dünndarm wird die Ca<sup>2+</sup>-Resorption durch 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> stimuliert. Abb. 1 und Abb. 2 zeigen den Vitamin D<sub>3</sub>-Stoffwechsel und die Ca<sup>2+</sup>- und Vitamin D<sub>3</sub>-Regulation im Organismus.

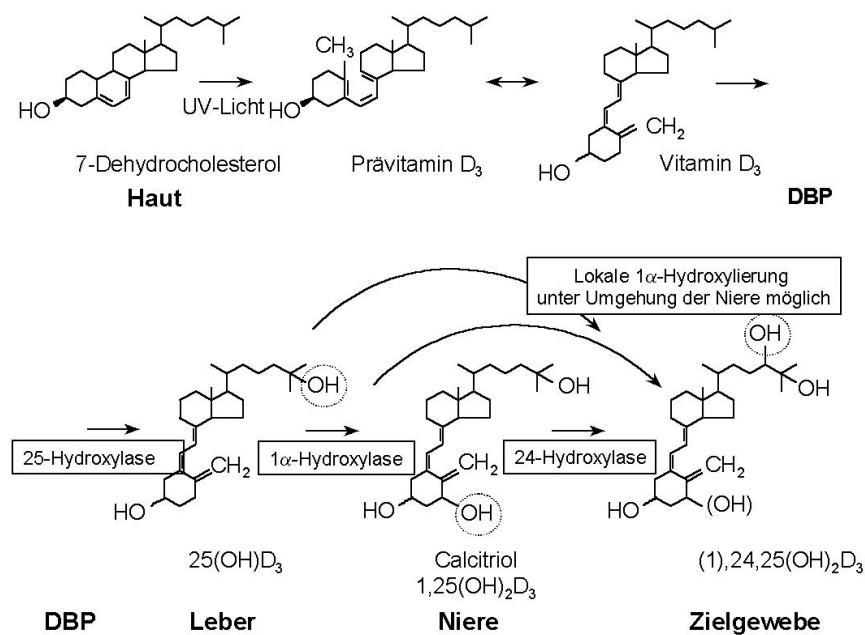


Abb. 1: **1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Metabolismus**. Aus 7-Dehydrocholesterol wird durch Lichtenergie in der Haut Prävitamin D<sub>3</sub> und Vitamin D<sub>3</sub>, das dann durch zwei Hydroxylierungsschritte in Leber und Niere zu 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> umgewandelt wird. Das aktivierende Enzym ist die 1α-Hydroxylase.

PTH vermittelt seine Wirkung über zwei Rezeptoren, den PTH Rezeptor Typ 1 und Typ 2 (PTHR1 und PTHR2). Bindung des Liganden an den PTHR1, ein G-Protein gekoppelter, sieben Membranhelices umfassender Rezeptor, aktiviert die Adenylat-Cyclase/Proteinkinase A sowie die Phospholipase C/Proteinkinase C-Signaltransduktionskaskade (Mannstadt *et al.*, 1999). Der PTHR1 wird in Nierentubuli, knochenaufbauenden Zellen, sogenannten Osteoblasten und Knorpelmatrix-sekretierenden Zellen, sogenannten Chondrozyten exprimiert. Ein weiterer Ligand für den PTHR1 ist das PTH related Protein (PTHrP, Schipani *et al.*, 1993). Es besteht gewöhnlich aus 141 Aminosäuren, der N-Terminus ist zum PTH in den Aminosäuren 1-13 identisch. Die Homologie nimmt zum C-Terminus hin ab, zwischen den Positionen 14-34 stimmen nur noch drei Aminosäuren überein. Durch alternatives Splicing können auch Isoformen mit 139 oder 173 Aminosäuren auftreten. PTHrP wurde als Tumorerhyperkalzämie-propagierender Faktor identifiziert (Suva *et al.*, 1987). Im Gegensatz zu PTH, das nur in der Nebenschilddrüse und in geringer Konzentration im Hypothalamus der Ratte gebildet wird und dessen Wirkungsweise der einer 'klassischen' Hormonwirkung entspricht, findet die Expression des parakrin wirkenden PTHrP in unterschiedlichen Geweben statt. PTHrP

sterben kurz nach der Geburt. Phänotypisch ist der PTHrP-Knockout durch eine verfrühte Ossifikation und v ermindertem L ängenwachstum der Knochen gekennzeichnet (Lanske *et al.*, 1999) . I n Gr anulomen v on Sarkoidose-Patienten, i n Ker atinozyten und aktivierten Makrophagen w ährend der W undheilung w ird PTHrP ebenf alls ex primiert (Zeimer *et al.*, 1998; Blomme *et al.*, 1999).

An den PTHR2, der zum PTHR1 eine 51%ige Sequenzidentität zeigt, bindet PTH jedoch nicht PTHrP. In der Ratte w ird PTHR2 i n der Nebenschilddrüse, i n den I nselzellen des Pankreas und einigen Zellen des Gastrointestinaltraktes exprimiert (Usdin *et al.*, 1995 und 1999). Über die biologische Relevanz des PTHR2 ist bisher noch nichts bekannt.

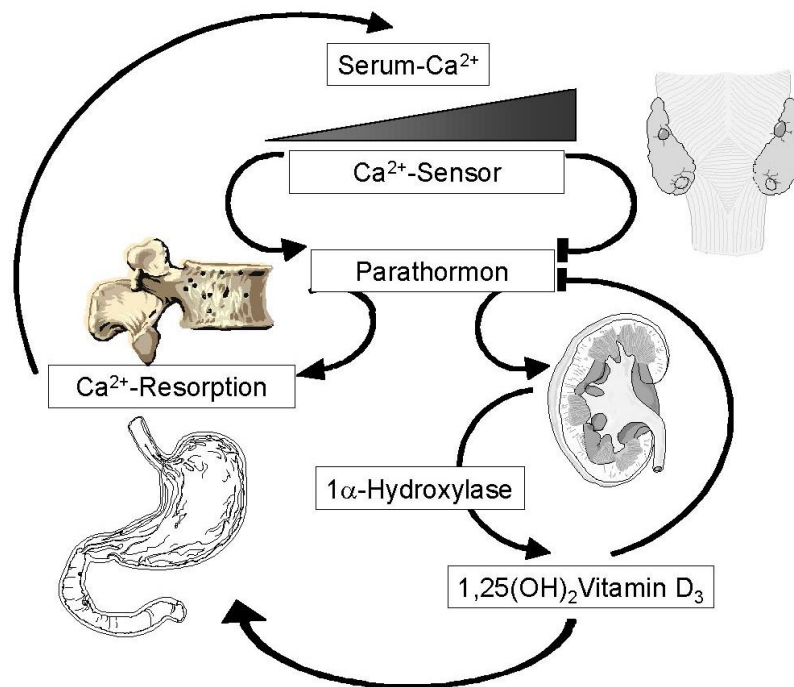


Abb. 2: **Schematische Darstellung der  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -Regulation im Organismus.** Über den  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor der Nebenschilddrüse wird die PTH-Ausschüttung gesteuert. PTH stimuliert die  $1\alpha$ -Hydroxylase in der Niere. Das gebildete  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  reguliert im Dünndarm und im Knochen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Resorption bzw. -Freisetzung.

### 1.1 $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin $\text{D}_3$ -Mangel und Knochenstoffwechsel

Ernährungsbedingter Vitamin  $\text{D}_3$ -Mangel führt bei Kindern zu Rachitis, ist jedoch durch die routinemäßige Supplementation von Vitamin  $\text{D}_3$  selten geworden. Es kommt zu Skelettmissbildungen und Infektanfälligkeit. Beim Erwachsenen spricht man bei Vitamin  $\text{D}_3$ -Mangelernährung von Osteomalazie. Häufige Frakturen sind die Folge.

---

Es werden zwei verschiedene Formen der genetisch bedingten Rachitis beschrieben. Liegt ein Defekt der  $1\alpha$ -Hydroxylase vor, so dass kein aktives  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  gebildet werden kann, spricht man von Vitamin D-dependent Rickets Type 1 (VDDR Typ 1). In Keratinozyten von VDDR Typ 1 Patienten wurde eine Deletion und eine daraus resultierende Frameshift-Mutation in Codon 211 oder Codon 231 des  $1\alpha$ -Hydroxylase-Gens nachgewiesen (Fu *et al.*, 1997). Es wurden jedoch noch weitere Mutationen im  $1\alpha$ -Hydroxylase Gen beschrieben die zu VDDR Typ 1 führen (Kitanaka *et al.*, 1998) Liegt ein Defekt im nukleären Vitamin  $\text{D}_3$  Rezeptor vor, spricht man von VDDR Typ 2 (Vitamin D-dependent Rickets Type 2, Koefler *et al.*, 1990). Eine weitere Störung im Knochenstoffwechsel aufgrund chronischer Niereninsuffizienz wird als renale Osteopathie bezeichnet. Hierbei wird nicht ausreichend  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  gebildet. Dies führt zu einer verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Resorption aus dem Dünndarm und zu mangelnder Knochenmineralisierung.

Osteoporose ist eine polygenetische Erkrankung, deren Manifestation in hohem Maße von der Ernährung, der  $\text{Ca}^{2+}$ - und Vitamin  $\text{D}_3$ -Versorgung, beeinflusst wird. Ebenso spielt die Lebensweise wie z. B. die mechanische Belastung eine große Rolle. Die Krankheit ist gekennzeichnet durch eine hohe Frakturrate und einen Verlust an Knochenmasse. Im Bereich des nukleären  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -Rezeptors wurden Polymorphismen beschrieben, die einen geringen Beitrag zur Entstehung der Osteoporose leisten (Ralston, 1997). Weitere Kandidatengene für Osteoporose sind Kolagen Typ 1 und Typ 2. Hier wurden ebenfalls Polymorphismen im Bereich der Konsensussequenz des Transkriptionsfaktors Sp1 festgestellt, die mit einem Verlust von Knochenmasse und – dichte sowie einer erhöhten Frakturrate assoziiert sind (Eismann, 1999).

## 1.2 $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin $\text{D}_3$ und granulomatöse Erkrankungen

Bei granulomatösen Entzündungen wie Sarkoidose und Morbus Crohn sind Makrophagen im Zentrum eines Granuloms von T-Zellen umgeben. Kürzlich wurde beschrieben, dass die Expression von Osteopontin in T-Zellen und die Interaktion des Proteins mit Makrophagen Entzündungsreaktionen auslösen kann. Granulombildung ist mit einer hohen lokalen Konzentration an Osteopontin assoziiert. Entsprechende Knockout-Mäuse bilden keine Granulome aus (Ashkar *et al.*, 2000). Osteopontin ist ein  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  responsives Matrixprotein mit einem RGD-Motiv in der Aminosäuresequenz, das an Integrine binden kann und somit wesentlich an der Zelladhäsion beteiligt ist. Die Auslösemechanismen für chronisch entzündliche Erkrankungen sind bisher noch nicht gut geklärt. Eine bakterielle

---

wurde postuliert. Für diese Theorie spricht, dass es keine Herpesviren-Infektion mit einer Produktion eines Interleukin-6 (IL-6)-Homologes einhergeht, das auch in Granulomen produziert wird (Jones *et al.*, 1999). Beim M. Crohn wurde ein Genlokus auf Chromosom 16 identifiziert, der mit der Manifestation der Erkrankung in Zusammenhang gebracht wird (Hugot *et al.*, 1996). Auf diesem Locus liegen in der Nähe von etwa 10 cM als weitere Kandidaten die Gene für CD19, CD11, Sialophorin und den Interleukin-4-Rezeptor. Sowohl bei Sarkoidose als auch bei M. Crohn findet eine erhöhte Produktion von  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  durch aktivierte Makrophagen statt, die bis zur Hyperkalzämie führen kann (Bosch, 1998; Sharma, 1996). Die Serumspiegel von  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  liegen normalerweise zwischen 18 und 62 pg/ml, bei M. Crohn Patienten wurden erhöhte Spiegel zwischen 90 und 100 pg/ml beobachtet. Die hohe lokale Konzentration an  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  führt vermutlich zur Stimulation nachgeschalteter Gene die ihrerseits zur Pathogenese der Granulombildung beitragen.

## 2 Genomische Effekte des $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin $\text{D}_3$

### 2.1 Der nukleäre $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin $\text{D}_3$ -Rezeptor (nVDR)

Der nukleäre  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -Rezeptor (nVDR) ist ein ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor und gehört zur Familie der Steroidhormon-Rezeptoren. Weitere Mitglieder dieser Familie sind die Retinsäurerezeptoren RAR  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  mit dem Liganden *all-trans* Retinsäure und RXR  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  mit dem Liganden *9-cis* Retinsäure sowie die Schilddrüsenhormonrezeptoren TR $\alpha_1$ , TR $\alpha_2$ , TR $\beta_1$  und TR $\beta_2$ . Steroidhormonrezeptoren sind aus ähnlichen funktionellen Domänen aufgebaut. Sie besitzen eine N-terminale, aus 20 Aminosäuren bestehende Domäne, deren Funktion noch nicht ganz geklärt ist [A/B]. Die DNA-Bindungsdomäne [C] enthält acht hochkonservierte Cysteinreste, jeweils vier binden ein Zink-Atom und bilden so zwei Zink-Finger aus, die eine Bindung des Rezeptors an die DNA ermöglichen. Die 'hinge'-Region [D] ist sehr flexibel und verbindet DNA-Bindungsdomäne und Hormon-Bindungsdomäne, ist aber auch an der Interaktion mit Korepressoren beteiligt. Die Liganden-Bindungsdomäne und Dimerisierungs-Domäne [E] besteht aus 12  $\alpha$ -Helices und mehreren  $\beta$ -Faltblatteinheiten und bildet eine Sandwich-Struktur aus, an die ein Molekül des nVDR  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  bindet. Die Transaktivierungsdomäne [F] interagiert mit Transkriptionsmediatoren. Es wird angenommen, dass diese Domäne durch Bindung des Liganden eine



Transkription kann nach Phosphorylierung des Rezeptors gestartet oder inhibiert werden (Hausler *et al.*, 1998). In Abb. 3 ist die Struktur des VDR schematisch dargestellt.

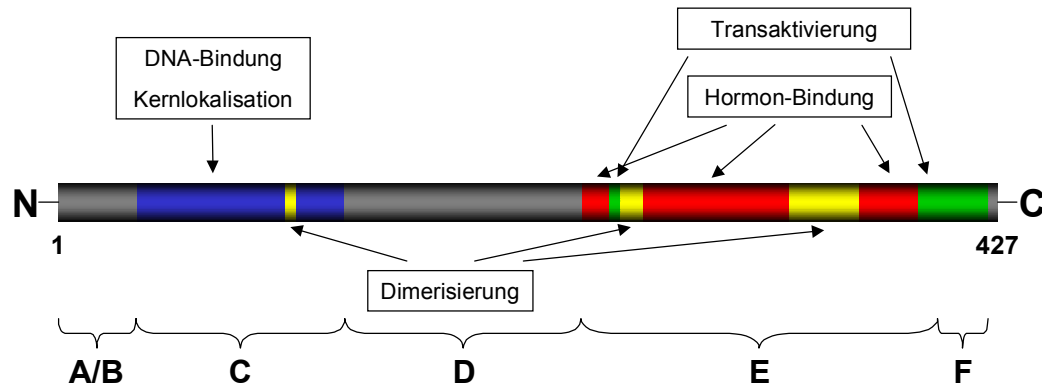


Abb. 3: **Struktur des nVDR nach Hausler *et al.*, 1998.** Die einzelnen Domänen sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet, A/B entspricht der N-terminalen Domäne, C der DNA-Bindungsdomäne, D der 'hinge'-Region, E der Liganden-Bindungsdomäne und F der Transaktivierungsdomäne.

Der nVDR bindet an  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -responsive Elemente (VDRE) von Zielgenen und reguliert ihre Transkription im Sinne eines Transkriptionsfaktors. Die Bindung erfolgt als Heterodimer mit dem Retinsäurerezeptor RXR. Wird der Ligand  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  gebunden, verstärkt dies die Protein-DNA-Interaktion des Heterodimers; bindet 9-*cis* Retinsäure an den Rezeptor, wird die Bindung inhibiert (Thompson *et al.*, 1998). Bisher konnte eine DNA-Bindung eines VDR-Homodimers nur *in vitro* gezeigt werden (Freedman *et al.*, 1994). Es wurden verschiedene positive und negative VDREs identifiziert (Darwish *et al.*, 1996). Ein VDRE, welches aus 'direct repeats' zweier hexamerer Oligonukleotidsequenzen, sogenannten 'Halfsites' besteht, die idealerweise die Konsensussequenz GGTTCA besitzen und durch drei Basen voneinander getrennt sind, wird dem DR3-Typ zugeordnet. Es wird angenommen, dass der VDR-Anteil des Rezeptor-Heterodimers an das 3'-Element bindet, während der RXR-Anteil das 5'-Element bevorzugt. DR3-Elemente finden sich v.a. in Promotoren von Genen, die 'klassische' Funktionen des  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  vermitteln. Im Promotor der humanen 24-Hydroxylase finden sich zwei  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -responsive Elemente des DR3-Typs (Tab. 1). Das näher am Startcodon lokalisierte Element besteht untypischerweise aus drei Halfsites (Chen *et al.*, 1995).

Gen	Position im Promotor	Sequenz
humane 24-Hydroxylase	-293 bis -273	5'-GCGTTCACCGGGTGT-3'
humane 24-Hydroxylase	-172 bis -143	5'-GAGTCAGCGAGGTGAGCGAGGGCG-3'
murines c-fos	-482 bis -462	5'-TGACCCTGGGAACCGGGTCCA-3'

Tab. 1: **Konsensus-Sequenzen der VDREs im Promotor der humanen 24-Hydroxylase (DR3) und im Promotor des Maus c-fos Gens (IP9).** Das erste DR3-Element befindet sich an Position -293 bis -273 des Promotors der 24-Hydroxylase und besteht aus zwei, durch drei Basen getrennte Halbsites, während sich das zweite DR3-Element bei Position -172 bis -142 befindet und aus drei, durch jeweils drei Basen getrennte Halbsites besteht. Im Promotor des Maus c-fos Gens befindet sich an Position -482 bis -462 ein IP9-Element, zwei inverse Palindrome die durch neun Basen voneinander getrennt sind.

Weiterhin wurden VDREs identifiziert, die aus zwei inversen Palindromen bestehen die durch neun Nukleotide voneinander getrennt sind. Diese Sequenzen werden als IP9-Elemente bezeichnet ('inverse palindromic'). IP9-Elemente finden sich in Promotoren von Genen, die mit dem Zellzyklus assoziiert sind, z. B. im Promotor des murinen c-fos Gens (Schröder *et al.*, 1997).

### 3 'Nichtgenomische' Effekte des 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>

Nichtgenomische Effekte des 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> erfordern keine Transkription und Translation und werden im Bereich von Sekunden beobachtet, während Effekte, die über den klassischen nVDR vermittelt werden, erst nach Stunden eintreten. Es wird die Existenz eines membranständigen 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Rezeptors postuliert (mVDR), der bisher aber noch nicht kloniert wurde. Zu den nichtgenomischen Effekten des 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> gehört die Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration sowie der Ca<sup>2+</sup>-Transport innerhalb eines Gewebes. Die schnelle Ca<sup>2+</sup>-Resorption aus dem Dünndarm, die sogenannte Transkaltachie, wird ebenfalls durch den membranständigen 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Rezeptor vermittelt. In diesem Zusammenhang sind gut charakterisierte Systeme zum einen der Dünndarm des Huhns, zum anderen die Ratte-Osteoblasten Zelllinie ROS 17/2.8. In beiden Systemen wird nach Einwirkung von 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> eine biphasische Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration beobachtet (Bouillon *et al.*, 1995). Des Weiteren wurde in Ratte-Chondrozyten ein Anstieg der Proteinkinase C-

---

des 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> führen über 'second messenger' zu sogenannten 'sekundären' Genregulationen. Mit einem Antikörper gegen den putativen mVDR konnte im Western Blot aus Basolateralmembran-Extrakten von Hühnerdünndarm ein 66 kDa 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-bindendes Protein detektiert werden, das aber noch weiter charakterisiert werden muss (Nemere *et al.*, 1994 und 1998).

#### **4 Prinzip der lokalen Steroidaktivierung**

In den Nebennieren, Nieren, Gonaden und Leber werden Steroidhormone als Vorläufermoleküle in großen Mengen gebildet, in die Zirkulation abgegeben und an ihrem Wirkungsort in geringer Konzentration zu aktiven Hormonen umgewandelt. Als Beispiel hierfür kann das Secosteroid 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> aufgeführt werden, dessen Vorläufer in der Leber zu 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> umgewandelt und anschließend in der Niere zum Hormon 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> aktiviert wird (Adams *et al.*, 1996; Bell, 1998). Ein weiteres Beispiel ist die Sekretion von Testosteron durch männliche Gonaden. Testosteron ist eine weitgehend inaktive Vorstufe sowohl für Östradiol als auch für Dihydrotestosteron, das aktive männliche Hormon. Enzyme, die die einzelnen Schritte katalysieren, sind die Aromatase, die Testosteron zum weiblichen Hormon Östradiol umwandelt und die 5 $\alpha$ -Reduktase, die Testosteron zum männlichen Hormon Dihydrotestosteron aktiviert. Es wurde eine Expression der Aromatase sowohl in myeloischen Zellen, als auch im Fettgewebe nachgewiesen (Jakob *et al.*, 1995a und 1995b; Zhao *et al.*, 1995), die 5 $\alpha$ -Reduktase wird auch in Thrombozyten und Osteoblasten exprimiert (Milewich *et al.*, 1982; Bruch *et al.*, 1992). Das Substrat Testosteron liegt in hohen Konzentrationen im Serum vor, während das Produkt in geringeren Konzentrationen gemessen wird. Konzentrationsunterschiede können den Faktor 100-1000 betragen. Vorläufer werden im Bereich von ng/ml gemessen, aktive Hormone im Bereich von pg/ml.

Das endokrine Prinzip der Vorläuferaktivierung in drüsigen Organen und anschließenden Transport zu den Zielzellen via Blutstrom gilt für die Endstufe der Hormonaktivierung nicht uneingeschränkt. Es wurde vielfach Hormonaktivierung in peripheren Geweben, verbunden mit einer parakrinen und autokrinen Wirkung der Hormonvorläufer, nachgewiesen.

#### **5 Myeloische Zelldifferenzierung**

Makrophagen entwickeln sich aus hämatopoetischen Vorläuferzellen in der myeloischen

1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> in Richtung Monozyten differenziert, während *all-trans* Retinsäure die granulozytäre Differenzierung einleitet. Im Zellkulturmodell differenzieren myeloische HL60, U937 und THP1-Zellen unter dem Einfluss von 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> zu Monozyten, während sich HL60-Zellen nach *all-trans* Retinsäure-Behandlung zu Granulozyten entwickeln. Abb. 1 zeigt ein Modell der myeloischen Zelldifferenzierung.

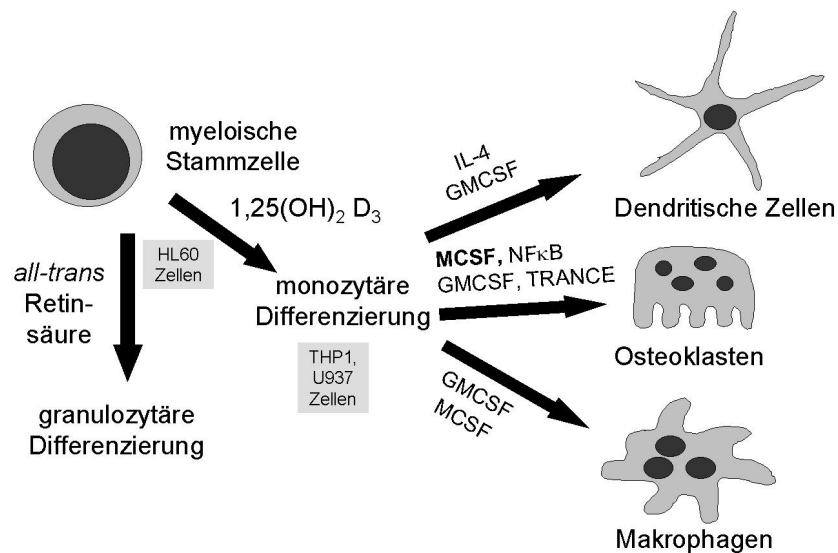


Abb. 4: **Myeloische Zelldifferenzierung.** Aus myeloischen Vorläuferzellen wird unter dem Einfluss von 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> die monozytäre, unter dem Einfluss von *all-trans* Retinsäure die granulozytäre Zelldifferenzierung eingeleitet. Aus Monozyten entstehen unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren und koloniestimulierender Faktoren die terminalen Differenzierungsstufen wie Dendritische Zellen, Osteoklasten und Gewebsmakrophagen. Der Differenzierungsgrad der myeloischen Zelllinien HL60, U937 und THP1 ist ebenfalls dargestellt.

Zirkulierende Monozyten des peripheren Blutes wandern in unterschiedliche Gewebe ein und werden durch den Einfluss des dort herrschenden Mikroenvironments zu Zellen unterschiedlicher terminaler Differenzierungsstufen rekrutiert, die im folgenden beschrieben werden.

## 5.1 Makrophagen und Osteoklasten

Vom Monozytenpool des peripheren Blutes werden unterschiedliche Gewebsmakrophagen rekrutiert. Die Adhäsion von Monozyten an das Endothel und der Einfluss von 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> und koloniestimulierender Faktoren wie GM-CSF und M-CSF ((Granulozyten) Makrophagen koloniestimulierender Faktor) präparieren die weitere Zelldifferenzierung (Perkins *et al.*, 1995; Kreutz *et al.*, 1999).

---

Osteoklasten sind mehrkernige Zellen, deren Funktion die Resorption von Knochenmatrix ist. Sie entwickeln sich aus Vorläuferzellen des Monozyten/Makrophagen-Differenzierungsweges unter dem Einfluss des Mikromilieus. Osteoklasten-ähnliche Zellen entwickeln sich *in vitro* aus Knochenmark, kultiviert mit Osteoblasten oder Stromazellen unter dem Einfluss von  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ , IL-6 und PTH. Osteoblasten und Stromazellen produzieren Zytokine und Wachstumsfaktoren, die parakrin zur Osteoklastendifferenzierung beitragen. Ein Stimulus für die Osteoklastendifferenzierung ist MCSF. MCSF-Knockout Mäuse, sogenannte op/op Mäuse, entwickeln Osteopetrose. Sie besitzen keine Osteoklasten und zeigen im allgemeinen eine Verminderung der Makrophagenanzahl (Wiktor-Jedrzejczak *et al.*, 1990). Wird ihnen rekombinantes MCSF gespritzt, entwickeln sich Osteoklasten (Felix *et al.*, 1990). Es werden zwei unterschiedliche Modelle für die Rolle von MCSF bei der Osteoklastendifferenzierung diskutiert. Einmal wird MCSF als Hauptstimulus für die Makrophagendifferenzierung angesehen, MCSF treibt die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen voran (Metcalf, 1982). Das andere Modell sieht MCSF als 'Überlebenssignal' für differenzierende Monozyten an. Zellen, die durch MCSF-Einfluss überleben, differenzieren durch ein intrinsisches Programm zu Makrophagen. Werden op/op Mäuse mit transgenen Mäusen, die den anti-Apoptose Faktor bcl-2 in mononukleären Zellen überexprimieren, gekreuzt, sind nachfolgende Generationen wieder in der Lage Makrophagen zu entwickeln, was dafür spricht, dass Monozyten die genetische Information besitzen zu Makrophagen zu differenzieren (Lagasse, *et al.*, 1997). Im Vergleich zur op/op Maus bilden diese Mäuse eine weniger ernste Form der Osteopetrose aus.

Ein weiteres System, welches die Osteoklastendifferenzierung beeinflusst, ist das TRANCE / RANK / OPG System. RANK (receptor activator of  $\text{NF}\kappa\text{B}$ ), ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie, ist ein membranständiger Rezeptor, über welchen die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Osteoklasten gesteuert wird. RANK-Knockout Mäuse ( $\text{RANK}^{-/-}$ ) entwickeln eine schwere Osteopetrose aufgrund fehlender Osteoklasten (Li *et al.*, 2000). An den RANK-Rezeptor bindet das ebenfalls TNF-ähnliche TRANCE (tumor necrosis factor-related activation induced cytokine). TRANCE wird auf der Membranoberfläche von Osteoblasten und Stromazellen exprimiert (Wong *et al.*, 1999). In der Literatur findet man weitere Bezeichnungen für dieses Zytokin: ODF (osteoclast differentiation factor), RANK-L (receptor activator of  $\text{NF}\kappa\text{B}$  ligand) und OPG-L (osteoprotegerin ligand). Ligandenbindung an den RANK-Rezeptor führt über verschiedene Signaltransduktionskaskaden zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors  $\text{NF}\kappa\text{B}$  (Darnay *et al.*, 1998). Aus Vorläuferzellen wird

Osteoklasten wird die Knochenresorption stimuliert und Apoptose der Zellen inhibiert (Lacey *et al.*, 1998). Für TRANCE ist eine weitere lösliche Rezeptor beschrieben worden, das sogenannte Osteoprotegerin (OPG). Es ist ebenfalls ein TNF-Rezeptor ähnliches Protein, welches um die Bindung von TRANCE konkurriert und dadurch die Osteoklastendifferenzierung hemmt. Weitere in der Literatur geläufige Bezeichnungen für OPG sind OCIF (osteoclast inhibitory factor) und TRANCE-Rezeptor. OPG wurde als 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-responsives Gen in humanen fetalen Osteoblasten beschrieben (Hofbauer *et al.*, 1998). Werden Knochenmarkzellen von Mäusen mit PTH behandelt, steigt die Anzahl von reifen Osteoklasten; die Transkription von TRANCE wird erhöht, während die Expression von OPG sinkt (Lee *et al.*, 1999). Abb. 5 zeigt ein Modell der Osteoklastendifferenzierung.

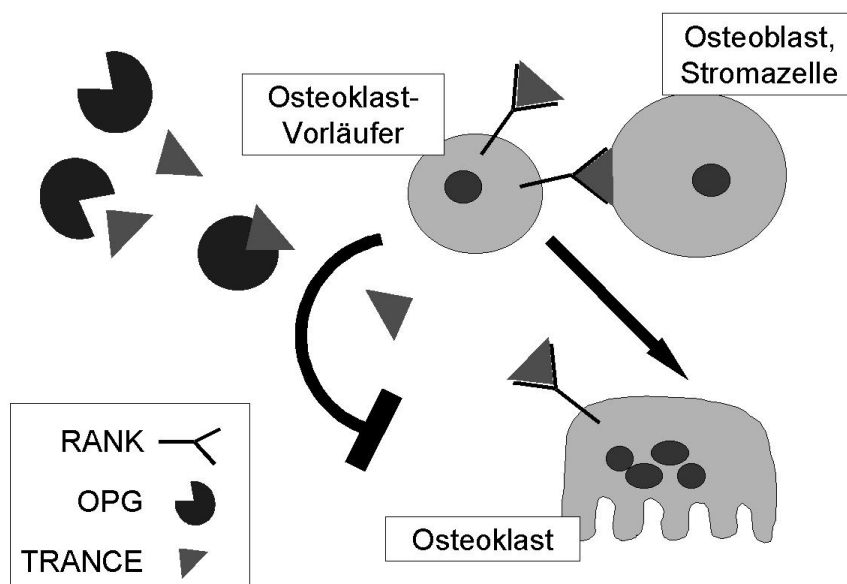


Abb. 5: **Modell der Osteoklastendifferenzierung.** Osteoklasten entwickeln sich unter dem Einfluss von TRANCE aus Vorläuferzellen. Freies, an Stromazellen oder Osteoblasten gebundenes TRANCE bindet an den RANK Rezeptor und aktiviert durch Zell-Zell-Kontakt den Transkriptionsfaktor NFκB. Ein weiterer Rezeptor für TRANCE ist Osteoprotegerin (OPG), welcher TRANCE bindet und somit eine Osteoklastendifferenzierung verhindert.

## 5.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen spielen eine große Rolle bei der Vermittlung der Immunantwort durch die Prozessierung und Präsentation von Antigenen. Sie besitzen die Fähigkeit aus peripherem Gewebe in Lymphknoten zu wandern und dort T-Zellen zu aktivieren.

---

geringer Konzentration auch im Blut (Hoek *et al.*, 1997). Neuere Arbeiten berichten über eine parakrine Funktion von Dendritischen Zellen, die Signalmoleküle und Hormone produzieren und somit die Wundheilung und die Funktion z. B. von Zellen des Endokriniums beeinflussen. Dendritische Zellen können aus peripheren Blutmonozyten *in vitro* unter dem Einfluss von GM-CSF und Interleukin-4 (IL-4) nach 7 bis 11 Tagen differenzieren (Randolph *et al.*, 1998; Turner *et al.*, 1999).

## **6 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-responsive Gene im Knochen und in Monozyten/ Makrophagen**

Im Knochen spielt 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> für die Funktion von knochenaufbauenden Zellen, den sogenannten Osteoblasten, eine wichtige Rolle. Osteoblasten entstehen aus mesenchymalen Vorläuferzellen, die auch zu Adipozyten, Myozyten, Chondrozyten und Fibroblasten differenzieren können. Die Hauptfunktion von Osteoblasten ist, Knochenmatrix aus Kollagen und Osteocalzin zu sezernieren. Die Expression dieser Proteine wird durch 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>, abhängig vom Differenzierungsgrad der Osteoblasten, reguliert. Im Zellkulturmodell von menschlichen Präosteoblasten konnte Prokollagen I als früherer Marker der Osteoblastendifferenzierung identifiziert werden. Die Expression nimmt mit Zunahme des Differenzierungsgrades ab, während die Expression von Alkalischer Phosphatase ansteigt (Siggelkow *et al.*, 1999). Es wurden weitere 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> responsive Gene in Osteoblasten beschrieben, wie die Thioredoxin Reduktase 1 (TR1) (s.u.) und hCyr61 (Schütze *et al.*, 1998a und 1998b).

Monozyten/Makrophagen exprimieren ebenfalls eine Reihe 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-responsiver Gene, deren Expression über den nVDR vermittelt wird. Tab. 2 fasst 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-responsive Gene in Monozyten/Makrophagen und Knochen zusammen und gibt einen Überblick über die Funktion und Beschreibung in der Literatur.

Gen	Vorkommen: Knochen (K), Monozyten/ Makroph. (M)		1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin D <sub>3</sub> Regulation	Funktion	Literatur
	K	M			
1 $\alpha$ -Hydroxylase	X	X	?	aktiviert 25(OH) Vitamin D <sub>3</sub>	Axen 1995a und 1995b; Monkawa <i>et al.</i> , 1997
24-Hydroxylase	X	X	++	inaktiviert 1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin D <sub>3</sub>	Chen <i>et al.</i> , 1995; van Leeuwen <i>et al.</i> , 1996
alkalische Phosphatase	X	X	++	produziert hohe lokale Phosphatkonzentration, Ca <sup>2+</sup> -Niederschlag	Vaananen <i>et al.</i> , 1987; Song <i>et al.</i> , 1998
CD14		X	++	LPS-BP-Rezeptor	Zhang <i>et al.</i> , 1994; Jakob <i>et al.</i> , 1994
c-fms	X	X	+	MCSF-Rezeptor	iskobing <i>et al.</i> , 1997; Weir <i>et al.</i> , 1993
c-fos	X	X	+	Onkogen	Muller <i>et al.</i> , 1985; Grigoriadis <i>et al.</i> , 1993
c-myk	X	X	-	Onkogen	ollins <i>et al.</i> , 1987, Karmali <i>et al.</i> , 1989; Subramaniam <i>et al.</i> , 1992
ddVit		X	+	differentiation promoting factor ?	Fritsche <i>et al.</i> , 1997
Gewebsfaktor		X	-	Antikoagulant	Koyama <i>et al.</i> , 1998
IGF-BP 2	X		+	IGF-Inhibitor	Chen <i>et al.</i> , 1991
hCyr61	X		++	Differenzierung und Funktion von Osteoblasten	Schütze <i>et al.</i> , 1998a
HoxA10		X	+	reguliert Zellwachstum	Rots <i>et al.</i> , 1998
nVDR	X	X	+	nukleärer 1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin D <sub>3</sub> Rezeptor	Santiso-Mere <i>et al.</i> , 1993; Hmama <i>et al.</i> , 1999; Maenpaa <i>et al.</i> , 1991
Osteokalzin	X		++	Ca <sup>2+</sup> -Bindungsprotein	Hauschka <i>et al.</i> , 1978
Osteoprotegerin	X		+	inhibiert Osteoklastendifferenzierung	Hofbauer <i>et al.</i> , 1998
Osteopontin	X	X	++	Adhäsion, Chemotaxis	Butler 1989; Chang <i>et al.</i> , 1994
p21	X	X	+	induziert Differenzierung	Liu <i>et al.</i> , 1996; Bellido <i>et al.</i> , 1998
Phospholipase C	X	X	+	Signaltransduktion	Civitelli <i>et al.</i> , 1990 Bunce <i>et al.</i> , 1997
PTHrP	X	X	-	bindet an PTHR1, wirkt auto-, parakrin, inhibiert Differenzierung	Lanske <i>et al.</i> , 1999; Zeimer <i>et al.</i> , 1998; Blomme <i>et al.</i> , 1999



Gen	Vorkommen: Knochen (K), Monozyten/ Makroph. (M)		1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin D <sub>3</sub> Regulation	Funktion	Literatur
	K	M			
Thioredoxin Reduktase 1	X	X	++	aktiviert Transkriptionsfaktoren, Ribonukleotid Reduktase	Schütze <i>et al.</i> , 1998b und 1999; Ebert-Dümig <i>et al.</i> , 1999
Typ I Kollagen	X		-	Knochenmatrix	Bellows <i>et al.</i> , 1999
Thrombomodulin		X	+	Antikoagulant	Koyama <i>et al.</i> , 1998
Vitronektin Rezeptor	X	X	+	Adhäsion	Medhora <i>et al.</i> , 1993; Nakstad <i>et al.</i> , 1990

Tab. 2: 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-responsive Gene im Knochen (K) und in Monozyten/Makrophagen (M). Es ist die 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Responsivität, die Funktion und die Beschreibung des Gens in der Literatur dargestellt.

## 6.1 Thioredoxin Reduktasen – Selenoenzyme

Die zytosolische Thioredoxin Reduktase 1 (TR1 oder TrxR $\alpha$ ) wurde 1995 von Gasdaska *et al.* aus humaner Plazenta kloniert und ein Jahr später aus T-Zellen und Adenokarzinomzellen 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. TR1 wird ubiquitär exprimiert und wurde als 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-responsives Gen in Osteoblasten charakterisiert (Schütze *et al.*, 1998b). Die TR1 gehört zur Gruppe der NADPH-abhängigen Disulfid-Oxidoreduktasen, die als prothetische Gruppe ein FAD besitzen. Es wird angenommen, dass NADPH das Flavin des Enzyms reduziert, die Elektronen werden anschließend auf das aktive Zentrum, das ein Selenocystein trägt, übertragen. Die TR1 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). Die Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und AP1, sowie die Aktivität der Ribonukleotid-Reduktase werden über eine zwischengeschaltete Reduktion von Thioredoxin (Trx), moduliert. Das wichtigste Substrat der TR1 ist Trx, ein 12 kDa Polypeptid, das ubiquitär und in hoher Konzentration exprimiert wird. Es besitzt zwei freiliegende, eng benachbarte Cysteinreste, die als Wasserstoffdonor dienen können (Holmgren *et al.*, 1996). Es wurde als Wachstumsfaktor von Lymphozyten

---

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). Weitere Substrate der TR1 sind Proteindisulfidisomerase, natural killer cell lysin (NK-Lysin) und Ca<sup>2+</sup>-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; Grömer *et al.*, 1998a und 1998b; Holmgren *et al.*, 1996 und 1989; Lundsström-Ljung *et al.*, 1995; Luthman *et al.*, 1982; Oblong *et al.*, 1993). Unter Selenmangel zeigt TR1 in Leber und Niere von Ratten verminderte Aktivität, wie für Selenoproteine typisch (Hill *et al.*, 1997). Kürzlich wurden zwei weitere Thioredoxin Reduktasen, TR3 oder TrxRβ und TR2 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. TR2 besitzt zur TR1 eine 70%ige Identität, während TR3 und TR1 bzw. TR3 und TR2 eine 52 bis 53%ige Identität aufweisen. Die mRNA der TR3 hat eine Länge von 2,4 kb und codiert für ein 56,5 kDa Protein aus 524 Aminosäuren. TR3 besitzt am N-Terminus eine putative mitochondriale Signalsequenz. Das Gen umfasst eine Region von etwa 65 kb auf Chromosom 22q11.2. TR3 ist ubiquitär in der Maus, vor allem aber in der Leber exprimiert, während sich die Expression von TR2 auf Testis beschränkt.

### 6.1.1 Einbau von Selenocystein in Proteine

Selen wurde 1817 von Berzelius als drittes Element der Chalkogene 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.*, 1935a und 1935b; Yang *et al.*, 1989). 1957 sprachen Schwarz und Foltz Selen die Rolle eines Spurenelementes zu, das als Nahrungszusatz bei Ratten, die mit einer selenarmen Diät gefüttert wurden, die Ausbildung von Lebernekrosen verhindern konnte. Bei der Aufnahme von weniger als 20 µg Selen pro Tag spricht man von einer Selenmangelernährung. Als erstes eukaryontisches Selenoprotein wurde 1973 die zytosolische Glutathionperoxidase beschrieben (Flohé *et al.*, 1973; Rotruck *et al.*, 1973).

Selen kann in Proteinen kovalent gebunden als Selenomethionin oder Selenocystein vorliegen. Während Selenomethionin eher zufällig anstelle von Methionin in die Proteinkette eingebaut wird, erfolgt die Insertion von Selenocystein nach einem einzigartigen Mechanismus, der für Prokaryonten aufgeklärt wurde (Böck *et al.*, 1991), bei Eukaryonten jedoch teilweise noch ungeklärt ist (Low *et al.*, 1996). Die Selenocystein-Insertion in die

---

Das UGA-Codon dient normalerweise als Opal-Stop-Codon (Chambers *et al.*, 1986; Zinoni *et al.*, 1986), wird jedoch in Verbindung mit einer Sekundärstruktur im 3'-Bereich der mRNA, dem sogenannten SEC IS-Element (selenocysteine insertion sequence), für die Insertion von Selenocystein verwendet, es kommt nicht zum Kettenabbruch. Bei Prokaryonten liegt das SEC IS-Element meist direkt im Anschluss an das UGA-Codon, bei Eukaryonten befindet es sich zwischen 500 und 5300 bp in der 3'-untranslatierten Region (UTR) der mRNA (Berry *et al.*, 1991b; Heider *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1996; Walczak *et al.*, 1996). In Prokaryonten wird zunächst eine spezielle tRNA<sup>Sec</sup>, 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<sup>Sec</sup> beliefert (Forchhammer *et al.*, 1989 und 1990).

Eukaryontische Homologe zu selB und selA wurden noch nicht identifiziert, jedoch wurden bereits Proteine beschrieben, die an das SECIS-Element binden (Shen *et al.*, 1995b; Hubert *et al.*, 1996; Leeson *et al.*, 1997). Das selC-Gen dagegen ist im Tierreich ubiquitär verbreitet, Knockout des selC-Gens wirkt bei Mäusen bereits im frühen Embryonalstadium letal (Mizutani *et al.*, 1992; Bösl *et al.*, 1997). Ein eukaryontisches Protein homolog zu selD wurde isoliert (Low *et al.*, 1995), eine zweite Isoform, SelD2, trägt selbst Selenocystein im aktiven Zentrum (Guimaraes *et al.*, 1996) und erlaubt damit eine selenabhängige Autoregulation der Selenoproteinsynthese. 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).

## **7 Weitere eukaryontische Selenoproteine**

### **7.1 Glutathionperoxidasen**

Zur Familie der Glutathionperoxidasen gehören vier genetisch unterschiedliche antioxidative

---

oder zum Alkohol umsetzen. Als erstes eukaryontisches Selenoprotein wurde die zytosolische Glutathionperoxidase (cGPx) von Flohé *et al.* 1973 identifiziert. Es handelt sich um ein homotetrameres Protein mit einem Molekulargewicht von jeweils 23000 und einem Selenocysteinrest pro Untereinheit. Die cGPx wird in den meisten untersuchten Geweben gefunden, eine hohe Expression wurde in Erythrozyten, in Niere und Leber beschrieben (Mills, 1959; Rotruck *et al.*, 1973; Sunde, 1994; Deherer *et al.*, 1997a). Das humane Gen wurde auf Chromosom 3q11-3q12 lokalisiert, es enthält zwei Introns. Zwei Intron-lose Pseudogene wurden auf den Chromosomen X und 21 gefunden (McBride *et al.*, 1988). Knockout und Überexpression des Gens in der Maus zeigten keinen Einfluss auf den physiologischen Zustand und die Entwicklung sowie die Expression weiterer Glutathionperoxidasen (Ho *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 1997a und 1997b). Der cGPx wurde eine Schutzfunktion bei Paraquat-induziertem oxidativen Stress in transgenen Mäusen zugesprochen. Sie verhindert eine Schädigung von Lipiden und Proteinen durch Oxidation (Cheng *et al.*, 1998 und 1999). Die Existenz von Sauerstoff-responsiven Elementen (OREs), welche die Genexpression abhängig vom Sauerstoffpartialdruck in der Zelle regulieren, wurde im Promotor, der weder eine Konsensus-TATA- noch eine CAAT-Box enthält, beschrieben (Cowan *et al.*, 1993; Moscow *et al.*, 1992). Es konnte zwar eine Induktion der cGPx-Genexpression durch Hyperoxie, jedoch keine DNA-Protein-Interaktion an diese Elemente nachgewiesen werden (Jornot *et al.*, 1997).

Im Plasma existiert eine glykosylierte Isoform, die Plasma-Glutathionperoxidase (pGPx), die zur cGPx 57% Identität zeigt und auf Chromosom 5q32 lokalisiert ist (Yoshimura *et al.*, 1994). Die pGPx ist ein homotetrameres Protein aus 25 kDa Untereinheiten, die je einen Selenocysteinrest tragen. Sie reduziert  $H_2O_2$  oder reaktive Sauerstoffverbindungen, die durch phagozytierende Zellen oder Endothelzellen sezerniert werden. Im SDS-Gel zeigen cGPx und pGPx unterschiedliches Wanderungsverhalten und werden nicht von denselben Antikörpern erkannt (Takahashi *et al.*, 1987). Die pGPx wird vor allem von proximalen Nieren-Tubuli sezerniert, eine Expression der mRNA wurde aber auch in Brust, Herz, Plazenta und Lunge von Mensch und Nager nachgewiesen (Avisar *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. Sie wird vor allem im Gastrointestinaltrakt von Mensch und Nager exprimiert und reduziert dort Peroxide, die mit

---

deren Genlokus auf Chromosom 14q24.1 identifiziert wurde, zeigt zur cGPx eine 61% Identität und wurde durch Screening einer Genbank der Hepatokarzinomzelllinie HepG2 kloniert (Chu *et al.*, 1992a und 1996). Beim Menschen wird die GI-GPx im Gastrointestinaltrakt und in der Leber exprimiert (Chu *et al.*, 1992a und 1995). Die Stabilität der mRNA ist im Vergleich zu der anderer GPx-Isoformen sehr hoch, ebenso wird die GI-GPx bei Selenitdefizienz schwach, die übrigen GPx-Isoformen dagegen nicht exprimiert. Nach Selenitsubstitution steigt die mRNA-Menge der GI-GPx innerhalb kurzer Zeit stark an, was auf eine wichtige Rolle des Enzyms in der Hierarchie der Selenoproteine schließen lässt (Wingler *et al.*, 1999).

Die Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase (PHGPx) ist ein monomeres Enzym, das vor allem Phospholipid- und Cholesterin-Hydroperoxide umsetzt und so Biomembranen vor Peroxidation schützt. Dies unterscheidet sie von den übrigen GPx-Isoformen, die vor allem niedermolekulare Substanzen wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Lipidhydroperoxide reduzieren (Ursini *et al.*, 1995; Maiorino *et al.*, 1990). Das Gen, das für ein 22 kDa-Protein kodiert, wurde auf Chromosom 19q13.3 lokalisiert und besteht aus 7 Exons (Kelner *et al.*, 1998). 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. Die mRNA ist meist ubiquitär vorhanden, die Enzymaktivität ist jedoch um eine Zehnerpotenz geringer als die der cGPx (Maiorino *et al.*, 1982 und 1990; Ursini *et al.*, 1985). In Testis wird die höchste Enzymaktivität beobachtet, die Expression erfolgt erst nach der Pubertät und steht unter hormoneller Kontrolle. Es wurden putative Hormon-responsive Elemente im Promotor und ersten Intron des Gens gefunden (Brigelius-Flohé *et al.*, 1994). 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). In reifen Spermatozoen nimmt die PHGPx die Funktion eines Strukturproteins ein. Bei Selendefizienz wird eine Instabilität des Mittelstücks der Spermien, das zu mindestens 50% aus PHGPx besteht, beobachtet (Ursini *et al.*, 1999).

## 7.2 Selenoprotein P

Selenoprotein P (SeP), ein stark glykosyliertes, Cystein- und Histidin-reiches Protein mit Heparin-Bindungseigenschaften, wurde aus Ratten- und humanem Plazenta isoliert (Herrman *et al.*, 1977; Yang *et al.*, 1987; Motchnik *et al.*, 1989; Eberle *et al.*, 1993). Im open-reading-frame der mRNA befinden sich zehn Opal-UGA-Codons, die mit Hilfe der

---

humane SeP wurde auf Chromosom 5q31 lokalisiert und der Promotor charakterisiert (Hill *et al.*, 1996b; Dreher *et al.*, 1997b). Die Funktion des 57 kDa SeP ist noch nicht gut geklärt, eine Selen-speicher- oder Transportfunktion wird diskutiert (Motsenbocker *et al.*, 1982). Unter Selenmangel wird jedoch die cGPx niedriger exprimiert, was eher der cGPx eine Speicherfunktion zuschreibt (Burk *et al.*, 1991; Hill *et al.*, 1992; Gross *et al.*, 1995). 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). SeP kann als Marker für den Selenstatus eines Individuums dienen, da eine hohe Korrelation der SeP-Konzentration zum Serum-Selenspiegel besteht (Hill *et al.*, 1996a; Marchaluk *et al.*, 1995; Persson-Moschos *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1995). Neuere Daten zeigen, dass SeP ähnlich der PHGPx, Phospholipid-Hydroperoxide zu reduzieren vermag. Dies geschieht jedoch mit sehr niedriger Effizienz (Saito *et al.*, 1999). Kürzlich gelang die Expression und Aufreinigung eines rekombinanten Ratten-SeP in humanen embryonalen Nierenzellen (Tujebajeva *et al.*, 2000).

### 7.3 Deiodasen

Die Familie der Deiodasen besteht aus drei Isoenzymen, die das Schilddrüsenhormon L-Thyroxin (T<sub>4</sub>) 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; Berry *et al.*, 1991) und katalysiert, wie auch die Typ II 5'-Deiodase (5'-DII), die Deiodierung von T<sub>4</sub> zum aktiven 3,5,3'-Triiod-L-Thyronin (T<sub>3</sub>). Die Typ III 5'-Deiodase (5'-D) inaktiviert T<sub>4</sub> und T<sub>3</sub> (Köhrle, 1999). Die 5'-DI ist ein 55 kDa homodimeres integrales Membranprotein mit je einem Selenocysteinrest pro Untereinheit (Köhrle *et al.*, 1990a und 1990b). Die 5'-DII besitzt ein Molekulargewicht von 200000 und setzt sich aus einer oder mehreren 29 kDa substratbindenden Untereinheiten zusammen (Visser *et al.*, 1983; Houstek *et al.*, 1993). Lange Zeit war unklar, ob es sich bei der 5'-DII um ein Selenoprotein handelt (Safran *et al.*, 1991; Berry *et al.*, 1991c). Es konnte jedoch eine selenabhängige Expression der 5'-DII in Ratten-Astrozyten gezeigt werden, des Weiteren wurden durch Screening von humanen cDNA-Banken Klone mit Opal-TGA Codon identifiziert und ein SECIS-Element in der 3'-UTR der 7,5 kb umfassenden mRNA gefunden (Pallud *et al.*, 1997; Croteau *et al.*, 1996; Salvatore *et al.*, 1996; Buettner *et al.*, 1998). Das Molekulargewicht einer Untereinheit der 5-D beträgt 31000, das des Holoenzym ist noch nicht bekannt. Die 5-D wurde aus humaner Plazenta und Ratten-Astrozyten als

---

Selenoprotein identifiziert (Salvatore *et al.*, 1995; Croteau *et al.*, 1995; Ramauge *et al.*, 1996).

#### 7.4 Selenoproteine unbekannter Funktion

Es wurden eine Reihe Selenoproteine mit bisher unbekannter Funktion beschrieben. Die Expression von Selenoprotein W, ein 9,5 kDa Muskelprotein, wird Selen-abhängig reguliert (Vendeland *et al.*, 1993; Yeh *et al.*, 1995). Es wurde eine Bindung von Glutathion an Selenoprotein W beschrieben, möglicherweise besitzt es eine Redox-Funktion (Beilstein *et al.*, 1996; Gu *et al.*, 1999). In Rhesusaffen korreliert die Gewebsverteilung von Selenoprotein W mit der mRNA-Expression, jedoch nicht mit der Gewebs-Selenverteilung (Gu *et al.*, 2000). 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; Kalcklösch *et al.*, 1995; Kyriakopoulos *et al.*, 1993).

## 8 Oxidativer Stress und antioxidative Schutzmechanismen

Als oxidativer Stress wird ein Zustand bezeichnet, bei welchem ein Ungleichgewicht zugunsten reaktiver Sauerstoffverbindungen gegen über Antioxidantien herrscht. Im aeroben Stoffwechsel entstehen reaktive Sauerstoffverbindungen bereits unter basalen Bedingungen und führen potentiell zu Zellschädigungen. Im Organismus existieren verschiedene zelluläre antioxidative Schutzmechanismen, die eine Radikalbildung verhindern, entstandene Radikale abfangen und Schäden reparieren (Sies 1993 und 1997).

Bei der Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser können als Zwischenstufen das Superoxidanion-Radikal ( $O_2^{\bullet-}$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) oder das Hydroxylradikal ( $HO^{\bullet}$ ) entstehen. Weitere relevante reaktive Sauerstoffverbindungen sind das Stickstoffmonoxidradikal ( $NO^{\bullet}$ ) und Alkyl- ( $RO^{\bullet}$ ) oder Peroxyl-Radikale ( $ROO^{\bullet}$ ). Reaktive Sauerstoffintermediate (ROIs) entstehen durch verschiedene Stoffwechsel- und Enzymreaktionen in unterschiedlichen Zellsystemen und Kompartimenten: In phagozytierenden Zellen (Granulozyten, Makrophagen) kommt es bei der Immunabwehr zum 'oxidativen Burst', in Mitochondrien können ROIs bei der  $O_2$ -Reduktion der Atmungskette durch eine 'Kurzschlussreaktion' entstehen. Weiterhin entstehen reaktive Sauerstoffverbindungen durch enzymatische Reaktionen wie z.B. durch p450-Enzyme und

---

Im Organismus existieren eine Reihe enzymatischer und nicht-enzymatischer antioxidativer Schutzsysteme. Superoxiddismutasen, die im Zytosol Kupfer-Zink-abhängig, in Mitochondrien Mangang-abhängig vorkommen, setzen das Superoxidanion-Radikal zum weniger reaktiven  $H_2O_2$  um, welches durch die Eisenabhängige Katalase oder durch Peroxidasen zu Wasser und Sauerstoff reduziert wird. Weitere antioxidative Enzyme sind die oben beschriebenen Glutathionperoxidasen. Nicht-enzymatische Antioxidantien sind  $\beta$ -Carotin, Ascorbat (Vitamin C), Vitamin E, Glutathion und Urat (Hathcock, 1997). Der wichtigste Vertreter des Vitamin E für den Menschen ist  $\alpha$ -Tocopherol, welches Lipidperoxidradikale reduziert. Vitamin E kann zumindest teilweise einen selenmangelbedingten Verlust der Glutathionperoxidase-Aktivität ausgleichen (Heslop *et al.*, 1996).

## 9 Redox-regulierte Transkriptionsfaktoren AP1, Ref-1 und NF $\kappa$ B

AP1, NF $\kappa$ B und Ref-1 sind DNA-Bindungsproteine, welche redoxabhängig die Transkription ihrer Zielgene modulieren. Der Transkriptionsfaktor AP1 ist ein dimeres Protein, das entweder als Homodimer aus Mitgliedern der Jun-Familie (vJun, cJun, JunB, JunD), als Heterodimer der Jun- und Mitgliedern der Fos-Familie (vFos, cFos, FosB, Fra-1, Fra-2) oder als Heterodimer aus Jun und ATF/CREB-Proteinen ('activating transcription factor'/'cAMP response element binding protein') an DNA bindet. All diese Proteine besitzen überlappende DNA-Bindungsspezifitäten, aber unterschiedliche Transaktivierungsaktivitäten (Suzuki *et al.*, 1991).

Zur Aktivierung von AP1 kommt es Proteinkinase-abhängig nach Entstehung von reaktiven Sauerstoffverbindungen sowie der Einwirkung von Zytokinen wie TNF $\alpha$ , verschiedenen Wachstumsfaktoren, Phorbol ester und ionisierender Strahlung (Angel *et al.*, 1987; Sies 1993). Es ist keine Proteinbiosynthese notwendig, alleine Phosphorylierung und Dephosphorylierung bereits vorhandener AP1 Moleküle ermöglicht eine Bindung an DNA (Welham *et al.*, 1990). Außerdem wird die Fos- und Jun-DNA-Bindung durch Reduktion eines konservierten Cysteinrestes durch das Trx/TR-System moduliert. Die DNA-Bindung wird ebenfalls über den 'redox-factor 1' (Ref-1) reguliert, der Fos und Jun reduziert und die AP1-DNA Bindung verstärkt. Dies geschieht synergistisch oder unabhängig von Trx durch Assoziation von Ref-1 mit Trx im Kern und einer nachfolgenden Verstärkung der Protein-DNA Interaktion (Hirota *et al.*, 1997; Xanthoudakis *et al.*, 1992a und 1992b). Studien an HeLa-Zellen ergaben, dass Ref-1 und das DNA-Reparaturenzym APEX-Nuklease identisch



---

Sauerstoffintermediate, ionisierende Strahlung und UV-Einwirkung stimuliert wird (Xanthoudakis *et al.*, 1992b).

AP1 wurde als Transkriptionsfaktor identifiziert, der für die basale Aktivität des humanen Metallothionein IIa-Promotors essentiell ist (Haslinger *et al.*, 1985). Es wurden inzwischen jedoch viele weitere AP1-regulierte Gene beschrieben, wie z.B. Zytokine und Proteine, die an Entzündungsreaktionen und Hyperproliferation beteiligt sind. Des Weiteren spielt AP1 eine wichtige Rolle bei der Transkription von Proteinen, welche die Entscheidung von Metastasen und rheumatoider Arthritis beeinflussen (Angel *et al.*, 1991; Nagpal *et al.*, 1995).

Eine weitere Funktion besitzt AP1 in der Regulation von Proliferation und Differenzierung. Für die Proliferation wichtige Gene, wie z. B. transforming growth factor  $\alpha$  und  $\beta$  (TGF $\alpha$  und TGF $\beta$ ), werden im allgemeinen aktiviert, während Gene, welche die Differenzierung beeinflussen, inhibiert werden (Angel *et al.*, 1991; Treisman 1985; Greenberg *et al.*, 1984; Kim *et al.*, 1990). Bei der Differenzierung der promyeloischen Zelllinie U 937 zu Makrophagen durch Phorbol ester wird jedoch ein Anstieg der Expression von cJun und cFos beobachtet (William *et al.*, 1990), ebenso inhibiert TGF $\beta$  in verschiedenen Zelltypen die Proliferation. Es ist demnach immer vom Kontext und unterschiedlichen Faktoren abhängig, ob eine AP1-vermittelte Gen-Aktivierung zu einer Proliferation oder Differenzierung führt.

NF $\kappa$ B gehört zur Rel-Proteinfamilie, die sich aus zwei Gruppen, abhängig von Struktur, Funktion und Art der Synthese, zusammensetzt. Gruppe I besteht aus den Proteinen p50 und p52, die eine DNA-Bindungsdomäne und ein Kernlokalisationssignal besitzen, die sogenannte Rel-Domäne, bestehend aus etwa 300 Aminosäuren. Gruppe I Proteine werden als Vorläuferproteine von 105 bzw. 100 kDa synthetisiert. Gruppe II besteht aus den Proteinen p65, c-Rel, RelB und zwei *Drosophila*-Proteinen. Diese besitzen außer der Rel-Domäne eine oder mehrere Transaktivierungsdomänen. Im inaktiven Zustand liegen die Proteine in zwei unterschiedlichen Komplexen im Zytosol vor. Entweder ist ein Gruppe I-Vorläuferprotein mit einem Gruppe II-Protein im Zytosol verankert oder ein Rel-Homo- oder Heterodimer ist mit einem Mitglied der  $\kappa$ B-Familie, das das Kernlokalisationssignal maskiert, verbunden (Baeuerle *et al.*, 1996). Proteine der  $\kappa$ B Familie, die aus den Mitgliedern  $\kappa$ B $\alpha$ ,  $\kappa$ B $\beta$ ,  $\kappa$ B $\gamma$ , Bcl3 und dem *Drosophila* Protein 'Cactus' besteht, besitzen eine Domäne, die ihnen die Interaktion mit Rel-Proteinen erlaubt und eine sogenannte PEST-Sequenz am C-Terminus, die eine proteolytische Degradation des Proteins

---

Degradation von I $\kappa$ B und zur Prozessierung des Gruppe I-Vorläufermoleküls. Um dem dimeren NF $\kappa$ B Protein, meist ein p50/p65 Heterodimer, die DNA-Bindung zu ermöglichen, ist eine Reduktion eines oder mehrerer Cysteinreste der Rel-Domäne nötig. Dies erfolgt durch das Trx/TR System unter Beteiligung von GSH und GSSG (Schenk *et al.*, 1994; Galter *et al.*, 1994). NF $\kappa$ B wandert in den Zellkern, bindet an entscheidende *cis*-Elemente in Promotoren von Zielgenen und ermöglicht so die Transkription (Kumar *et al.*, 1992). Die NF $\kappa$ B Aktivierung wird, ähnlich der AP1 Aktivierung (s. o.), durch Ref-1 beeinflusst. *In vitro* wird die DNA-Bindung der p50-Untereinheit von NF $\kappa$ B durch das Trx/TR System und Ref-1 durch Reduktion eines Cysteinrestes verstärkt (Mitomo *et al.*, 1994).

Die Aktivierung von NF $\kappa$ B erfolgt ähnlich der AP1-Aktivierung durch oxidativen Stress, verursacht durch UV- oder ionisierende Strahlung, Phorbolester und inflammatorische Zytokine und führt über Signaltransduktionskaskaden zur Modulation der Transkription (Schreck *et al.*, 1991 und 1994; Jany *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1995). Als Zielgene sind vor allem Zytokine und zugehörige Rezeptoren, Zell-Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren zu nennen. Des Weiteren wird die Replikation des HI-Virus beeinflusst (Baeuerle *et al.* 1994; Griffin *et al.*, 1989).

---

## B Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es die lokale Regulation des  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -Metabolismus in monozytären Zellen als Grundlage für die Expression  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -responsiver Gene zu charakterisieren. Die Expression  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  responsiver Gene in Monozyten und Makrophagen wird weiterhin untersucht.

Von besonderem Interesse ist, die Expression und Regulation der  $1\alpha$ -Hydroxylase in myeloischen Zellen zu untersuchen. Hierbei soll geklärt werden, ob die  $1\alpha$ -Hydroxylase, das Enzym, welches  $25(\text{OH})$  Vitamin  $\text{D}_3$  zum aktiven  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  hydroxyliert, in Einzelzellen ähnlich wie im systemischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsel durch ihr Substrat  $25(\text{OH})$  Vitamin  $\text{D}_3$  induziert und durch Parathormon stimuliert wird. In diesem Zusammenhang wird analysiert, ob myeloische Zellen den Parathormon Rezeptor Typ 1, dessen Ligand auch das PTH related Protein ist, exprimieren und ob eine Ligandenbindung an den Rezeptor erfolgt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Makrophagen von Granulomen in der Lage sind hohe Konzentrationen von  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  freizusetzen. Aus diesem Grund wird untersucht, ob das produzierte  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  auf die Zellen selbst und auf Nachbarzellen in auto- und parakriner Weise wirkt und die Expression  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -responsiver Gene moduliert. Besonderes Interesse gilt dem Osteopontin, sowie dem Selenoenzym Thioredoxin Reduktase 1. Die TR1 reduziert Disulfidbrücken von Proteinen und nimmt somit Einfluss auf Protein/Protein- und Protein/DNA-Interaktionen. Sie beeinflusst die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie AP1 und  $\text{NF}\kappa\text{B}$ .

Weiterhin wird geklärt, ob sich eine Na-Selenit-Supplementation des Zellkulturmediums der myeloischen Zellen funktionell auswirkt. Hierbei wird untersucht, wieviele Selenoproteine durch  $^{75}\text{Se}$ -Markierung in monozytären Zellen detektiert werden können. Durch Aktivitätsmessungen der Thioredoxin Reduktase und Glutathionperoxidase wird der Einfluss von Na-Selenit auf monozytäre Zellen bestimmt.

---

## 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)

SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat)

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

PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4)

LB-Medium (pro l: 10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Yeast Extract, 10 g 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  $\alpha$  (Genotyp: F<sup>-</sup> supE44 hsdR17 recA1 gyrA96 endA1 thi<sup>-1</sup> relA1 deoR  $\lambda$ ) und JM109 (Genotyp: F<sup>'</sup> traD36 proA<sup>+</sup> proB<sup>+</sup> lacIq  $\Delta$ (lacZ)M15  $\Delta$ (lac-proAB) supE44 hsdR17 recA1 gyrA96 thi<sup>-1</sup> endA1 relA1 e14- $\lambda$ ) verwendet.

#### 1.3 Plasmide

Der Vektor pBluescript SKII<sup>+</sup> (pBSSKII<sup>+</sup>, Stratagene) wurde zur Vermehrung von DNA-Fragmenten in *E. coli* verwendet. Zur Klonierung von PCR-Produkten wurde der pCRII-Vektor, zur Überexpression von cDNA in COS7-Zellen der pcDNA<sub>3</sub>-Vektor (beide Invitrogen) verwendet.

---

## 1.4 Oligonukleotide

Einzelsträngige Oligonukleotide wurden von Roth, doppelsträngige (AP1 und NF- $\kappa$ B) von Promega bezogen.

Oligonukleotide für Gelshift-Analysen:

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
AP1 (ds)	CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA
NF $\kappa$ B (ds)	AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC

Oligonukleotide für PCR:

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>	<b>Position (bp)</b>	<b>Genbank-Nr.</b>
1alpha1	CTGCTGAAGGCGGTGGTCAAGGAA	1226-1249	AB005038
1alpha2	GCTCTGCCAGGCGTCTCCCCATAC	1485-1508	AB005038
1alpha3	CTGAACCAGACCATGCCAG	110-127	AB005038
1alpha4	CCATGGGACTATCTGTCCAA	1637-1656	AB005038
1alpha5	AACAACGTAGTCTGCGACCT	596-615	AB005038
1alpha5a	GAACAACGTAGTCTGCGACCTTG	595-617	AB005038
1alpha6	GTCACATTTCCCAGGATGGA	1037-1056	AB005038
1alpha11	GTGATCTCTGAGTGGAGTGCTGT	1141-1164	AB005038
18S forward	TCAAGAACGAAAGTCGGAGGTTCCG	1025-1048	X03205
18S reverse	TTATTGCTCAATCTCGGGTGGCTG	1464-1487	X03205
$\beta$ -Aktin1	TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCT	478-506	AB004047
$\beta$ -Aktin2	CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGG	1111-1138	AB004047
PTHR1	ACTACATTTATGACTTCAAT	616-635	U17418
PTHR2	AAGTAAAGGAAGAAGGTCAC	1071-1090	U17418
PTHR3	ATCACAAAGGCCATGCCTAC	634-653	U17418
PTHR4	GCAGCATGAAGGACAGGA	898-915	U17418

## 1.5 Eukaryontische Zellen

### 1.5.1 TH P1-Zellen

Hierbei handelt es sich um eine monozytäre Zelllinie, die aus einem einjährigen männlichen Patienten mit akuter monozytärer Leukämie etabliert wurde (Tsuchiya, 1980). THP1-Zellen sind Suspensionszellen (ATCC No. 45502). THP1-Zellen lassen sich durch Behandlung mit

---

ng/ml] in Richtung Makrophagen differenzieren, während eine Behandlung mit MCSF [0,5 ng/ml] eine Differenzierung in Richtung Osteoklasten einleitet.

### 1.5.2 C OS7-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).

### 1.5.3 Monozyten

Zur Isolation von Monozyten aus frischem peripherem Blut wurde das gleiche Volumen 0,9 % NaCl / 0,1 % fetales Kälberserum (FCS) zugegeben und 20 ml Ficoll hi ermit überschichtet. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 1800 rpm ohne Bremse wurden die peripheren Blutleukozyten, die als weisser Ring sichtbar wurden, abpipettiert und mit 0,9 % NaCl / 0,1 % FCS zweimal gewaschen. Die Zellen wurden gezählt und in einer Dichte von  $1 \times 10^7$  Zellen / ml Medium in kollagenierten 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen ausgesät. Nach Kultivierung über Nacht wurden die schwimmenden Zellen abgesaugt und die anhaftenden Zellen kräftig mit PBS gespült. Etwa 2 – 5 % der peripheren Blutleukozyten sind Monozyten.

### 1.5.4 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen wurden von Dr. E. Kömpgen, Hautklinik Würzburg zur Verfügung gestellt. Es handelte sich hierbei um unreife Zellen (Tag 5) und reife Zellen (Tag 9) (Turner *et al.*, 1999).

### 1.5.5 HEK-293 und HEK-293 Tx-PTH<sub>R</sub>1 Zellen

Bei der Zelllinie HEK-293 handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen, die von Dr. E. Blind, Medizinische Klinik zur Verfügung gestellt wurde. HEK-293 Tx-PTH<sub>R</sub>1 Zellen sind stabil mit dem humanen PTH Rezeptor Typ 1 transfiziert (Blind *et al.*, 1995; John *et al.*, 1999).

## 1.6 Computersoftware

Für Berechnungen und zum Erstellen von Grafiken wurde Excel97 verwendet. 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

THP1-Zellen wurden zur Stammerhaltung in 75 oder 25 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflaschen in RPMI 1640 (Life Technologies GmbH), versetzt mit 10 % FCS, (PAN Systems) kultiviert. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 gesplittet. Monozyten wurden ebenfalls in RPMI 1640 (10 % FCS) für maximal zwei Tage, HEK-293 und COS7-Zellen in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies GmbH), versetzt mit 10 % FCS kultiviert. Routinemäßig erfolgte kein Zusatz von N-A-Selenit. Der Selenitgehalt des verwendeten Serums lag zwischen 5 bis 15 nM. Alle Zellen wurden bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre (95 % Luft, 5 % CO<sub>2</sub>) gehalten.

### 2.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren

#### 2.2.1 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die zu bestimmende Nukleinsäurelösung wurde 1:80 oder 1:400 mit Ampuva verdünnt und in Quartzküvetten gegen Ampuva im UvicordIII-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 Nukleinsäuren) sowie die Menge durch Multiplikation mit dem Faktor 50 (dsDNA) oder 40 (RNA) berechnet.

#### 2.2.2 Verwendete cDNA-Sonden

Zur Hybridisierung im Northern- und Southern-Blot wurden folgende cDNA-Sonden verwendet. Die Effizienz des RNA-Transfers auf die Membran im Northern Blot sowie Intaktheit und Menge der geladenen RNA wurden mit Hilfe einer cDNA-Sonde der konstitutiv exprimierten Glyzerin-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) sowie einer Sonde für die 18S-rRNA überprüft. Die humane GAPDH-Sonde aus fetaler Leber wurde von ATCC (Nr. 57091) bezogen.

Folgende cDNA-Sonden wurden weiterhin verwendet:

- pPTHR1/pBS: 281 bp-Fragment des humanen Parathormon-Rezeptors Typ 1 in

- 
- 1 $\alpha$ OHase/pCRII: komplette, 1,5 kb umfassende cDNA der humanen 1 $\alpha$ -Hydroxylase in pCRII/EcoRI, kloniert von Dr. J. Seufert, Genbank Nr. AB005038.
  - Osteopontin: 1636 bp cDNA-Fragment des humanen Osteopontins in pBSSKI I+/XbaI/PstI, kloniert von Dr. I. Dreher, Genbank Nr. J04765.
  - TR1 : 5'RACE-Produkt, Größe 2 kb, (Schütze *et al*, 1998b), Genbank Nr. AJ001050.
  - h24OHF1: 2683 bp cDNA-Fragment der humanen 24-Hydroxylase in pGEM-3Z/EcoRI kloniert, Genbank Nr. NM\_000782 (wurde von H. F. DeLuca, Wisconsin-Madison, USA zur Verfügung gestellt).

### 2.2.3 Arbeiten mit RNA

#### 2.2.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA aus Zellen wurde nach der Methode von Chomczynski (Chomczynski *et al.*, 1987) präpariert. Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und in 0,8 ml GTC-Lösung geerntet. Zum Scheren der DNA wurden die Homogenate durch eine 0,9 mm Kanüle gezogen und mit 0,8 ml Na-Acetat (2 M, pH 4), 0,8 ml Phenol und 0,16 ml Chloroform vermischt, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 20 min zentrifugiert (10000 x g, 4 °C). Nach Abnahme des wässrigen Überstandes wurde die RNA mit 1 ml Isopropanol über Nacht bei -20°C ausgefällt. Die RNA wurde durch Zentrifugation (10000 x g, 4°C) pelletiert, in 300  $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgenommen und erneut mit Isopropanol (300  $\mu$ l) gefällt. Nach erneutem Pelletieren durch Zentrifugation wurde die RNA mit 70 % Ethanol gewaschen, abzentrifugiert, getrocknet, in einem adäquaten Volumen Ampuwa aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### GTC-Lösung:

Guanidinisothiocyanat	4 M
Na-Laurylsarcosin	0,5 %
Na-Citrat	25 mM
$\beta$ -Mercaptoethanol	0,1 M

#### 2.2.3.2 DNaseI-Behandlung von RNA

Um Kontaminationen durch genomische DNA zu vermeiden wurde die isolierte RNA einem DNaseI-Verdau unterzogen. Zu 25  $\mu$ l gelöster RNA wurden 75  $\mu$ l DNaseI-Mix pipettiert und



---

gestoppt (10-fach Terminationsmix: 0,1 M EDTA, pH 8,0; 1 mg/ml Glycogen) und die RNA durch Phenol isieren ger einigt. Es wurden 110 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben, gemischt und für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut phenolisiert, gemischt und zentrifugiert. Nach Überführen des Überstandes in ein frisches Reaktionsgefäß wurden 110 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zupipettiert, gemischt, zentrifugiert und der Überstand in einem frischen Reaktionsgefäß mit 20 µl 7,5 M Na<sub>4</sub>OAc und 250 µl absolutem Ethanol versetzt und die RNA bei -20°C über Nacht gefällt. Nach Zentrifugation der RNA bei 13000 rpm für 20 min, 4°C, wurde das Pellet mit 80 % Ethanol gewaschen und die RNA in einem adäquaten Volumen Ampuwa gelöst.

### 2.2.3.3 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese und Northern Blot

#### 2.2.3.3.1 Auftrennung von RNA im denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel

15 bis 20 µg Gesamt-RNA wurden durch Gelelektrophorese in einem 1 % igen denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel (2,5 g Agarose, 180 ml Ampuwa, 25 ml 10-fach MOPS (0,2 M Morpholinopropansulfonsäure, 50 mM Na-Acetat; 10 mM EDTA, pH 7,0), 45 ml 37 % Formaldehyd, 100 µl (500 µg/ml) Ethidiumbromid) in einer Flachbettapparatur (AGS, Heidelberg), Laufpuffer 1-fach MOPS, aufgetrennt. Die Proben wurden mit 15 µl Probenpuffer (140 µl Formamid, 56 µl Formaldehyd, 42 µl 10-fach MOPS, 40 µl 5-fach Stop-Puffer) versetzt und für 10 min bei 65 °C im Wasserbad denaturiert. Nach dem Auftragen der Proben wurde für ca. 16 h eine Spannung von ca. 30 Volt angelegt. Anschließend wurde das Gel zunächst für mindestens 1 h gewässert, fotografiert, und nach den Angaben des Herstellers mittels Kapillarblot auf eine Nylo membran (Hy bond, Amersham Pharmacia Biotech) über Nacht geblottet. Als Transferpuffer wurde 10-fach SSC verwendet. Die RNA wurde durch UV-Bestrahlung auf der Membran kovalent fixiert (UV-Stratalinker 1800, Stratagene, 2 x 1200 kJ).

#### 2.2.3.3.2 Hybridisierung

Die Membranen wurden zunächst in der Hybridisierungslösung (RapidHyb Buffer, Amersham Pharmacia Biotech) für 15 min bei 65 °C prähybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte 1,5 bis 3 h bei 65°C mit radioaktiv-markierten cDNA-Sonden (s.u.).

---

### 2.2.3.3.3 Waschen von Northern Blots und Autoradiographie

Northern Blots wurden zweimal bei RT für 30 min mit 2-fach SSC, 1 % SDS gewaschen. Anschließend wurde sukzessive der Salzgehalt des Waschpuffers erniedrigt (1-, 0,5-, 0,1-fach SSC, 1 % SDS) und die Temperatur in 2 °C-Schritten erhöht, bis mit dem Handmonitor ein sich vom Hintergrund des Blots abhebendes Signal detektiert werden konnte. Die Blots wurden in Kunststoffolie eingeschweisst und bei - 80°C in einer Autoradiografiekassette mit Verstärkerfolie auf einen Kodak X-OMAT-Film exponiert.

### 2.2.3.4 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 5-fach First Strand Buffer (Life Technologies GmbH), 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl Desoxyribonukleotide (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.

## 2.2.4 Arbeiten mit DNA

### 2.2.4.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten (Mullis *et al.*, 1987) wurde Taq-Polymerase (Chien *et al.*, 1976; Amersham Pharmacia Biotech) und ein Thermocycler von Pel tier verwendet. Ein PCR-Ansatz enthält bis zu 100 ng Template-DNA, jeweils 25 pmol Primer, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 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; 45 s, 72°C], einmalig 300 s, 72°C amplifiziert, und zur Analyse im Agarosegel aufgetrennt. Die Annealingtemperatur 'T' wurde im allgemeinen 1-2°C unter der Schmelztemperatur des Primers gewählt. Tab. 3 gibt eine Übersicht der verwendeten Primerkombinationen, der Produktlänge und der Annealingtemperaturen.

Gen	Primerkombination	Produktlänge	Annealingtemp. 'T'
PTH Rezeptor Typ 1	PTHR1 - PTHR2	474 bp	50 °C
PTH Rezeptor Typ 1	PTHR3 - PTHR4	281 bp	54 °C
1 $\alpha$ -Hydroxylase	1alpha5 – 1alpha6	460 bp	59 °C
1 $\alpha$ -Hydroxylase	1alpha5a - 1alpha11	569 bp	65 °C
$\beta$ -Aktin	$\beta$ -Aktin1 - $\beta$ -Aktin2	660 bp	60 °C
18S	18S forw. - 18S rev.	462 bp	61 °C

Tab. 3: **Verwendete PCR- Primer**, Primerkombinationen, Annealingtemperaturen und Produktlängen der amplifizierten Gene.

Für eine nested PCR wurden 1  $\mu$ l des 50  $\mu$ l PCR-Ansatzes als Template eingesetzt und die DNA mit innenliegenden Primern nach oben beschriebenem Protokoll reamplifiziert.

Für die Amplifikation der 1 $\alpha$ -Hydroxylase cDNA (1,5 kb) wurde das TaqPlus Long PCR System von Stratagene verwendet. Es wurden 1  $\mu$ l der cDNA, jeweils 25 pmol der Primer 1alpha3 und 1alpha4, 5  $\mu$ l des mitgelieferten Low Salt Puffers, 20 mM Desoxynukleotide und 2,5 U TaqPlus Polymerase zur Amplifikation in einem Volumen von 50  $\mu$ l eingesetzt. Der Ansatz wurde für 180 s auf 94 °C erhitzt und anschließend die DNA in 30 Zyklen der Abfolge [30s, 94 °C; 30s, 55 °C; 90s, 72 °C], einmalig 300 s, 72 °C amplifiziert und zur Analyse im Agarosegel aufgetrennt.

#### 2.2.4.2 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgte für 1-16 h bei 37 °C. Pro  $\mu$ g DNA wurden ca. 3 U Enzym eingesetzt. Restriktionsenzyme mit entsprechendem 10-fach konzentriertem Reaktionspuffer wurden bei Life Technologies GmbH bezogen. Für Doppelrestriktionen durch Enzyme, die unterschiedliche Restriktionspuffer bevorzugen, wurde der 10-fach konzentrierte Onephorall-Puffer (Amersham Pharmacia Biotech) eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines 1/4 Volumenanteils 5-fach Stop-Puffers gestoppt.

#### 2.2.4.3 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 (10  $\mu$ g/ml)

---

Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids unter UV-Bestrahlung sichtbar und mit einer Polaroid-Kamera fotografiert.

#### 2.2.4.4 Elution von DNA-Fragmenten

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

#### 2.2.4.5 Klonierung von PCR-Produkten

##### 2.2.4.5.1 Polieren der Enden

Zum Auffüllen 5'-überstehender DNA Enden wurden 30 µl eines 50 µl-PCR Ansatzes mit 3 µl 0,1 M MgCl<sub>2</sub> und 0,5 µl dNTPs (jeweils 20 mM) versetzt, 0,5 U Klenow-Fragment (Life Technologies GmbH) zugegeben und der Ansatz bei 25°C für 1 h inkubiert. PCR-Produkte wurden im allgemeinen in die EcoRV-Schnittstelle von pBSSKII+ kloniert. Der Vektor wurde mit EcoRV restringiert und anschließend zur Hitzeinaktivierung des Enzyms für 10 min bei 65°C inkubiert. Der PCR-Ansatz und ein Teil des Restriktionsansatzes wurden zur Kontrolle der Linearisierung des Plasmids auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen und die PCR-Bande eluiert. Plasmid und PCR-Produkt wurden bis zur Ligation bei 4°C oder -20°C aufbewahrt.

##### 2.2.4.5.2 Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Phosphorylierung von 5'-Enden des DNA-Fragments wurden 20 µl Eluat mit 3 µl 10 mM ATP, 3 µl 10-fach Puffer (0,5 M Tris-HCl, pH 7,6, 0,1 M MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT, 1mM EDTA, pH 8,0), 3,5 µl Bidest und 0,5 µl T4 PNK für 30 min bei 37°C inkubiert. Aufgrund der geringen Lebensdauer des Enzyms war ein Abstoppen der Reaktion nicht nötig.

##### 2.2.4.5.3 Dephosphorylierung des Vektors

Nach Linearisierung des Vektors mit entsprechenden Restriktionsenzymen in einem Ansatz von 20 µl wurde die DNA über eine MicroSpin Column (Amersham Pharmacia Biotech) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. 17 µl des Ansatzes wurden mit 2 µl 10-fach Dephosphorylierungspuffer (10 mM ZnCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3) und 1 µl Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (Life Technologies GmbH) für 1 h bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde wieder über eine MicroSpin Column gereinigt und zur Ligation eingesetzt.

---

#### 2.2.4.5.4 Li gation

In einem 20 µl Ligationsansatz wurden Insert und Vektor im molaren Verhältnis von 1:1 bis 3:1 (insgesamt ca. 100 ng), 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.

#### 2.2.4.6 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

##### 2.2.4.6.1 Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli* DH5α oder JM109

200 ml NZY-Medium (pro Liter: 5 g NaCl, 2 g MgSO<sub>4</sub>, 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, pH 7,5) wurden mit 1 ml einer 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 MgCl<sub>2</sub> resuspendiert und nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Zellen wurden in 50 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> aufgenommen und 30 min auf Eis gestellt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Bakterien in 5 ml CaCl<sub>2</sub> 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.

##### 2.2.4.6.2 Transformation kompetenter *E. coli* DH5α oder JM109

Ein Aliquot kompetenter *E. coli* DH5α oder JM109-Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit 1 µl eines 20 µl-Ligationsansatzes versetzt und auf Eis für 30 min inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 90 s bei 42°C einem Hitzeimpuls unterzogen, ca. 10 s in Eis gestellt, mit 800 µl vorgewärmtem LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Es wurden jeweils 100 µl und der Rest der Bakteriensuspension auf LB/Ampicillin (50 µg/ml) Agarplatten ausgebracht. Wurde in einen Vektor kloniert der blau-weiße Selektion erlaubte (pBSSKII+ oder pCRII) wurden auf die Platten ca. 1 h vor dem Ausplattieren der Bakterien 40 µl IPTG (20 mg/ml) sowie 40 µl X-Gal (20 mg/ml in DMSO) ausplattiert. Nach Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht wurden rekombinante Kolonien gepickt und in 2 ml LB/Ampicillin Medium überführt. Nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht im Schüttelinkubator konnte die Plasmid-DNA isoliert werden.

---

## 2.2.4.7 Isolierung von Plasmid-DNA

### 2.2.4.7.1 Mini-Präparation

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

### 2.2.4.7.2 Midi- und Maxi-Präparation

Zur Präparation großer Mengen an Plasmid-DNA wurden entsprechend transformierte *E. coli* DH5α und JM109-Klone über Nacht in LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin inkubiert und anschließend die Plasmid-DNA mit Hilfe des Qiagen Midi- oder Maxi-Kits nach Angaben des Herstellers isoliert.

### 2.2.4.8 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 Didesoxynukleotide und Desoxynukleotide, 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 2 µl 3 M Natrium-Acetat, pH 4,6 und 50 µl absolutem Ethanol ersetzt, 10 min auf Eis inkubiert und bei 13000 rpm, 4°C für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 250 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

---

#### 2.2.4.9 Radioaktive Markierung von DNA

##### 2.2.4.9.1 End-Markierung von Oligonukleotiden mit T4-Polynukleotid-Kinase

Doppelsträngige Oligonukleotide wurden mit [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP (Amersham Pharmacia Biotech) und T4-Polynukleotid Kinase (T4-PNK, Life Technologies GmbH) endmarkiert. Dazu wurden jeweils 1  $\mu\text{l}$  Oligonukleotid (1,75 pmol) mit 8,5  $\mu\text{l}$  Ampuwa, 3  $\mu\text{l}$  5-fach Forward Reaction Puffer, 25  $\mu\text{Ci}$  [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP und 1  $\mu\text{l}$  (10 U) T4-PNK versetzt und für mindestens 1 h bei 37°C inkubiert.

##### 2.2.4.9.2 Markierung von cDNA-Sonden und anderen Restriktionsfragmenten

Jeweils 25 ng Probe wurden durch 10-minütiges Kochen denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Die Markierung wurde mit einem Random Priming Labelling Kit (Life Technologies GmbH) und 50  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dCTP (110 TBq/mmol, Redivue, Amersham Pharmacia Biotech) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

##### 2.2.4.9.3 Abtrennung der freien Nukleotide

Die Abtrennung freier radioaktiv markierter Nukleotide erfolgte durch Gelfiltration über eine Sephadex G-50 Säule (Amersham Pharmacia Biotech). Die Säulen wurden aus TE gesättigtem Sephadex G-50 in einer Insulinspritze hergestellt. Überschüssiges TE wurde 1 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Das gesamte Reaktionsgemisch wurde auf die Säule pipettiert und für 1 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde 1:250 mit Wasser verdünnt, 5  $\mu\text{l}$  mit 4 ml Szintillator (UltimaGold, Packard) versetzt und zur Bestimmung des radioaktiven Einbaus in einem  $\beta$ -Counter (TRI-CARB 1600TR, Packard) gemessen.

#### 2.2.4.10 Southern Blot

Um gewünschte Klone zu identifizieren und zur Spezifizierung von PCR-Produkten wurde die im Agarosegel aufgetrennte DNA nach einem Denaturierungsschritt und anschließender Neutralisierung des Gels auf Hybond-Membranen (Amersham Pharmacia Biotech) nach den Angaben des Herstellers mittels Kapillarblotmethode über Nacht geblottet (Southern, 1975). Die Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgten wie unter Punkt 2.2.3.3.2 und 2.2.3.3.3 beschrieben. Die Membran wurde für ca. 3 h (RT) bis über Nacht (-80°C) auf einem Kodak X-OMAT-Film oder für 15 min auf einen Multi Purpose Screen (Packard) exponiert und mit einem Phosphorimager (Cyclone, Packard) ausgewertet.

---

#### 2.2.4.11 Transfektion von COS7-Zellen

Zur Transfektion wurden die Zellen 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 Lipofectamine-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 zweimal mit serumfreiem Medium gewaschen worden waren. Nach 16 h Inkubation wurde die Transfektionslösung entfernt, die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und für weitere 20 h mit 2 ml serumhaltigem Zellkulturmedium, versetzt mit 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub>, inkubiert. Transfektionsexperimente wurden von Dr. J. Seufert durchgeführt.

### 2.3 Arbeiten mit Proteinen

#### 2.3.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden mit dem Protein-Assay von Bio-Rad, angelehnt an die Proteinbestimmung nach Bradford (1976), nach den Angaben des Herstellers in einem UvicordIII-Photometer (Amersham Pharmacia Biotech) gemessen. Als Proteinstandard zur Erstellung von Eichkurven wurde bovines IgG bekannter Konzentration verwendet. Anhand der Eichkurve wurden die Proteinkonzentrationen berechnet.

#### 2.3.2 Messung von Thioredoxin Reduktase- und Glutathionperoxidase-Aktivität

THP1-Zellen wurden im Verhältnis 1:2 auf 25 cm<sup>2</sup> Flaschen verteilt und ein Teil der Zellen für 5 Tage mit 100 nM Na-Selenit kultiviert. Nach Differenzierung der Zellen in selenithaltigem und selenitfreiem Medium mit 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> (10<sup>-7</sup> M) für 3 Tage und anschließender Stimulation mit 0,5 ng/ml IGM CSF bzw. M CSF wurden die Zellen zur Bestimmung von TR- und GPx-Aktivität präpariert. Die TR-Aktivität wurde auch aus peripheren Blutmonozyten bestimmt, die von Dr. M. Kreutz, Abteilung für Hämatologie und internistische Onkologie, Universität Regensburg zur Verfügung gestellt wurden.



---

### 2.3.2.1 Präparation der zytosolischen Fraktion für TR- und GPx-Messung

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in Homogenisationspuffer (250 mM Saccharose, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, frisch zugeben, pH 7,4; für GPx-Messung) oder in TE Puffer (1 mM EDTA, 50 mM TRIS, pH 7,5; für TR-Messung) geerntet. Nach Sonifikation der Zellen (zehn 0,5 s Pulse bei einer Leistung von 100 Watt, Labsonic U, Braun) wurden die Homogenate 10 min bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert (Biofuge 17RS, Heraeus) und der Überstand (Zytosole) zur Messung der GPx- oder TR-Aktivität eingesetzt.

### 2.3.2.2 Messung der Thioredoxin Reduktase-Aktivität

Der Thioredoxin-Reduktase Enzymassay, der nicht zwischen den einzelnen TR-Isoenzymen unterscheidet, beruht auf einer enzymatischen Reaktion der Thioredoxin Reduktase mit DTNB (5,5'-Dithio-bis Nitrobenzoic Acid, sehr instabil). Hierbei wird ein Molekül DTNB zu zwei Molekülen TNB reduziert. Die Farbreaktion kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 412 nm gemessen werden.

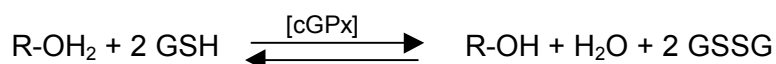
In einer Küvette wurden 900 µl Reaktionsmix vorgelegt (Reaktionsmix: 50 µl NADPH 40 ng/ml, 500 µl EDTA 0,2 M pH 8,0, 1000 µl KPO<sub>4</sub> 1 M pH 7,0, 800 µl DTNB 25 mg/ml, 40 µl BSA 50 mg/ml, H<sub>2</sub>O ad 10 ml). Es wurden 100 µl Zellextrakt zupipettiert und direkt anschließend die Extinktionsänderung innerhalb von zwei Minuten bestimmt. Die TR-Aktivität errechnet sich bei einem Extinktionskoeffizienten von 13,6 nach folgender Formel:

$$\frac{E_{412nm} - E_{412nm} \text{ Leerwert} - E_{412nm} \text{ nach 2 min} - E_{412nm} \text{ Leerwert nach 2 min}}{13,6 \times 2 \text{ Moleküle TNB} \times 2 \text{ min}} = [\text{mU}]$$

### 2.3.2.3 Messung der Glutathionperoxidase-Aktivität

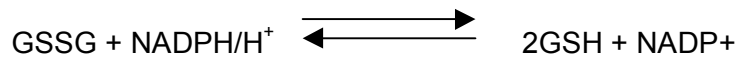
Die Bestimmung der Glutathionperoxidase-Aktivität wurde durch einen gekoppelten enzymatischen Test durchgeführt (Beutler, 1975):

Zunächst wird Peroxid (im Assay t-Butyl-Hydroperoxid) durch die GPx zum Alkohol reduziert, wobei Glutathion zum Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert wird.



---

Unter NADPH-Oxidation kann reduziertes Glutathion durch die Glutathion-Reduktase (GSH-Red.) wieder regeneriert werden. Die Oxidation von NADPH/H<sup>+</sup> zu NADP<sup>+</sup> kann spektralphotometrisch bei 340 nm verfolgt werden



In einem Endvolumen von 1 ml wurden in einer Halbmikroküvette 0,1 M Tris, 0,5 mM EDTA (pH 8,0), 200 µM NADPH (Roche Molecular Biochemicals), 2 mM Glutathion (Sigma), 1 U/ml Glutathion Reduktase Typ IV aus Bäckerhefe (Sigma) vorgelegt. 100 µg Protein der Zytosole wurden zugegeben und die Reaktion durch 7 µM t-Butyl-Hydroperoxid (Merck) gestartet. Nach einer kurzen Vorinkubationsphase von 1-2 min wurde die NADPH-Oxidation photometrisch bei 340 nm bei RT über den linearen Bereich hinweg (ca. 4 min) gemessen. Unspezifische NADPH-Oxidation wurde durch Zugabe von 100 mM Mercaptosuccinat (Sigma) vor dem Start der Reaktion bestimmt und die erhaltenen Werte von den Messwerten abgezogen. Mercaptosuccinat blockiert spezifisch die GPx-Aktivität und besitzt bei 340 nm eine zu vernachlässigende Absorption (Gross *et al.*, 1995).

Die Aktivität der GPx wurde in nmol oxidiertes NADPH pro min und mg Protein bei einem Extinktionskoeffizienten für NADPH von  $\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6,22 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$  nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\Delta E_{340}/\text{min} \times 1 \text{ cm}^3 \times 1000 \mu\text{mol}}{6,22 \text{ cm}^2 \times 1 \text{ cm} \times \text{mg Protein}} = \text{spez. Aktivität GPx [nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}\text{]}$$

### 2.3.3 Metabolische Markierung von Zellen mit <sup>75</sup>Se

THP1-Zellen wurden in 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen mit RPMI 1640/10 % FCS ausgesät. Ein Teil der Zellen wurde mit 10<sup>-7</sup> M 1,25 (OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> für 24 h vorinkubiert. Anschließend erhielten die Zellen für 24 h <sup>75</sup>Se-Na-Selenit (10 nM; spezifische Aktivität 1,9 Ci/µg, Forschungsreaktor Universität Missouri, Columbia, USA).

Nach 24 h erfolgte die Ernte der Zellen in 500 µl SDS-PAGE-Puffer (0,1 M Tris, 1 % Lithiumdodecylsulfat, 7,5 % Glycerin, 0,1 % Mercaptoessigsäure (MAC, Sigma), 0,005 % Bromphenolblau, pH 6,8). Zur Hydrolyse enthaltener Nucleinsäuren wurden die Zellhomogenate für mindestens 1 h bei 37°C mit 20 U/ml Benzonase<sup>TM</sup> (Merck) inkubiert. Die Zellüberstände und die Zellhomogenate wurden getrennt im γ-Counter gemessen. Die

---

Analyse der Proteine erfolgte durch denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).

### 2.3.3.1 SDS-PAGE

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 Höfer-Proteingel-Kammer (SE600) Trenn- und Sammelgel gegossen:

#### Trenngel:

Acrylamid:Bisacrylamid 150:1	16 oder 12 %
Tris (pH 8,8)	750 mM
SDS	0,1 %
Ammoniumpersulfat	0,05 %
TEMED	0,03 %

#### Sammelgel:

Acrylamid:Bisacrylamid 49:1	10 %
Tris (pH 6,8)	125 mM
SDS	0,1 %
Ammoniumpersulfat	0,05 %
TEMED	0,03 %

---

Kathodenpuffer:

Tris	28 mM
Glycin	190 mM
SDS	0,1 %
Mercaptoessigsäure	3 mM
	pH 8,4

Anodenpuffer:

Tris	25 mM
Glycin	190 mM

SDS-PAGE-Probenpuffer:

Tris	100 mM
Lithiumdodecylsulfat	1 %
Glyzerin	0,1 %
Mercaptoessigsäure	0,1 %
Bromphenolblau	0,0005 %
	pH 6,8

Die Proteine wurden für 10 min im SDS-PAGE-Probenpuffer gekocht und anschließend auf das Gel aufgetragen. Es wurden jeweils pro Spur die gleiche Anzahl an cpm und gleiches Volumen aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Proteinstandard von Sigma, bestehend aus den Komponenten  $\alpha$ -Lactalbumin ( 14,2 kDa), Trypsininhibitor ( 20,1 kDa), Trypsinogen (24,0 kDa), Carboanhydrase (29,0 kDa), Glyzerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (36 kDa), Albumin aus dem Hühnerei (45,0 kDa) und bovin es Albumin (66,0 kDa) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 18 h bei 8 mA und 4°C. Die Gele wurden mit Coomassie Blue für 1 h gefärbt und anschließend so lange entfärbt bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abhoben.

Färbelösung:

Coomassie Blue 250 R	0,01 %
Methanol	5 %
Essigsäure	1 %

---

### Entfärbelösung:

Glyzerin	7 %
Essigsäure	10 %
Methanol	8,5 %

Nach dem Entfärben wurden die Gelstücke zwischen Cellophanfolien für 2 h bei 80 °C (Geltrockner) getrocknet und bei -80°C auf einem Röntgenfilm (Kodak X-OMAT) exponiert.

### 2.3.4 Gel-Shift-Analysen

Zur Untersuchung von Protein-DNA-Wechselwirkungen wurden Gel-Shift-Analysen mit Kernextrakten aus THP1-Zellen und <sup>32</sup>P-markierten Oligonukleotiden durchgeführt.

#### 2.3.4.1 Präparation von Kernextrakten

Die Präparation von Kernextrakten erfolgte nach der Methode von Grandison *et al.* (1994). Zellen wurden in PBS gewaschen, in 1 ml Lysispuffer geerntet, 15 min auf Eis inkubiert, anschließend mit 25 µl 10 % Nonidet P40 vermischt und die Kerne dann durch Zentrifugation (15000 x g, 30 s, 4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 µl Extraktionspuffer resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 min auf Eis erfolgte eine weitere Zentrifugation (15000 x g, 5 min, 4 °C). Der Überstand, der die Kernproteine enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Proteinkonzentration bestimmt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### Lysispuffer:

HEPES (pH 7,8)	100 mM
KCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
DTT	1 mM
Pefabloc SC (Merck)	1 mM

---

Extraktionspuffer:

HEPES (pH 7,8)	50 mM
EDTA	0,1 mM
KCl	50 mM
NaCl	300 mM
DTT	1 mM
Pefabloc SC	1 mM
Glyzerin	10 %

#### 2.3.4.2 Bindungsreaktion

Kernextrakte (15 µg Protein) wurden für 30 min mit 10000- 20000 cpm  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP-Oligonukleotid mit Bindungspuffer in einem Volumen von 15 µl bei RT inkubiert. Zur Untersuchung der Spezifität der DNA-Protein-Interaktion wurde entweder ein gegen das Protein gerichteter Antikörper (1 µg) oder ein 100-facher Überschuss an nicht-markiertem Oligonukleotid vor dem Start der Bindungsreaktion zugegeben.

Bindungspuffer:

Tris/HCl pH 7,5	10 mM
NaCl	100 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
Nonidet P 40	0,2 %
Glyzerin	5 %
Poly dI-dC (Amersham Pharmacia Biotech)	0,5 µg

#### Verwendete Antikörper

Alle Antikörper wurden von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA) bezogen. Es wurden folgende Antikörper verwendet: spezifisch für die NFκB p65/RelA Untereinheit (A-G; sc-109-G), für c-Jun/AP1 (D) sc-44, der mit c-Jun, Jun B und JunD reagiert.

---

#### 2.3.4.3 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Reaktionsansätze der Bindungsreaktion wurden vollständig auf ein 1,5 mm dickes, 4%iges Polyacrylamidgel (AA:BA 37,5:1 in TBE) aufgetragen, bei 8 mV/cm 1,5 h elektrophoretisch aufgetrennt (V15.17-Kammer, Life Technologies GmbH; Laufpuffer: TBE) und anschließend auf einem Gelrockner (Biorad) getrocknet. Das Gel wurde bei -80°C auf einen Röntgenfilm (Kodak X-OMAT) exponiert.

#### 2.3.5 Rezeptorbindungsassay: Bindung von PTH related Protein (PTHrP) an den PTH Rezeptor Typ 1 (PTHR1)

##### 2.3.5.1 Markierung von PTHrP mit Cy3.5

PTHrP 1-86 (Bachem, Heidelberg), in 0,1 M Na-Carbonatpuffer, pH 9,3 gelöst (5 µg/ml), wurde mit dem rotfluoreszierenden Farbstoff Cy3.5 markiert. Hierzu wurde das Markierungssystem FluoroLink Cy3.5 Monofunctional Dye (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet. 25 µl gelöstes PTHrP und 100 µl Na-Carbonatpuffer wurden mit einem Aliquot des Farbstoffes vermischt, 30 min bei RT inkubiert und alle 10 min geschüttelt. Im Anschluss erfolgte eine Aufreinigung über eine 30 cm lange, mit PBS/0,1% Na-Azid, pH 7,2 äquilibrierte Sephadex G-25 Säule (Amersham Pharmacia Biotech). Das markierte Protein wurde auf die Säule pipettiert und mit PBS/0,1% Na-Azid eluiert. Die erste rotgefärbte Fraktion, etwa 1200 µl, enthielt das farbstoffmarkierte Protein. Die Proteinkonzentration wurde mit BioRad Proteinreagenz bestimmt.

##### 2.3.5.2 Anfärben von Monozyten und Dendritischen Zellen mit PTHrP-Cy3.5

Monozyten und dendritische Zellen wurden in PBS vom Kulturfloßboden abgekratzt, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und in 200 µl PBS resuspendiert. Die Zellen wurden auf Eis für 20 min mit 2,5 µg/ml PTHrP-Cy3.5 und 2 µl CD14-FITC Antikörper (FITC: Fluoresceinisothiocyanat, Monozyten) bzw. CD45-FITC Antikörper (Dendritische Zellen, beide Antikörper Immunotech, Marseille) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 200 µl PBS resuspendiert. Die Zellkerne wurden für 5 min mit 10 ng/ml DAPI (4',6-Diamidin-2-phenyl-indol 2HCl H<sub>2</sub>O) auf Eis gegengefärbt und zweimal mit PBS gewaschen. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen kurz geschüttelt, ein Tropfen auf einen Objektträger mit Vectashield (Serva) eingedeckt und anschließend mikroskopiert und fotografiert (Axioskop 2, Zeiss).

---

### 2.3.6 Im munhistochemie

Zum immunhistochemischen Nachweis von Osteopontin in Lebergranulomen, Morbus Crohn-Präparaten und Knochenschnitten wurden Paraffinschnitte durch Inkubation in einer absteigenden Alkoholreihe (Abfolge zweimal Xylol, 100 % Ethanol, 80 % Ethanol, 70 % Ethanol, 50 % Ethanol, je 10 min) entparaffinisiert und anschließend in PBS gewaschen. Zum Blockieren unspezifischer Bindungen wurden die Präparate in Blocking-Lösung (4 ml FCS, 400 mg BSA, 36 ml Wasser) für 60 min bei RT inkubiert und anschließend mit dem polyklonalen primären Kaninchen anti-Osteopontin-Antikörper LF 123 (1:50 verdünnt, Fisher *et al.*, 1995) für 60 min bei RT überschichtet. Zur Kontrolle wurden Schnitte parallel mit Kaninchen-Präimmunsereum behandelt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation aller Schnitte mit dem zweiten Antikörper (Anti-Rabbit IgG, Peroxidase-konjugiert, 1:200 verdünnt, Sigma) für 30 min bei RT. Nach weiteren Wasch-Schritten wurden die Präparate für weitere 30 min bei RT mit einem Peroxidase-konjugierten Anti-Peroxidase Antikörper überschichtet (1:500 verdünnt, Sigma) und anschließend gewaschen. Die Schnitte wurden mit Diaminobenzidin (DAB)-Reagenz inkubiert (DAB-Reagenz: 6 mg DAB in 100 µl DMF lösen, 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 ml Wasser) und die Reaktion nach 10 min durch Waschen in PBS und Wasser abgestoppt. Die Zellkerne wurden 5 min mit Hämalaun (Merck) gegengefärbt, unter fließendem Wasser 10 min gespült, nach Inkubation in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Abfolge: 50 % Ethanol, 70 % Ethanol, 80 % Ethanol, 100 % Ethanol, zweimal Xylol, je 10 min) mit Entellan (Merck) eingedeckt und anschließend mikroskopiert und fotografiert (Axioskop 2, Zeiss).

### 2.4 Phagozytosestest

Zur Bestimmung der Phagozytoserate von THP1-Zellen im undifferenzierten und differenzierten Zustand wurde ein Phagozytosestest (Becton Dickinson) durchgeführt. Hierzu wurden THP1-Zellen mit 100 nM Na-Selenit supplementiert und anschließend mit 10<sup>-7</sup> M 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> für 3 Tage differenziert und für weitere 24 bzw. 48 h mit 0,5 ng/ml GM-CSF stimuliert. Die Versuchsdurchführung des Phagozytosestests erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Phagozytoserate der THP1-Zellen wurde nach 30, 60 und 120 minütiger Inkubation mit fluoreszierenden *E. coli* Membranbestandteilen bestimmt und mit einem FACSAN (Becton Dickinson) ausgewertet. Der Phagozytosestest wurde von Rosemarie Ottohal und Anette Kosch-Kinzinger, Immunbiologisches Labor, Medizinische Poliklinik durchgeführt.



---

## 2.5 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> Radioimmunoassay

In den Überständen von hormonbehandelten THP1-Zellen und Monozyten wurde die Konzentration an freigesetztem 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> bestimmt. Es wurde hierfür ein Radioimmunoassay der Firma Nichols Institute Diagnostics verwendet, der für die Bestimmung des Serum 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Gehaltes entwickelt wurde. Zur Bestimmung der Eichgerade wurden die mitgelieferten Standards verwendet. Die Vorbereitung der Zellüberstände und die Extraktion des 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> erfolgte nach Protokoll des Herstellers wie für Serum empfohlen. Radioaktives <sup>125</sup>I-1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> wurde in einem γ-Counter gemessen.

---

## D Ergebnisse

### 1 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-responsive Gene in Monozyten und Makrophagen

#### 1.1 1 $\alpha$ -Hydroxylase

Die 1 $\alpha$ -Hydroxylase ist das 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-aktivierende Enzym, welches im systemischen Vitamin D<sub>3</sub>-Stoffwechsel in der Niere durch Parathormon reguliert wird. Es sollte geklärt werden, ob eine Expression in monozytären Zellen ebenfalls erfolgt und eine Regulation durch PTH über den PTH-Rezeptor Typ 1 (PTHr1) stattfindet. Ein weiterer Ligand des PTHr1 ist PTHrP, dessen Bindung an die Membran von Monozyten und dendritischen Zellen ebenfalls analysiert wurde.

#### 1.1.1 Expression der 1 $\alpha$ -Hydroxylase und des PTHr1 in Monozyten

Frisch isolierte periphere Blutmonozyten wurden für 16 h mit 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> [10<sup>-7</sup> M] alleine bzw. zusammen mit PTH [10<sup>-8</sup> M] und Ketoconazol [15 x 10<sup>-6</sup> M] behandelt. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, revers transkribiert und die humane 1 $\alpha$ -Hydroxylase und der PTH-Rezeptor Typ 1 (PTHr1) mittels PCR amplifiziert und im Southern-Blot analysiert. Abb. 6 zeigt den Nachweis beider Amplifikate im Agarosegel und Southern-Blot im Vergleich zur  $\beta$ -Aktin-Amplifikation. Monozyten aus peripherem Blut exprimieren sowohl die 1 $\alpha$ -Hydroxylase als auch den PTHr1. Nach Behandlung der Zellen mit dem p450-Enzym-Inhibitor Ketoconazol nimmt die mRNA-Menge der 1 $\alpha$ -Hydroxylase ab (Spur 4), die Expression des PTHr1 bleibt unbeeinflusst. Substitution der Monozyten mit dem 1 $\alpha$ -Hydroxylase-Substrat 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> bzw. gleichzeitige Gabe von PTH verändert die Expression der 1 $\alpha$ -Hydroxylase und des PTHr1 nicht (Spur 2 und 3).

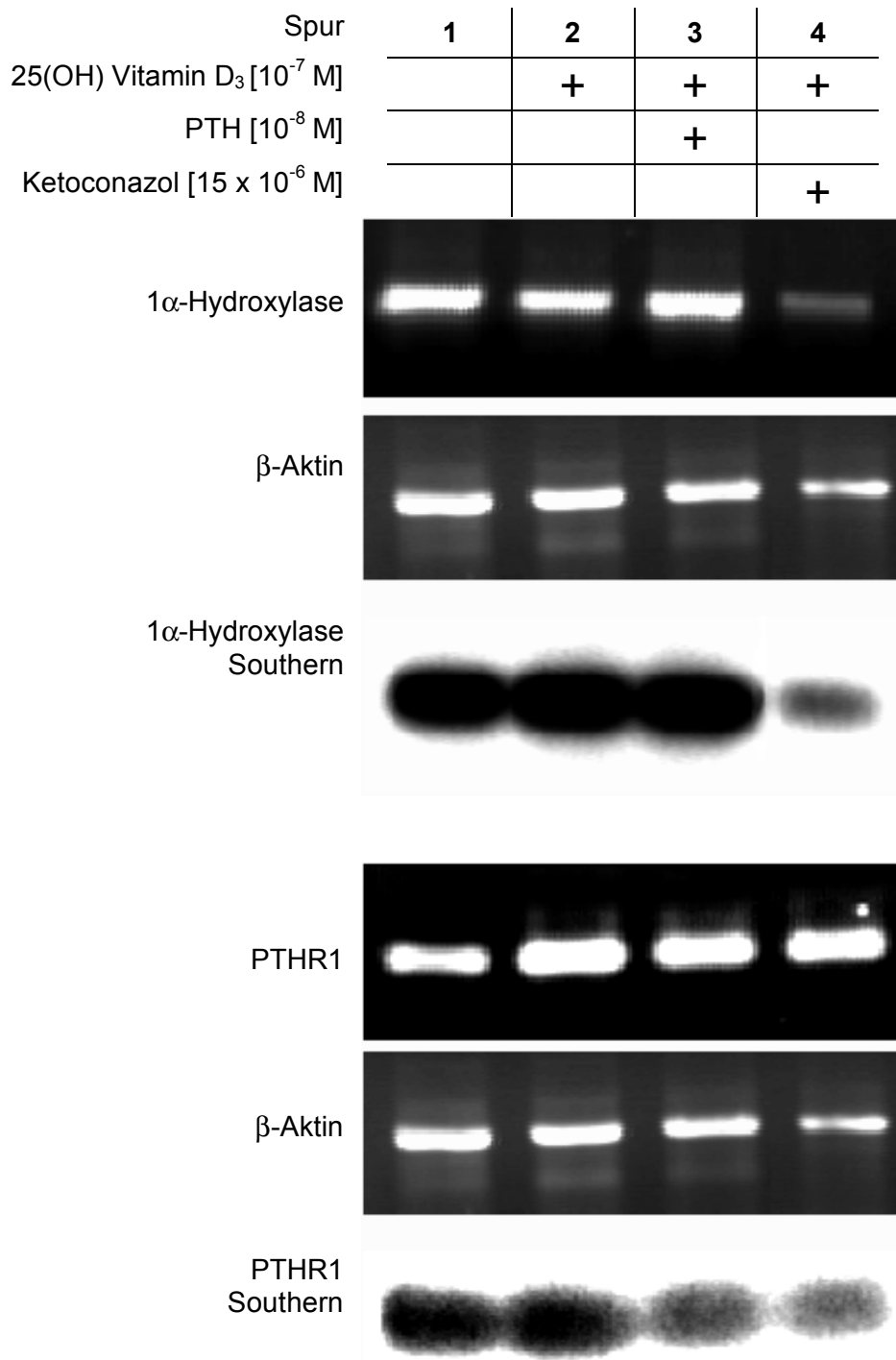


Abb. 6: **PCR-Amplifikation und Southern-Blot der humanen 1α-Hydroxylase und des PTH Rezeptors Typ 1 in peripheren Blutmonozyten** im Vergleich zur β-Aktin Amplifikation in Agarosegel. Periphere Blutmonozyten wurden mit 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> (Spur 2), mit 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> und PTH (Spur 3) sowie mit 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> und Ketoconazol (Spur 4) für 16 h behandelt und die Gesamt-RNA isoliert. Die mRNA wurde mit einem Oligo dT-Primer revers transkribiert und mittels PCR die humane 1α-Hydroxylase und der PTHR1 amplifiziert.

---

### 1.1.1.1 PTH-Rezeptor Typ 1 in Dendritischen Zellen und embryonalen Nierenzellen

Aus der humanen embryonalen Nieren Zelllinie HEK-293, aus HEK-293 Zellen, die stabil mit dem PTHR1 transfiziert wurden (HEK-293 Tx PTHR1) und aus Dendritischen Zellen (Differenzierungstag 5 und 8) wurde Gesamt-RNA isoliert und nach reverser Transkription mit Oligo dT-Primer der PTHR1 durch eine 'nested' PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel aufgetrennt (Abb. 7). Der PTHR Rezeptor Typ 1 wird in allen untersuchten Zellen exprimiert. Dendritische Zellen wurden von Dr. Kämpgen, Hautklinik, HEK-293 Zellen von Dr. Blind, Medizinische Klinik, beide Würzburg zur Verfügung gestellt (Blind *et al.*, 1995; John *et al.*, 1999; Thurner *et al.*, 1999).

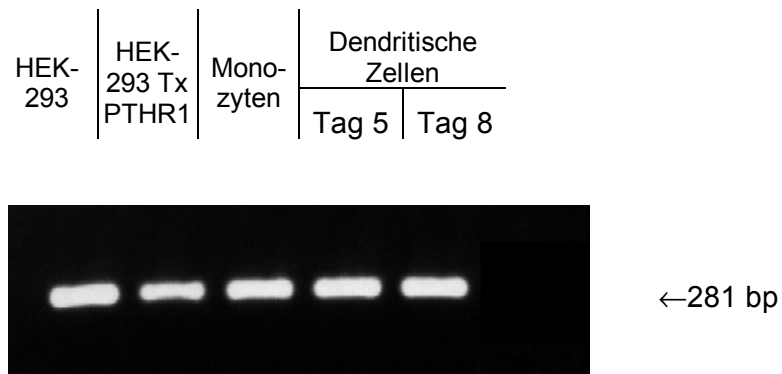


Abb. 7: PCR-Nachweis des PTH Rezeptors Typ 1 in humanen embryonalen Nierenzellen HEK-293 und HEK-293 Tx PTHR1 sowie Dendritischen Zellen Tag 5 und 8 im Agarosegel.

## 1.1.2 Klonierung der 1 $\alpha$ -Hydroxylase und des PTH Rezeptors Typ 1

Aus humaner Nieren wurde Gesamt-RNA isoliert und mit einem Oligo dT-Primer revers transkribiert. 1  $\mu$ l der cDNA Reaktion wurde für eine PCR-Amplifikation eingesetzt.

### 1.1.2.1 1 $\alpha$ -Hydroxylase cDNA

Die kodierende Sequenz der 1 $\alpha$ -Hydroxylase wurde aus Nieren cDNA mit den Primern 1 $\alpha$ 3 und 1 $\alpha$ 4 amplifiziert und die PCR Reaktion im Agarosegel aufgetrennt. Die schwache Bande wurde aus dem Gel eluiert, reamplifiziert und anschließend in die EcoRI-Schnittstelle des pCRII-Vektors (Invitrogen, 3,9 kb) kloniert. Um die Sequenz der klonierten Bande zu überprüfen wurde das Insert von beiden Seiten sequenziert. Die Klonierungs und Sequenzierarbeiten wurden von Dr. J. Seufert durchgeführt und ergaben eine 100 %ige Übereinstimmung mit der publizierten Sequenz (Genbank-Nummer AB005038, cDNA bp 111-1657). Abb. 8 zeigt ein Agarosegel des 1 $\alpha$ -Hydroxylase PCR Produktes nach Reamplifikation.

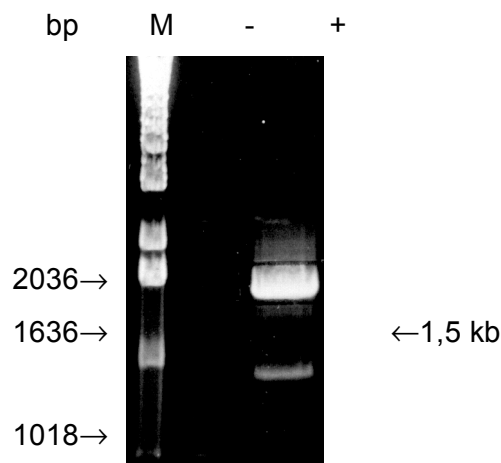


Abb. 8: **Reamplifikation der cDNA der humanen 1 $\alpha$ -Hydroxylase.** Aus Nieren Gesamt-RNA wurde eine cDNA unter Verwendung des Primers 1 $\alpha$ 4 synthetisiert und mit Hilfe der Primer 1 $\alpha$ 3 und 1 $\alpha$ 4 die cDNA der 1 $\alpha$ -Hydroxylase amplifiziert. Die Bande wurde aus dem Gel eluiert und in den pCRII Vektor kloniert (M = 100 bp Marker, Life Technologies GmbH; - = ohne cDNA; + = mit cDNA).

Im Anschluss an die Klonierung der cDNA der humanen 1 $\alpha$ -Hydroxylase wurde die 1,5 kb kodierende Sequenz in die EcoRI-Schnittstelle des Expressionsvektors pcDNA<sub>3</sub> (5,4 kb,

---

### 1.1.2.2 PTH-Rezeptor Typ 1 Fragment

Ein 374 bp Fragment des humanen PTH Rezeptors Typ 1 wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer PTHR1 und PTHR2 aus Nieren cDNA amplifiziert. Nach einer Reamplifikation des PCR-Produktes mit den Primern PTHR3 und PTHR4 (281 bp Fragment, Abb. 9) wurde die Bande in den Vektor pBlueskript SKII+/EcoRV kloniert und anschließend zur Überprüfung der Sequenz mit den Primern M13 und M13reverse sequenziert. Die Sequenzierung ergab eine 100%ige Übereinstimmung mit der publizierten Sequenz (Genbank Nummer U17418, cDNA bp 634-915).

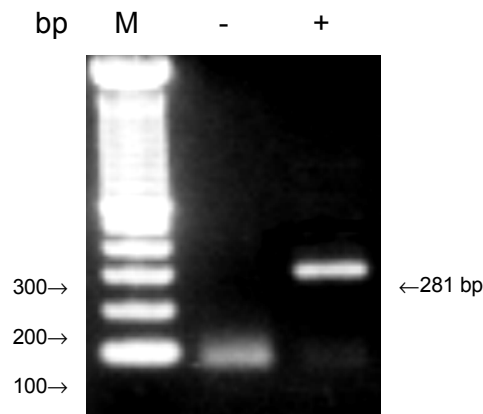


Abb. 9: **Reamplifikation eines 281 bp Fragmentes des humanen PTH Rezeptors Typ 1.** Gesamt-RNA aus Niere wurde isoliert und mit einem Oligo dT-Primer revers transkribiert. Nach einer PCR mit den Primern PTHR1 und PTHR2 wurde in einer nested PCR unter Verwendung der Primer PTHR3 und PTHR4 das 281 bp Fragment amplifiziert (M = 100 bp Marker, Life Technologies GmbH; - = ohne cDNA; + = mit cDNA).

### 1.1.3 Überexpression der $1\alpha$ -Hydroxylase in COS7-Zellen

#### 1.1.3.1 PCR-Nachweis der Transkription nach Transfektion

COS7 Zellen wurden mit einem  $1\alpha$ -Hydroxylase Überexpressions-Konstrukt (pcDNA<sub>3</sub> 1 $\alpha$ OHase+, Gen in sense-Richtung) oder dem leeren Vektor (pcDNA<sub>3</sub>) transfiziert. Aus den COS7 Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert und die mRNA mit einem Oligo dT-Primer und spezifisch mit Hilfe des Primers 1alpha4 revers transkribiert. Aus der cDNA wurde die  $1\alpha$ -Hydroxylase durch PCR unter Verwendung der Primer 1alpha5 und 1alpha6, die ein 460 bp Fragment liefern, amplifiziert. Das Ergebnis der PCR ist in Abb. 10 dargestellt. Das

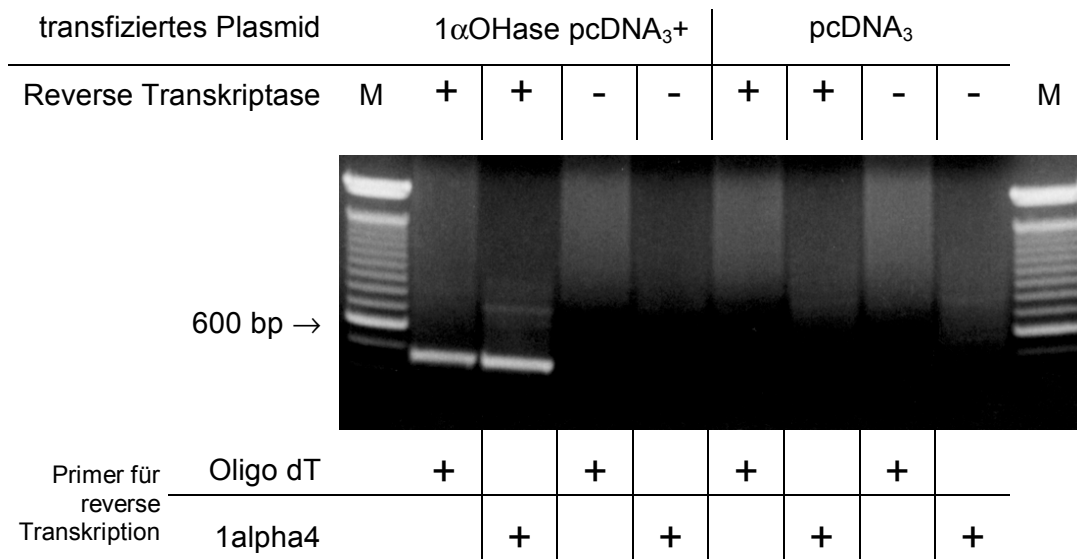


Abb. 10: **Kontrolle der Transkription des pcDNA<sub>3</sub> 1 $\alpha$ OHase+ Konstruktes nach Transfektion in COS7-Zellen** durch reverse Transkription und PCR. COS7-Zellen wurden mit dem Überexpressionsplasmid für die humane 1 $\alpha$ -Hydroxylase pcDNA<sub>3</sub> 1 $\alpha$ OHase+ (Gen in sense-Richtung) und dem leeren Vektor pcDNA<sub>3</sub> transfiziert. Aus der Gesamt-RNA wurde unter Verwendung der Primer Oligo dT und 1alpha4 eine cDNA transkribiert aus der die 1 $\alpha$ -Hydroxylase durch PCR amplifiziert wurde. M = 100 bp Marker.

#### 1.1.4 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> Radioimmunoassay (RIA)

##### 1.1.4.1 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> Produktion in transfizierten COS7-Zellen

Das Überexpressionskonstrukt der 1 $\alpha$ -Hydroxylase pcDNA<sub>3</sub> 1 $\alpha$ OHase+ wurde in COS7 Zellen transfiziert. Als Kontrolle diente der leere Vektor pcDNA<sub>3</sub> und das antisense-Konstrukt pcDNA<sub>3</sub> 1 $\alpha$ OHase-. Die Zellen wurden mit 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> [10<sup>-7</sup> M] über Nacht supplementiert und der 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Gehalt des Mediums (in pg/ml) durch Radioimmunoassay unter Verwendung eines <sup>125</sup>I-markierten 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> ermittelt (Abb. 11). Wird das Überexpressionsplasmid pcDNA<sub>3</sub> 1 $\alpha$ OHase+ in COS7-Zellen transfiziert, liegt der 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Gehalt des Mediums nach 24 h bei knapp 1000 pg/ml. In untransfizierten bzw. mit Kontrollplasmid transfizierten Zellen liegt die 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Konzentration des Mediums deutlich unter 200 pg/ml.

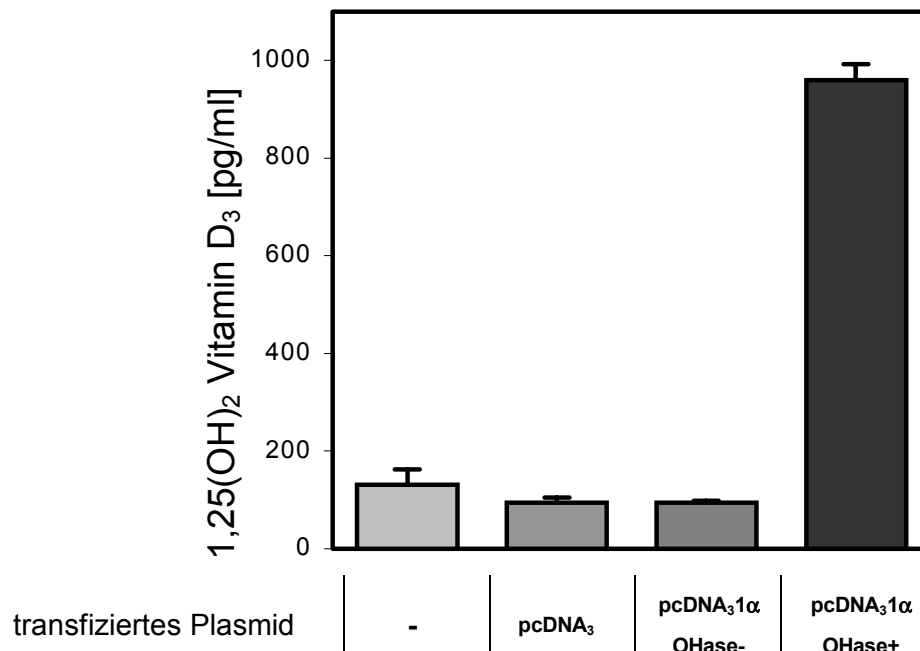
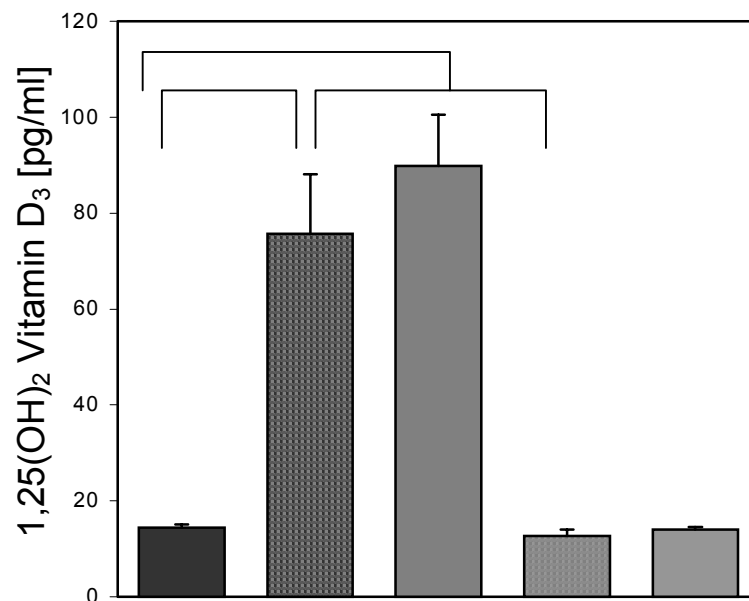


Abb. 11: Radioimmunoassay - 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Produktion von COS7 Zellen nach Transfektion des 1α-Hydroxylase Überexpressionskonstruktes pcDNA<sub>3</sub>1αOHase+. Als Kontrolle dient das Konstrukt pcDNA<sub>3</sub>1αOHase- und der leere Vektor pcDNA<sub>3</sub>. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM (n=2).

#### 1.1.4.2 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> Produktion in Monozyten

Periphere Blutmonozyten wurden über Nacht mit 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> [10<sup>-7</sup> M], PTH [10<sup>-8</sup> M] und Ketoconazol [15 × 10<sup>-6</sup> M] (1-Acetyl-4-(4-[[2-(2,4-dichlorphenyl)-2-(1-imidazolylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy}phenyl)piperazin) behandelt und der 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Gehalt des Mediums durch Radioimmunoassay bestimmt (Abb. 12). Alleine durch Supplementierung des Mediums mit dem Substrat der 1α-Hydroxylase (25(OH) Vitamin D<sub>3</sub>) wird die Produktion von 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> von 14,4 pg/ml auf 75,6 pg/ml signifikant gesteigert. Durch Parathormon wird eine weitere Stimulation auf 89,8 pg/ml erreicht. Eine Behandlung der Monozyten mit dem p450 Enzym-Inhibitor Ketoconazol zieht eine signifikante Verringerung der 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Produktion auf 12,7 pg/ml nach sich. Die Inkubation der 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub>-supplementierten und Ketoconazol-behandelten peripheren Blutmonozyten mit PTH hatte keinen Einfluss auf die 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Konzentration des Mediums im Vergleich zu Kontrollzellen zur Folge.





25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> [10<sup>-7</sup> M]

PTH [10<sup>-8</sup> M]

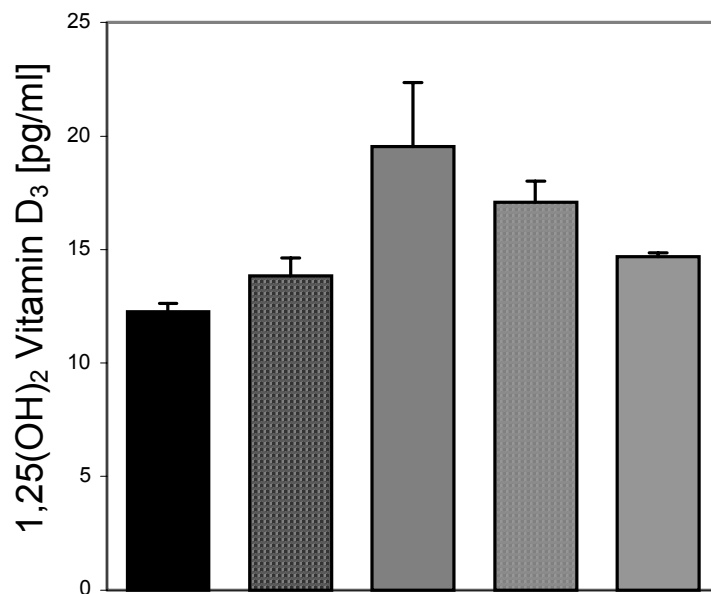
Ketoconazol [15 x 10<sup>-6</sup> M]

	+	+	+	+
		+		+
			+	+

Abb. 12: **Radioimmunoassay - 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Produktion von Monozyten.** Monozyten wurden über Nacht mit 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> inkubiert und wie folgt für 16 h stimuliert: PTH [10<sup>-8</sup> M], Ketoconazol [15 x 10<sup>-6</sup> M], PTH und Ketoconazol. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM (n=3). Statistisch signifikante Unterschiede (Wilcoxon-Test) sind als \* angegeben. \*:p < 0,05.

#### 1.1.4.3 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Produktion in THP1-Zellen

THP1-Zellen wurden über Nacht mit 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> [10<sup>-7</sup> M], PTH [10<sup>-8</sup> M] und Ketoconazol [15 x 10<sup>-6</sup> M] behandelt und der 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Gehalt des Mediums durch Radioimmunoassay bestimmt (Abb. 13). Durch Supplementation des Mediums mit dem Substrat der 1α-Hydroxylase 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> wird die Produktion von 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> nur leicht von 12,3 pg/ml auf 13,9 pg/ml gesteigert. Durch Parathormon wird eine weitere Stimulation auf 19,5 pg/ml erreicht. Eine Behandlung der THP1-Zellen mit dem p450 Enzym-Inhibitor Ketoconazol und einer Supplementation mit 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> zieht keine Verringerung der 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Produktion nach sich im Vergleich zu 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub>-behandelten Zellen.



25(OH) Vitamin D <sub>3</sub> [10 <sup>-7</sup> M]		+	+	+	+
PTH [10 <sup>-8</sup> M]			+		+
Ketoconazol [15 x 10 <sup>-6</sup> M]				+	+

Abb. 13: Radioimmunoassay - **1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> Produktion von THP1-Zellen**. THP1-Zellen wurden über Nacht mit 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> inkubiert und wie folgt für 16 h stimuliert: PTH [10<sup>-8</sup> M], Ketoconazol [15 x 10<sup>-6</sup> M], PTH und Ketoconazol. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM (n=3). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Wilcoxon-Test).

---

## 1.1.5 Bindungsnachweis von PTHrP an den PTH Rezeptor Typ 1

### 1.1.5.1 Von Monozyten und embryonalen Nierenzellen

Periphere Blutmonozyten (PBM), HEK-293 und HEK-293 Tx PTHR1 Zellen wurden mit PTHrP-Cy3.5 und einem CD14-FITC markierten Antikörper angefärbt und fotografiert (Abb. 14). Die linke Seite der Abbildung zeigt dieselbe Zelle, beide fluoreszierenden Farbstoffe binden an die Zellmembran in Clustern. HEK-293 Tx-PTHR1 Zellen zeigen ein ähnliches intensives Färbungsmuster, während native HEK-293 Zellen nur schwach gefärbt werden.

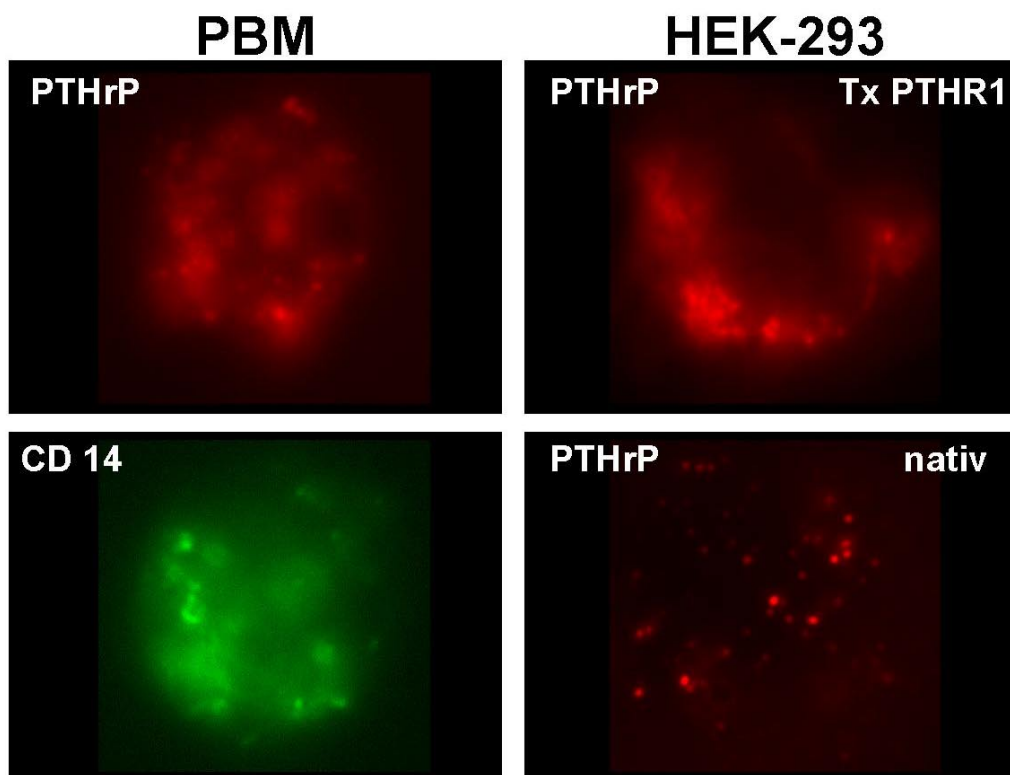


Abb. 14: Färbung von PBM (links) und HEK-293 Zellen (rechts) mit PTHrP-Cy3.5. Zur Kontrolle wurden PBM mit einem FITC-markierten CD14 Antikörper inkubiert. Es handelt sich hierbei um eine Zelle, die mit Filtern für unterschiedliche Wellenlängen fotografiert wurde.

---

### 1.1.5.2 Von Dendritischen Zellen

Dendritische Zellen wurden mit PTHrP-Cy3.5, DAPI (färbt spezifisch DNA) und einem FITC-markierten CD45 Antikörper angefärbt. In Abb. 15 sind die einzelnen Zellfärbungen dargestellt. Im oberen und unteren Teil des Bildes handelt es sich jeweils um dieselbe Zelle. Im oberen Teil der Abbildung färbt PTHrP-Cy3.5 den mit DAPI gefärbten Zellkern an, im unteren Teil der Abbildung wurde die Zellmembran mit dem FITC-markierten CD45 Antikörper sichtbar gemacht. Der Zellkern liegt fragmentiert vor (DAPI Färbung), die PTHrP-Cy3.5 Färbung markiert identische Regionen.

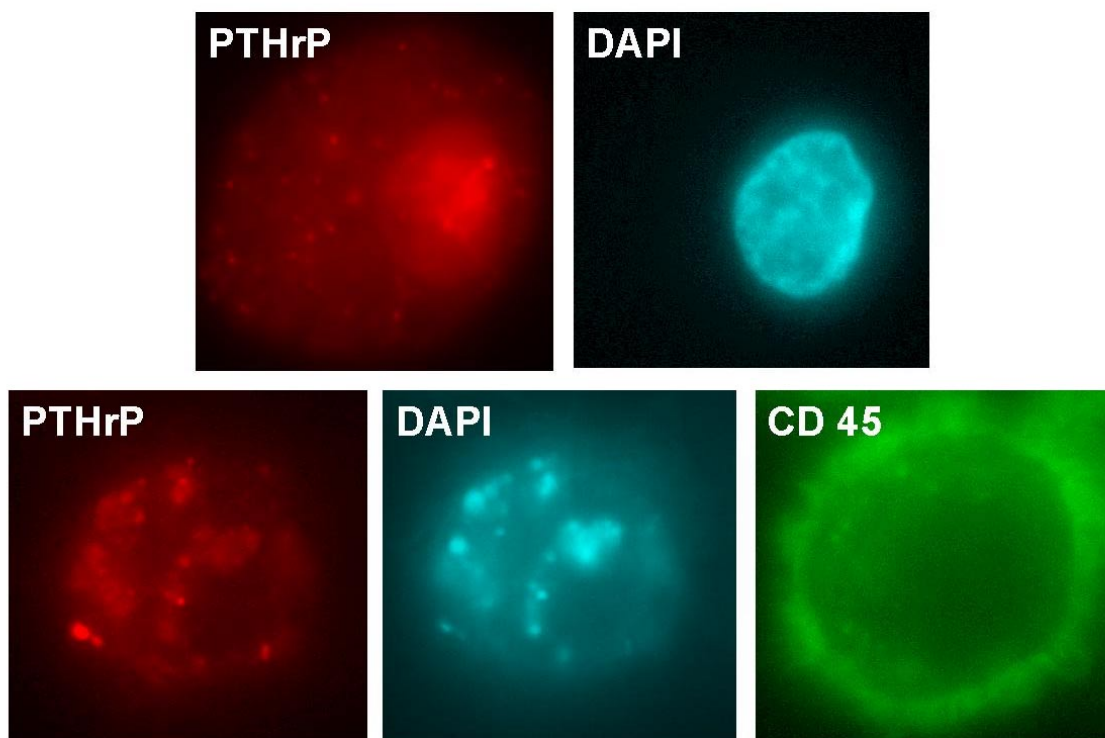


Abb. 15: Färbung von Dendritischen Zellen mit PTHrP-Cy3.5, DAPI und einem FITC-markierten CD45 Antikörper. In einer Reihe befinden sich jeweils identische Zellen.

### 1.2 24-Hydroxylase: mRNA-Expression

Die Expression der 24-Hydroxylase wird nach 3 d 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Differenzierung (10<sup>-7</sup> M) und anschließender GM-CSF/M-CSF-Stimulation (jeweils 0,5 ng/ml) bereits nach 1 h

detektiert werden (Abb. 16, Spur 2). Die 24-Hydroxylase wird in Makrophagen nach 12 h GMCSF-Behandlung stärker exprimiert als nach 1 h (Spur 3 und 4), nach 24 h ist das Signal ebenfalls schwächer (Spur 5). Differenzierung von THP1-Zellen zu Osteoklasten durch MCSF-Behandlung bewirkt eine stärkere Expression der 24-Hydroxylase nach 8 h (Spur 8), das Signal wird nach 12 und 24 h schwächer (Spur 9 und 10).

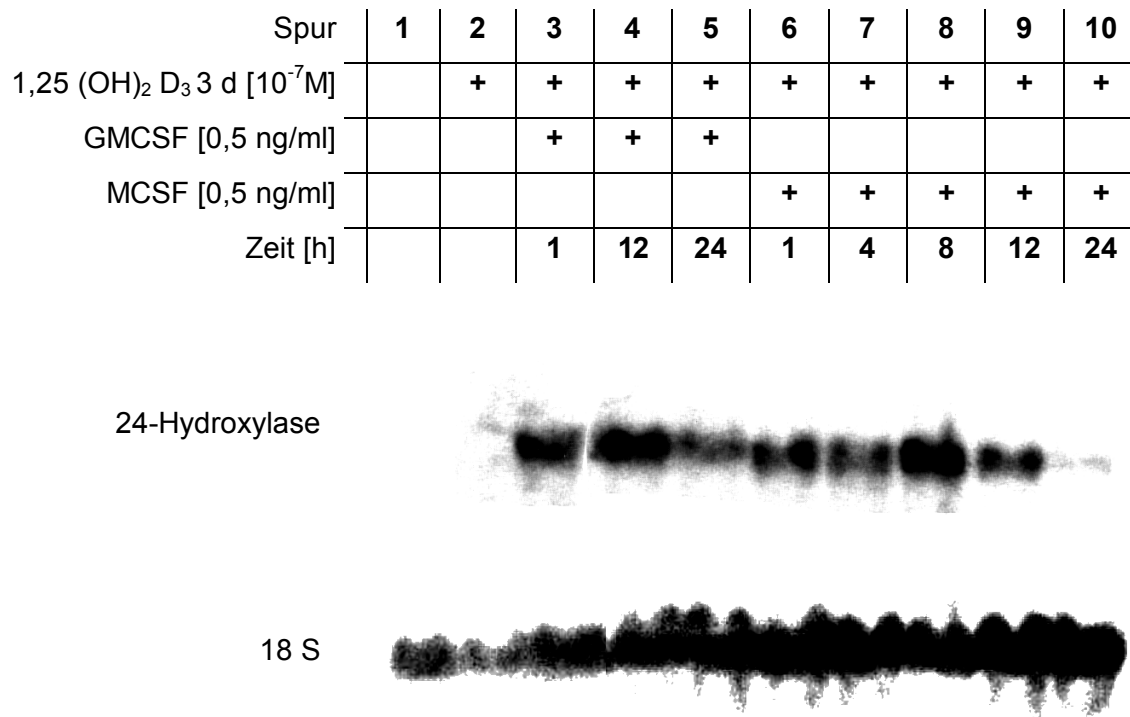


Abb. 16: **Effekt von 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>, GMCSF und MCSF auf die 24-Hydroxylase-Expression in THP1-Zellen** (Gesamt RNA). Als Kontrolle wurde mit einer Sonde für 18 S hybridisiert. In zu Makrophagen differenzierten THP1-Zellen wird die 24-Hydroxylase am stärksten nach 12 h GMCSF-Behandlung exprimiert. Nach 8 h MCSF-Stimulation ist das detektierte Signal in zu Osteoklasten differenzierten THP1-Zellen maximal.

### 1.3 Osteopontin

#### 1.3.1 mRNA-Expression

Osteopontin ist ein Matrixprotein mit einem RGD-Motiv in der Aminosäuresequenz, das an  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin binden kann und somit wesentlich an der Zelladhäsion beteiligt ist. Im Northern Blot wurde für Osteopontin eine differenzielle Expression in unterschiedlich stimulierten THP1-Zellen nachgewiesen. Abb. 17 zeigt die entsprechende Hybridisierung

$10^{-7}$  M  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  für 3 d und anschließender Stimulation mit 0,5 ng/ml GMCSF für 1 bis 24 h zu Makrophagen ist ein Anstieg der Osteopontin mRNA zu beobachten (Spur 3-7). In Kontrollzellen wird die mRNA nicht exprimiert, was gegen das Signal nach 3 d  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -Behandlung und 4 bis 24 h GMCSF-Stimulation stetig ansteigt. Die Behandlung der mit  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  differenzierten Zellen mit 0,5 ng/ml MCSF für 1 bis 24 h welche zur Osteoklastendifferenzierung führt, bewirkte ebenfalls einen Anstieg der detektierten mRNA Menge (Spur 8-12).

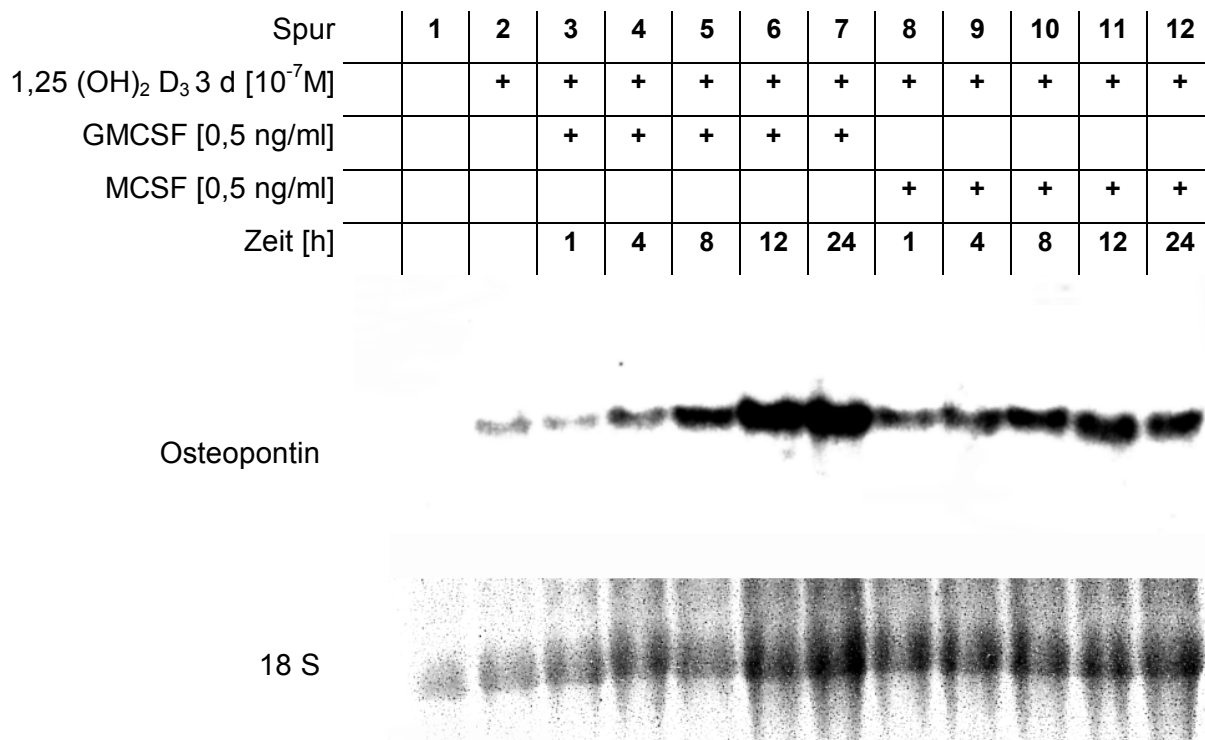


Abb. 17: **Effekt von  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ , GMCSF und MCSF auf die Osteopontin mRNA-Menge in THP1-Zellen** im Northern Blot (Gesamt RNA) im Vergleich zur 18 S Bande des Ethidiumbromidgels. THP1-Zellen wurden mit  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  und GMCSF einerseits zu Makrophagen, mit  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  und MCSF andererseits zu Osteoklasten differenziert. In Makrophagen wird Osteopontin am stärksten nach 24 h GMCSF-Stimulation exprimiert. In Osteoklasten wird Osteopontin am stärksten nach 12 bis 24 h MCSF-Behandlung exprimiert.

### 1.3.2 Immunhistochemischer Nachweis von Osteopontin

Auf Schnittten von Lebergranulomen, Morbus Crohn-Gewebe und Knochenpräparaten wurde durch einen immunhistochemischen Nachweis die Expression von Osteopontin auf Proteinebene untersucht. Abb. 18 zeigt die jeweiligen Schnittmitten mit den zugehörigen Kontrollen (1=Kontrolle; 2= Osteopontinfärbung; A= Morbus Crohn; B=Knochen; C=Lebergranulom). Osteopontin wird in allen untersuchten Geweben, erkennbar durch eine Braunfärbung, exprimiert.

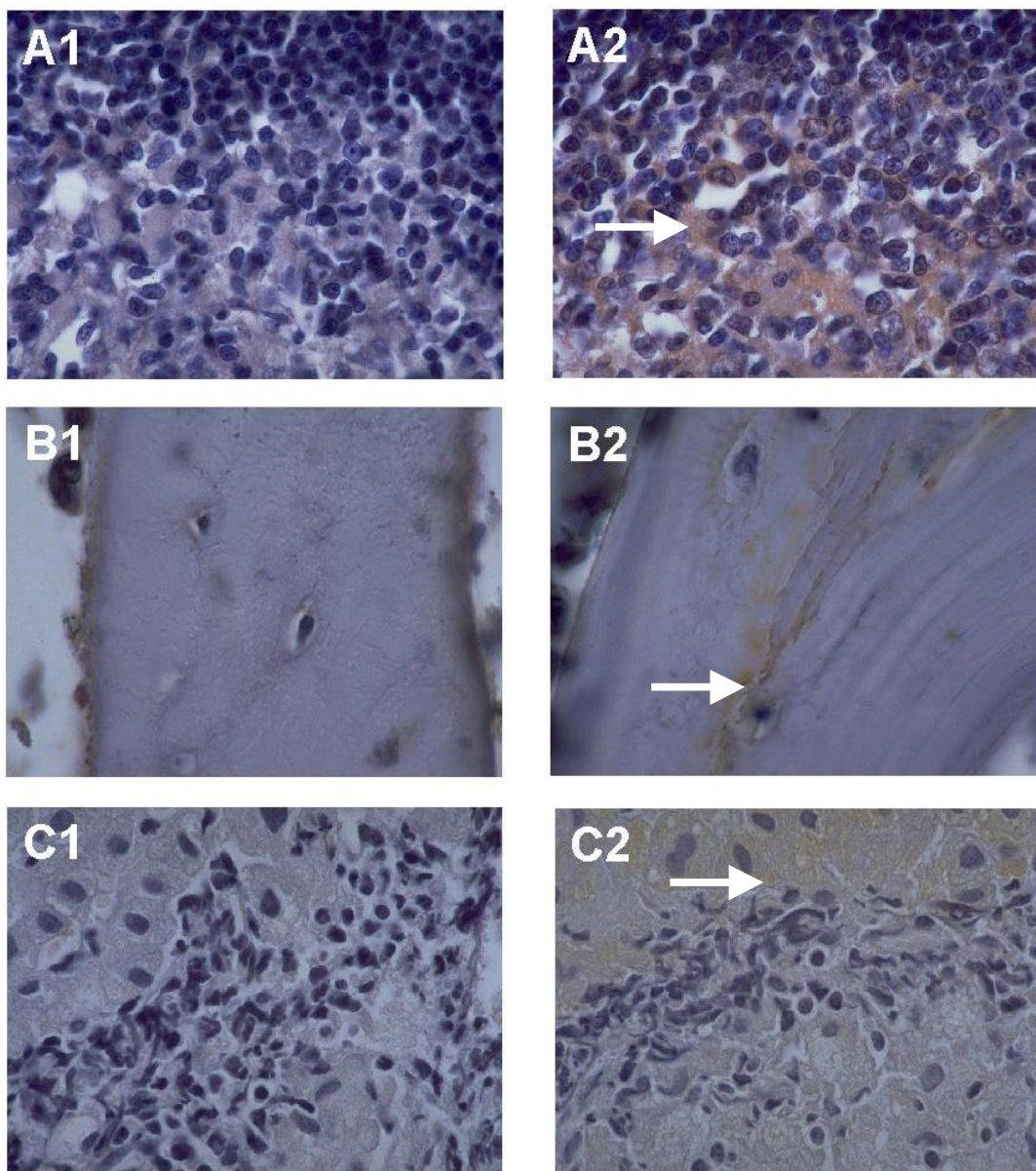


Abb. 18: **Immunhistochemischer Nachweis von Osteopontin** in Morbus Crohn-Gewebe, Knochenpräparaten und Lebergranulomen (1=Kontrolle; 2=Osteopontinfärbung; A=Morbus Crohn; B=Knochen; C=Lebergranulom).

## 1.4 Selenoprotein Thioredoxin Reduktase 1 (TR1)

### 1.4.1 mRNA-Expression

#### 1.4.1.1 In undifferenzierten THP1-Zellen

THP1-Zellen wurden 0,5 bis 16 h mit  $10^{-7}$  M  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  stimuliert und die Gesamt-RNA isoliert. Die Expression der TR1 wurde im Northern Blot untersucht. Zur Kontrolle wurde der Blot mit GAPDH hybridisiert. Bereits nach 0,5 h  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -Behandlung wird die TR1 in THP1-Zellen stärker exprimiert als in Kontrollzellen, nach 4 h ist die mRNA-Menge maximal und bleibt bis 16 h unverändert (Abb. 19).

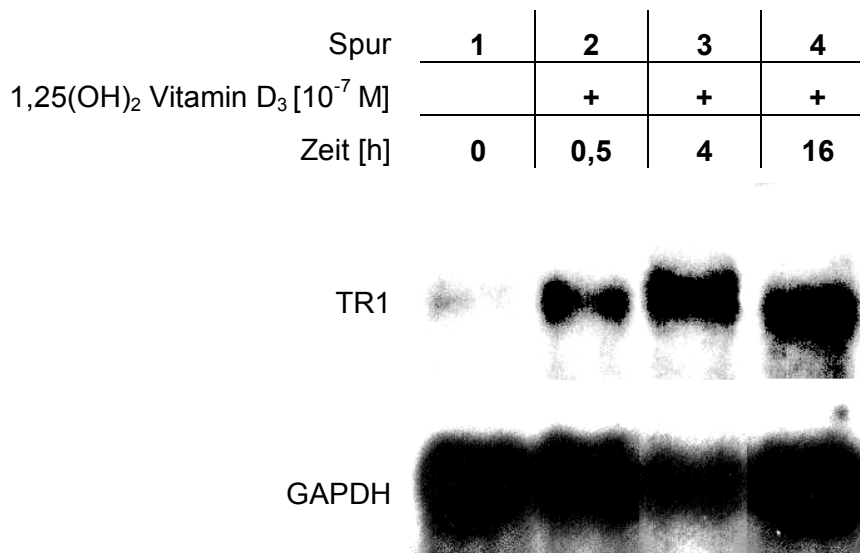


Abb. 19: **Effekt von  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  auf die TR1-Expression in THP1-Zellen im Northern Blot** (Gesamt RNA). THP1-Zellen wurden für 0, 0,5, 4 und 16 h mit  $10^{-7}$  M  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  behandelt. Als Kontrolle wurde mit einer Sonde für GAPDH hybridisiert.

#### 1.4.1.2 In differenzierten THP1-Zellen

Abb. 20 zeigt die Expression der TR1 im Northern Blot im Vergleich zur 18 S Bande des Ethidiumbromidgeles in zu Makrophagen und Osteoklasten differenzierten THP1-Zellen. Es ist deutlich ein Anstieg der mRNA-Expression für TR1 in  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -differenzierten THP1-Zellen nach GM-CSF Stimulation (0,5 ng/ml) zu beobachten (Spur 4). 1 h GM-CSF Behandlung nach  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  Differenzierung (Spur 3) hat noch keinen Anstieg der mRNA Konzentration im Vergleich zu differenzierten Kontrollzellen zur Folge



3 d mit 0,5 ng/ml MCSF für 1 bis 24 h in Richtung Osteoklasten stimuliert (Spur 8-12), zeigt sich ein ähnliches Muster in der TR1 Expression. Nach 4 h MCSF (Spur 9) ist das Signal am stärksten. Undifferenzierte THP1-Zellen exprimieren TR1 schwächer im Vergleich zu differenzierten Zellen (Spur 1 und 2).

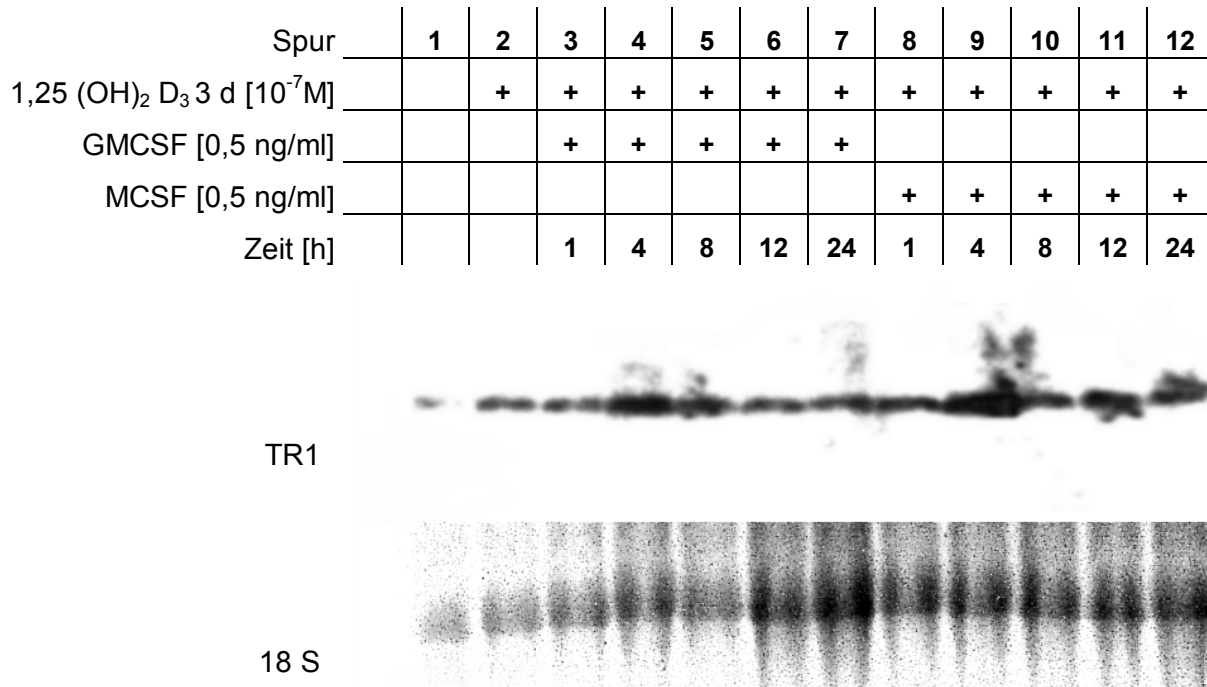


Abb. 20: **Effekt von 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>, GMCSF und MCSF auf die TR1 mRNA-Menge in THP1-Zellen** im Northern Blot (Gesamt RNA) im Vergleich zur 18 S Bande des Ethidiumbromidgels. THP1-Zellen wurden mit 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> und GMCSF einerseits zu Makrophagen, mit 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> und MCSF andererseits zu Osteoklasten differenziert. In Makrophagen wird TR1 am stärksten nach 4 h GMCSF-Stimulation exprimiert. In Osteoklasten wird TR1 am stärksten nach 4 h MCSF-Behandlung exprimiert.

## 1.4.2 TR -Aktivitätsmessungen

### 1.4.2.1 Selenitabhängige Aktivitätssteigerung in THP1-Zellen

THP1-Zellen wurden in 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen für 1-8 Tage mit 100 nM Na-Selenit kultiviert und zur Bestimmung der TR-Aktivität zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Abb. 21 zeigt die TR-Aktivität der THP1 Zelllysate in Abhängigkeit von der Zeit. Die TR-Aktivität erreicht nach 4 d Na-Selenitbehandlung ein Plateau von 3,2 mU/mg Protein. In nicht-supplementierten Kontrollzellen lag die Aktivität nach 8 Tagen bei 1,8 mU/mg Protein.

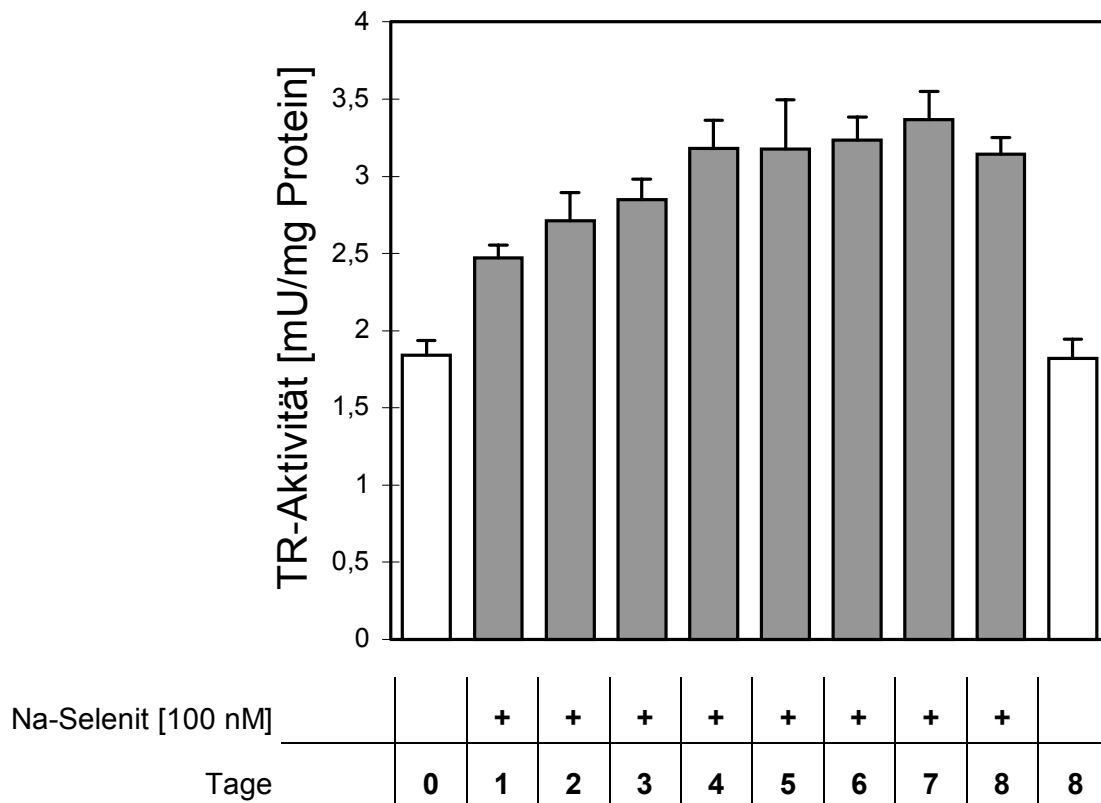


Abb. 21: **Einfluss von Na-Selenit auf die TR-Aktivität in THP1-Zellen** nach 1-8 Tagen Na-Selenitbehandlung. THP1-Zellen wurden für 1-8 d mit Na-Selenit behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Die TR-Aktivität erreicht nach 4 d ein Plateau von 3,2 mU/mg Protein. In unbehandelten Kontrollzellen liegt die TR-Aktivität nach 8 Tagen unverändert bei 1,8 mU/mg Protein. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, (n=3).

### 1.4.2.2 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-abhängige Aktivitätssteigerung in THP1-Zellen

THP1-Zellen wurden für 8 bis 96 h sowohl unter Normalbedingungen als auch unter Selenitsupplementation mit 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> stimuliert und die TR-Aktivität gemessen (Abb. 22). Bei einer Selenitkonzentration von 100 nM steigt die TR-Aktivität nach 24 h 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Gabe von 5,5 (Kontrolle) auf 8,1 mU/mg Protein an und sinkt nach 96 h auf unter 5 mU/mg Protein. Unter Normalbedingungen kann die TR-Aktivität von basal 3 mU/mg Protein durch 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> auf etwa 5 mU/mg Protein gesteigert werden.

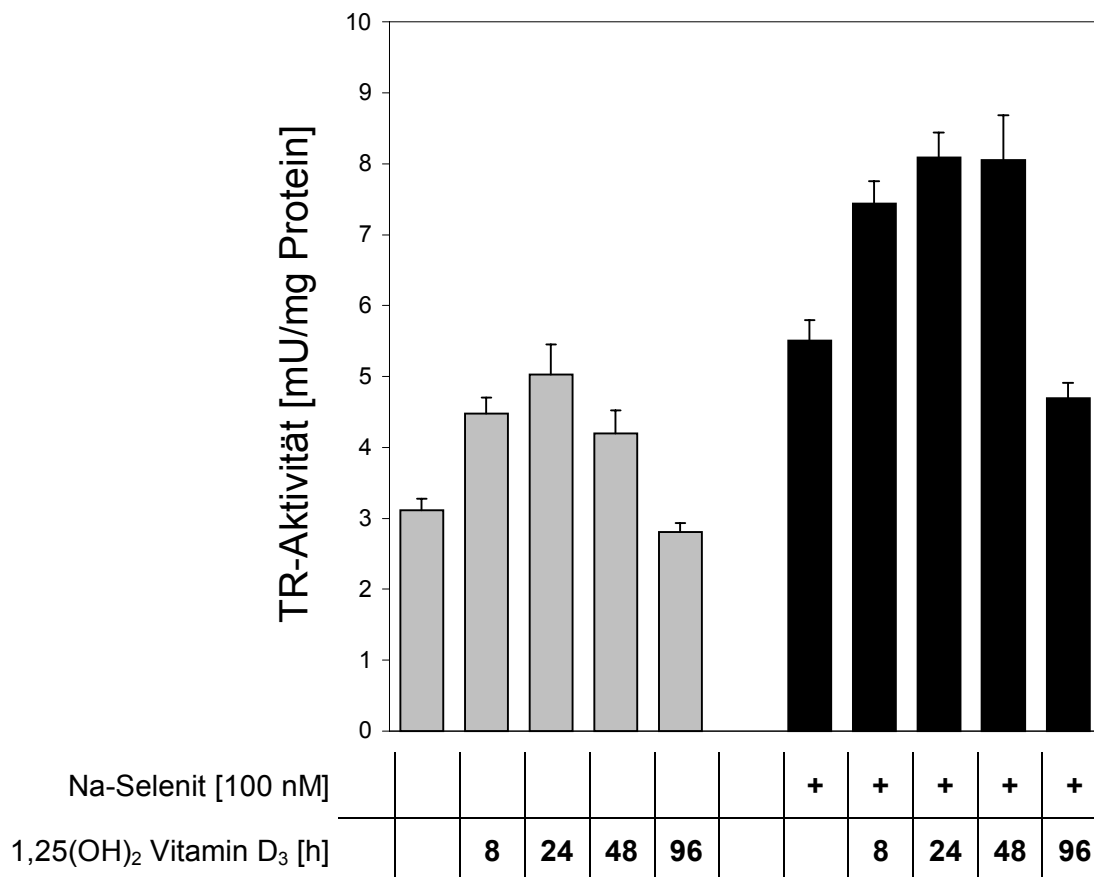
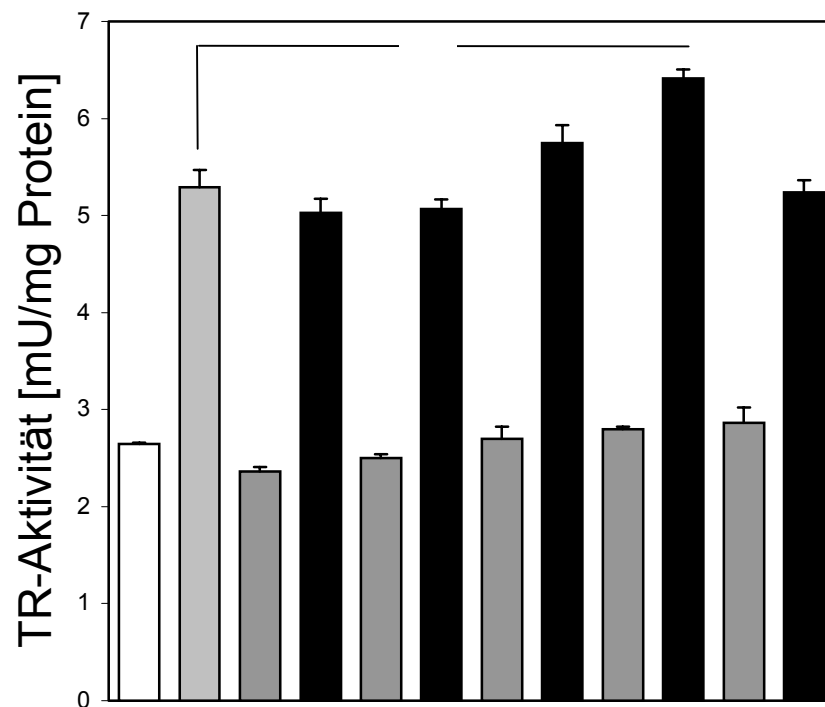


Abb. 22: **Effekt von Na-Selenit und 1, 25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> auf die TR -Aktivität in THP1-Zellen.** Nach Selenitsupplementation steigt die TR-Aktivität von basal 5,5 mU/mg Protein auf 8,1 mU/mg Protein nach 24 h 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Behandlung und fällt danach auf 4,5 mU/mg Protein ab. Ohne Selenit steigt die TR-Aktivität von basal 3 mU/mg Protein nach 8 stündiger 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Behandlung auf 5 mU/mg Protein an und fällt nach 96 h auf 2,8 mU/mg Protein ab. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM (n=3).

### 1.4.2.3 TR -Aktivität in differenzierten THP1-Zellen

Die TR-Aktivität wurde in Zellen, die mit und ohne Na-Selenit kultiviert wurden, gemessen. Nach 3 d  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -Differenzierung wurden die Zellen für 1 bis 24 h mit jeweils 0,5 ng/ml GMCSF bzw. MCSF stimuliert ( Abb. 23 und Abb. 24) . Nach 12- stündiger Stimulation der unter Selenitsupplementation gezogenen, differenzierten Zellen mit GMCSF war die TR-Aktivität von 5,3 mU/mg Protein signifikant um 21 % auf 6,4 mU/mg Protein im Vergleich zu differenzierten, unstimulierten Zellen erhöht. Eine kürzere oder längere Stimulation mit GMCSF hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die TR-Aktivität zur Folge. Wurden die Zellen ohne Selenit kultiviert, zeigte sich eine fast konstante TR-Aktivität von unter 3 mU/mg Protein, unabhängig von der Stimulationsdauer.

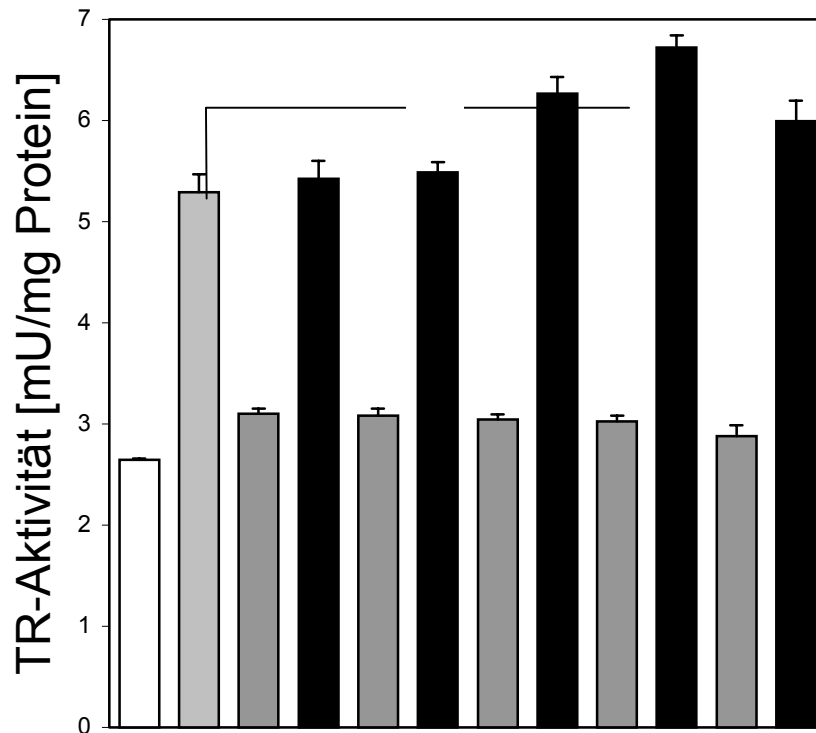


Na-Selenit	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin D <sub>3</sub> 3 d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GMCSF 0,5 ng/ml [h]			1	1	4	4	8	8	12	12	24	24

Abb. 23: Effekt von GMCSF auf die TR-Aktivität von  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -differenzierten THP1-Zellen, unter Normalbedingungen und Selenitsupplementation. Die TR-Aktivität lässt sich in selenitsupplementierten Zellen durch 12-stündige GMCSF-Stimulation um 21 % von 5,3 mU/mg Protein auf 6,4 mU/mg Protein steigern. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=3). Statistisch signifikante Unterschiede sind als \* angegeben.

\*:p < 0,05.

Nach MCSF-Stimulation der Zellen verhielt sich die TR-Aktivität ähnlich wie nach GMCSF-Stimulation. Nach 12-stündiger MCSF-Behandlung zeigte sich ein Aktivitätspeak bei 6,7 mU/mg Protein, eine signifikante Stimulation um 27 % im Vergleich zur Aktivität der differenzierten, unstimulierten Zellen (Student's T-Test).



Na-Selenit	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin D <sub>3</sub> 3 d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MCSF 0,5 ng/ml [h]			1	1	4	4	8	8	12	12	24	24

Abb. 24: Effekt von MCSF auf die TR-Aktivität von 1, 25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-differenzierten THP1-Zellen, unter Normalbedingungen und Selenitsupplementation. Die TR-Aktivität lässt sich in selenitsupplementierten Zellen durch 12-stündige MCSF-Stimulation um 27 % auf 6,7 mU/mg Protein steigern. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SEM (n=3). Statistisch signifikante Unterschiede sind als \* angegeben. \*p < 0,05.

#### 1.4.2.4 TR-Hemmung durch Aurothioglucose in THP1-Zellen

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob die Aktivität der Thioredoxin-Reduktase mit unterschiedlichen Konzentrationen des Hemmstoffes Aurothioglucose (ATG) inhibiert werden kann (Abb. 25). Selenitsupplementierte THP1-Zellen wurden für 2 d mit  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  differenziert, mit MCSF für 24 h stimuliert und anschließend für 60 min mit unterschiedlichen Konzentrationen an ATG behandelt. Ab einer ATG-Konzentration von  $50 \mu\text{M}$  konnte die TR-Aktivität gehemmt werden. Wurde jedoch ATG zusätzlich in den Reaktionsansatz pipettiert (Konzentration im Kulturmedium  $20 \mu\text{M}$ , im TR-Ansatz  $50 \mu\text{M}$ ), wurde die TR-Aktivität um über 50 % gehemmt.

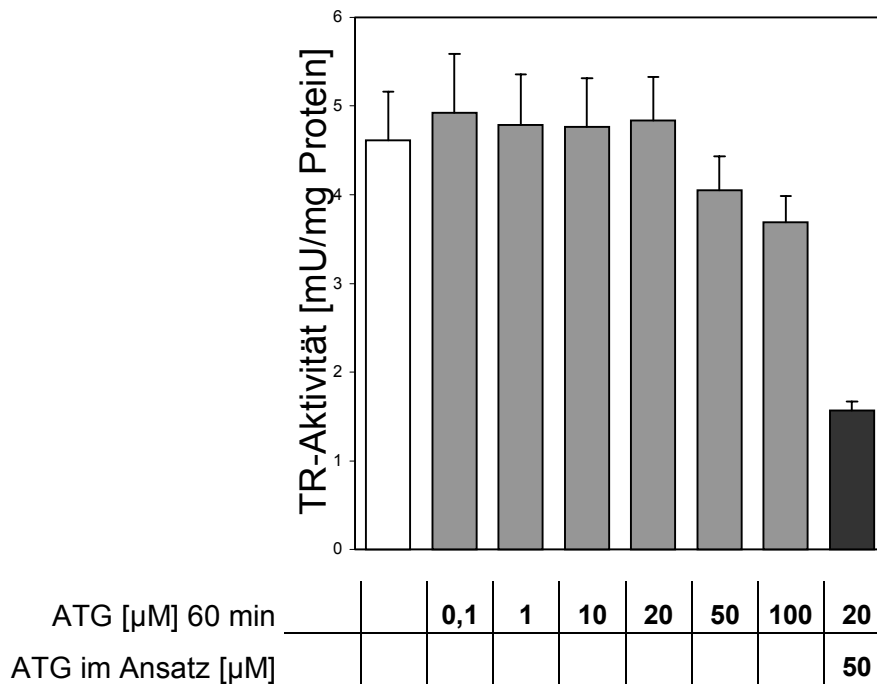


Abb. 25: **Effekt von Aurothioglucose (ATG) auf die TR-Aktivität von  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -differenzierten und mit MCSF für 24 h stimulierten THP1-Zellen.** Die stärkste Hemmung der TR wird erzielt durch Zusatz des Hemmers ATG im Reaktionsansatz. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=3).

#### 1.4.2.5 TR -Aktivität in peripheren Blutmonozyten

Monozyten wurden aus peripherem Blut isoliert und für 4 h in Kulturflaschen gezüchtet. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  für weitere 4 h. In einem weiteren Experiment wurden periphere Blutmonozyten für 24 h mit  $100 \text{ nM}$  Na-Selenit

Aktivitätsmessung geerntet. Die Monozytenisolierung, Stimulation und Ernte wurde von Dr. M. Kreuzt, Abteilung für Hämatologie und internistische Onkologie, Universität Regensburg durchgeführt.

Frisch isolierte periphere Blutmonozyten (PBM) besitzen eine niedrige TR-Aktivität, die 4 h nach Kultivierung und Adhäsion an die Kulturschale von basal 2.5-5 mU/mg Protein nach 4 h um 25 % und nach 24 h um 100 % gesteigert werden kann (Abb. 26 A). Na-Selenit-supplementierte Monozyten haben eine gesteigerte TR-Enzymaktivität nach 24 h, die durch 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> weiter stimuliert werden kann (Abb. 26 B).

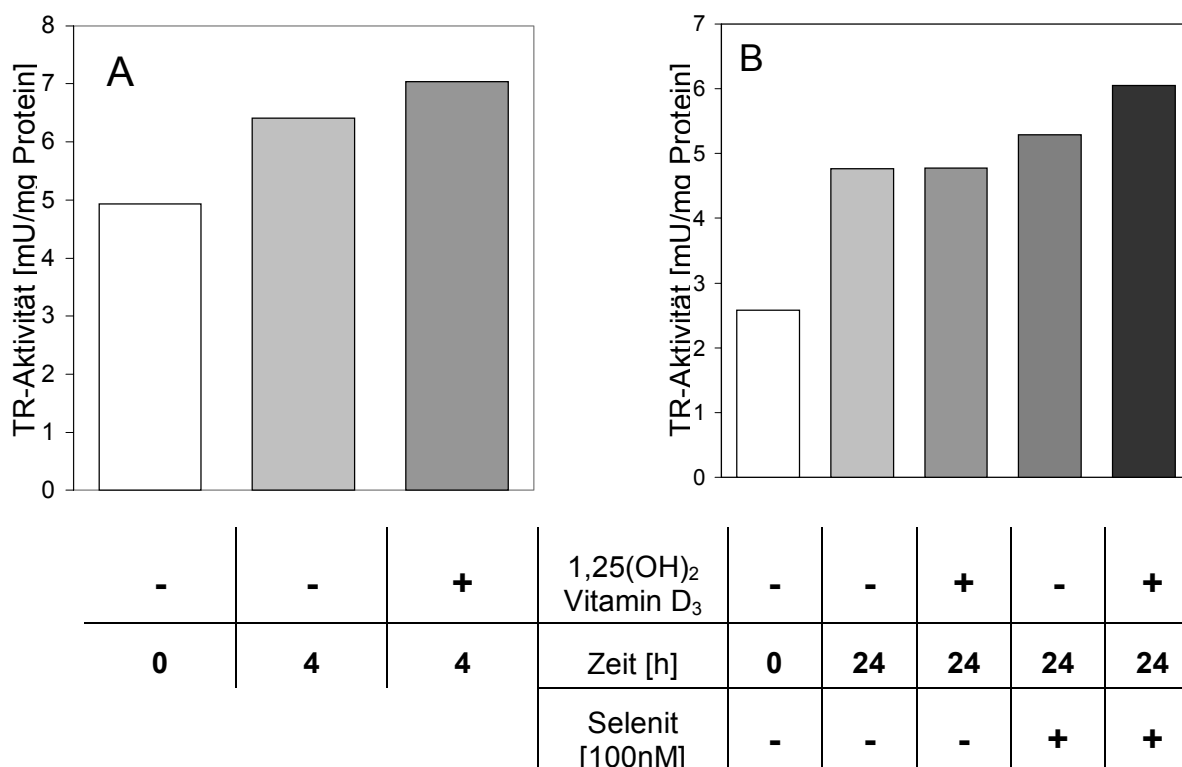


Abb. 26: Einfluss von 1, 25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> und Selenit auf die TR-Enzymaktivität in peripheren Blutmonozyten. Die Zellen wurden mit 1, 25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> (A) und mit 1, 25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> (10<sup>-7</sup> M) und Na-Selenit (100 nM) (B) behandelt und die Enzymaktivität bestimmt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte zweier Messungen eines Einzelexperimentes.

### 1.4.3 Einfluss der TR1 auf die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren

#### 1.4.3.1 Aktivierung von AP1

Die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors AP1 unter Normalbedingungen und nach

Selenitkonzentration von 100 nM gezogen und für 1 h mit  $10^{-7}$  M  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  und 0,5 ng/ml GMCSF behandelt und die Aktivierung von AP1 untersucht. AP1 wird basal und nach 24 h  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -Stimulation nicht aktiviert. Nach gleichzeitiger Behandlung mit GMCSF für 24 h bzw. alleiniger GMCSF-Stimulation für 24 h zeigt sich sowohl eine AP1-Aktivierung unter Normalbedingungen als auch nach Selenitsupplementation (Spur 3 und 7, bzw. Spur 4 und 8, Abb. 27). Die Kultivierung der THP1-Zellen mit 100 nM Na-Selenit hat eine schwächere AP1-Aktivierung zur Folge. Zur Überprüfung der Spezifität der Protein-DNA-Bindung wurde mit einem 100-fachen Überschuss unmarkiertem Oligonukleotid kompetiert (Spur 9).

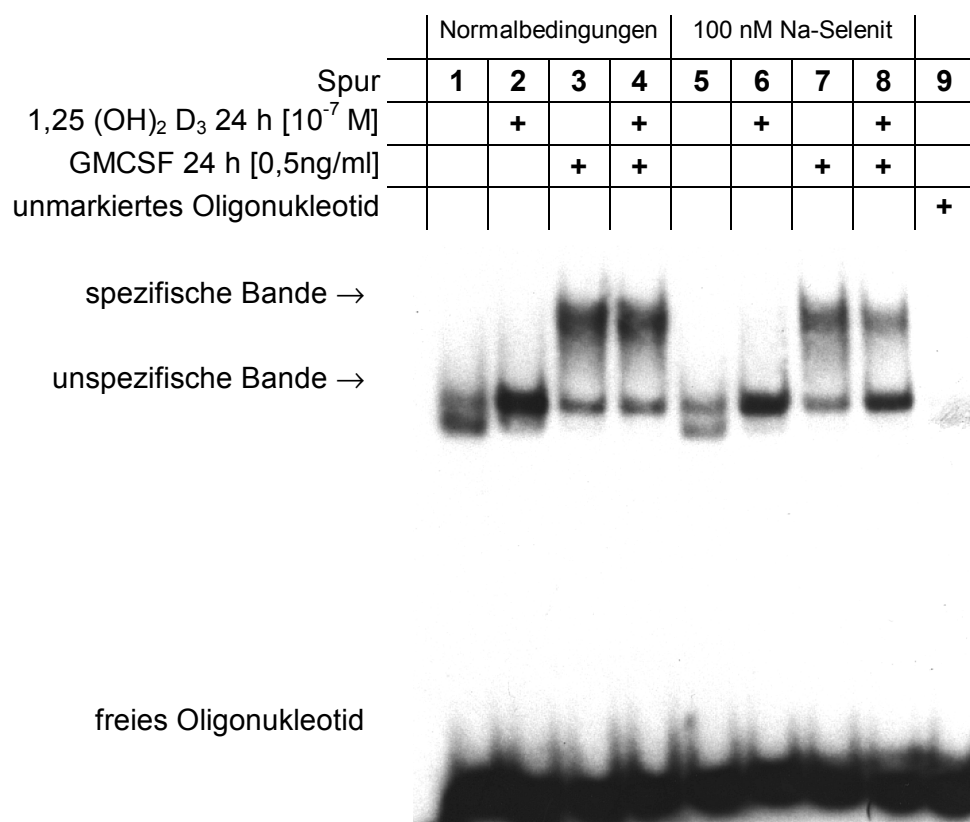


Abb. 27: **Gelshift-Analyse: Untersucht wurde die AP1-Aktivierung in THP1-Zellen** unter Normalbedingungen und nach Selenitsupplementation (100 nM). THP1-Zellen wurden für 24 h mit  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  und GMCSF behandelt. AP1 wird nach GMCSF-Behandlung aktiviert, basal und nach  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -Stimulation zeigt sich keine Aktivierung. In selenitsupplementierten Zellen wird AP1 schwächer aktiviert als in unbehandelten Zellen.

#### 1.4.3.2 NF $\kappa$ B Aktivierung in THP1-Zellen nach GMCSF, IL-4 und ATG-Stimulation

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B wurde in THP1-Zellen in einer Gel shift-



kultiviert, ein Teil wurde mit  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  für 3 d differenziert, Kontrollzellen und differenzierte Zellen wurden anschließend mit 0,5 ng/ml GMCSF, differenzierte Zellen mit 1 ng/ml IL-4 und 100  $\mu\text{M}$  Aurothioglucose (ATG) stimuliert.

NF $\kappa$ B wird in  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -differenzierten Zellen nach 48 h GMCSF-Stimulation (Abb. 28, Spur 3) stärker aktiviert als in undifferenzierten Kontrollzellen (Spur 1),  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -differenzierten Zellen (Spur 2) und differenzierten Zellen die für 24 h und 8 h mit GMCSF behandelt wurden (Spur 4 und 5). Die Behandlung der differenzierten und für 24 h mit GMCSF stimulierten Zellen mit dem Thio redoxin-Reduktase Hemmer Aurothioglucose (ATG, 100  $\mu\text{M}$ , 1 h, Spur 6) hatte keine Abschwächung des Signals zur Folge. In differenzierten und für 24 h mit GMCSF stimulierten Zellen zeigt die 20 minütige Behandlung mit IL-4 (1 ng/ml, Spur 7) eine Hemmung der NF $\kappa$ B Aktivierung nach sich. NF $\kappa$ B wird auch in undifferenzierten Zellen nach GMCSF Stimulation aktiviert. NF $\kappa$ B wird am stärksten nach 8 h aktiviert. Nach 24 h Inkubation wird NF $\kappa$ B schwach, nach 48 h wieder stärker aktiviert (Spur 8-10). Die Spezifität der NF $\kappa$ B Bindung wurde durch Zugabe eines 100-fachen Überschusses an unmarkiertem Oligonukleotid, welches mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid um die Bindung konkurriert, kompetiert. Die Zugabe eines p65-Antikörpers führte zur Bildung einer Supershift-Bande.

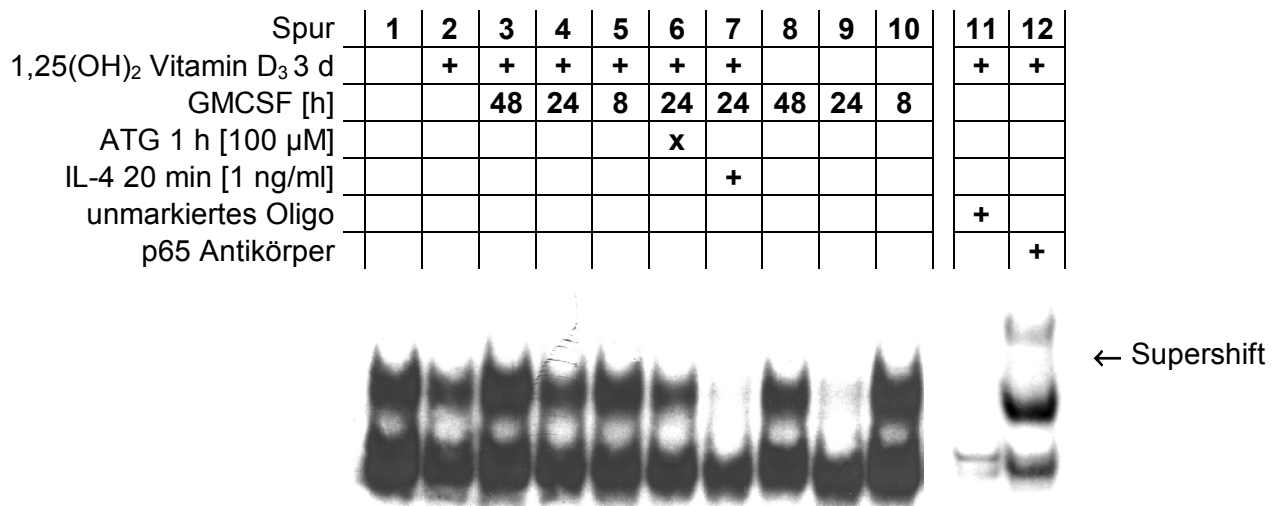


Abb. 28: Gelshift-Analyse: Untersucht wurde die NF $\kappa$ B Aktivierung in selenitsupplementierten THP1-Zellen nach GMCSF, IL-4 und ATG Stimulation. Eine Aktivierung zeigt sich bereits basal und kann durch GMCSF nach Differenzierung mit  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  gesteigert werden. IL-4 Stimulation senkt die NF $\kappa$ B Aktivierung. Keinen Einfluss hat Aurothioglucose auf die NF $\kappa$ B Aktivität.

### 1.4.3.3 Einfluss von oxidativem Stress auf die NFκB Aktivierung in THP1-Zellen

Im Vergleich von selenitsupplementierten zu Makrophagen differenzierten THP1-Zellen mit nicht-selenitsupplementierten Zellen zeigte sich hinsichtlich des Einflusses von TNFα auf die Aktivierung von NFκB ein zeitverzögerter Effekt. Diese Ergebnisse sind in Abb. 29 dargestellt. Werden die zu Makrophagen differenzierten Zellen mit 30 ng/ml TNFα für 15 bis 60 min stimuliert, kann beobachtet werden, dass NFκB nach 15 bis 60 min unter Normalbedingungen im Vergleich zu selenitsupplementierten Zellen stärker aktiviert wird (Spur 5- 10). In unbehandelten Kontrollzellen wird NFκB unter Selenitsupplementation stärker aktiviert als unter Normalbedingungen (Spur 1 und 2).

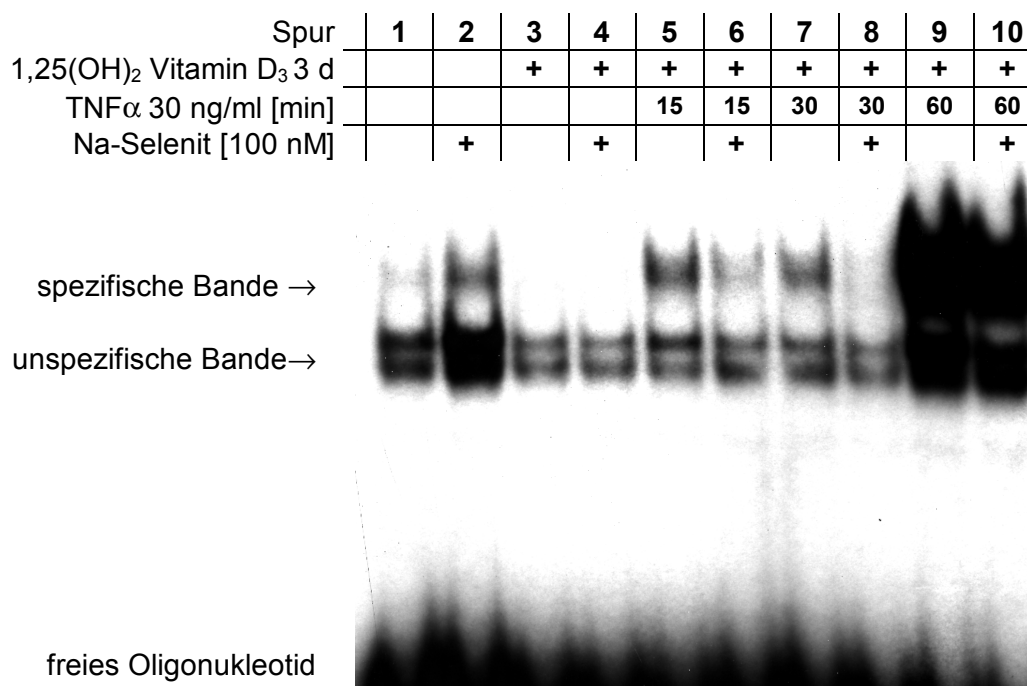


Abb. 29: **Gelshift-Analyse: Einfluss von TNFα nach Selenitsupplementation auf die NFκB Aktivierung in THP1-Zellen.** THP1-Zellen wurden für 3 d mit 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> differenziert und mit 30 ng/ml TNFα für 15 bis 60 min behandelt. NFκB wird nach Stimulation mit TNFα in selenitsupplementierten Zellen schwächer und erst mit zeitlicher Verzögerung aktiviert im Vergleich zu nicht-supplementierten Zellen.

## 2 Weitere Selenoproteine in Monozyten/Makrophagen

### 2.1 Markierung der Selenoproteine in THP1-Zellen mit $^{75}\text{Se}$

Unbehandelte und für 24 h mit  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  behandelte THP1-Zellen wurden über Nacht mit  $^{75}\text{Selenit}$  inkubiert. Zur Analyse der markierten Selenoproteine wurden die Zellen am folgenden Tag geerntet und Zelllysate sowie Zellüberstände neben einem Proteinmarker in einem Acrylamidgel aufgetrennt. Die Autoradiographie und Coomassie-Färbung des Geles ist in Abb. 30 gezeigt. In unbehandelten und mit  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  behandelten THP1-Zellen werden neun Selenoproteine exprimiert (bei 14 kDa, zwei zwischen 20 und 24 kDa, eines bei 36 kDa, zwischen 36 und 45 kDa, drei zwischen 45 und 66 kDa, eine Bande über 66 kDa). In Zellüberständen lässt sich ein Selenoprotein in hoher Konzentration zwischen 45 und 66 kDa detektieren, zwei weitere dünnere Banden erscheinen bei 24 und 14 kDa. Nach Coomassie-Färbung des Gels wird in den Überständen jeweils eine deutliche Bande zwischen 45 und 66 kDa sichtbar.  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -Behandlung hat keine Änderung des Bandenmusters zur Folge.

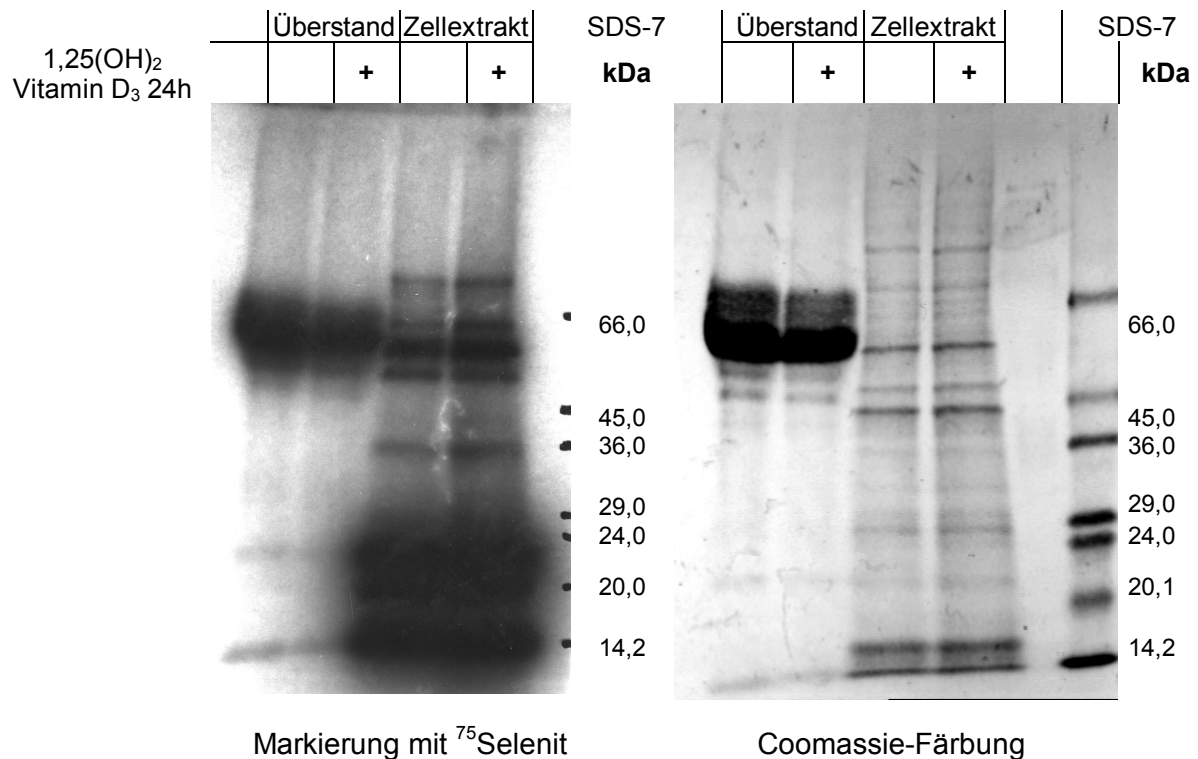


Abb. 30:  $^{75}\text{Selenit}$ -Markierung der Selenoproteine in unbehandelten und für 24 h mit  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -behandelten THP1-Zellen im Vergleich zur Coomassie-Färbung des Proteingel. Zur Größenbestimmung

## 2.2 A ktivität der Glutathionperoxidase (GPx) in THP1-Zellen

Selenitsupplementierte THP1-Zellen und Kontrollzellen wurden für 3 d mit  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  differenziert und mit GMCSF für 24 und 48 h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen für die GPx-Aktivitätsmessung geerntet. Die Ergebnisse sind in Abb. 31 dargestellt.

Selenitsupplementierte THP1-Zellen haben eine GPx-Aktivität von  $1200 \text{ nmol/min/mg Protein}$  die durch  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -Differenzierung auf etwa  $1500 \text{ nmol/min/mg Protein}$  gesteigert werden kann. Eine Inkubation der differenzierten Zellen mit GMCSF für 24 bzw. 48 h hat keinen Einfluss auf die GPx-Aktivität. Kontrollzellen, ohne Na-Selenit zugegeben, besitzen unbeeinträchtigt eine GPx-Aktivität von etwa  $17 \text{ nmol/min/mg Protein}$ , die durch  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  Differenzierung auf über  $20 \text{ nmol/min/mg Protein}$  gesteigert werden kann. GMCSF-Behandlung hat hier eine Aktivitätsminderung zur Folge.

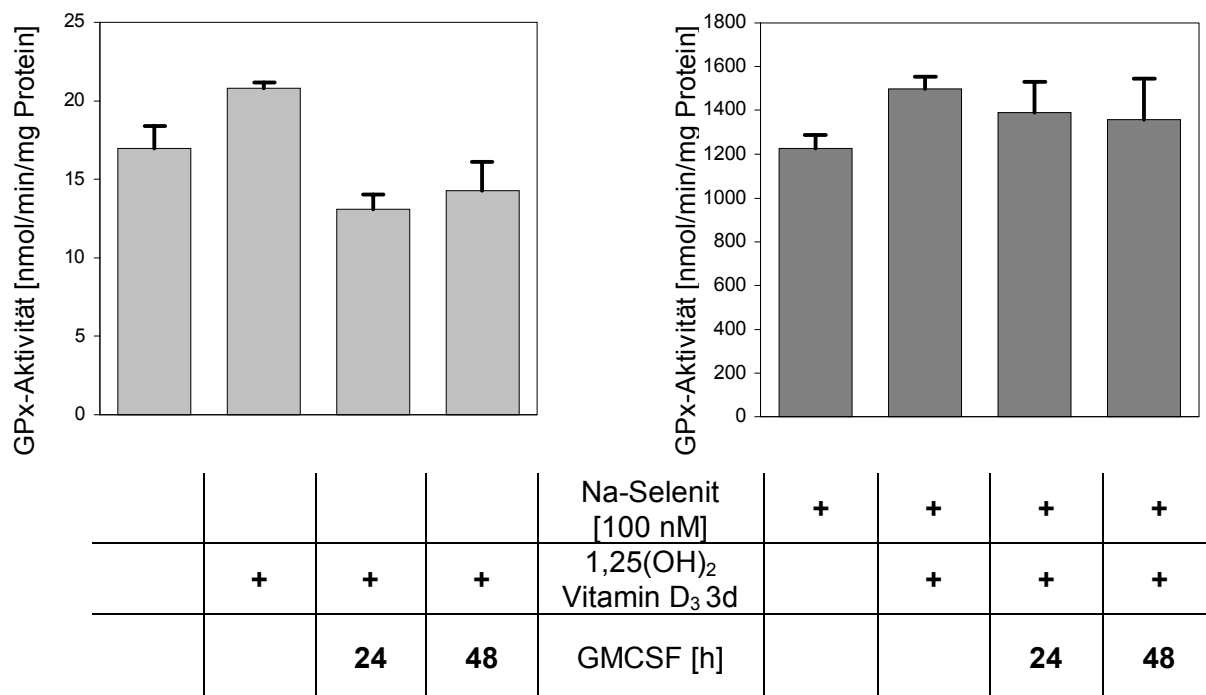


Abb. 31: **Effekt von Na-Selenit auf die GPx-Aktivität in  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -differenzierten THP1-Zellen.** Die GPx-Aktivität in selenitsupplementierten Zellen liegt etwa 70-fach höher als in Kontrollzellen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=3).

---

### 3 Einfluss von Selenit auf die Phagozytose von THP1-Zellen

Selenitsupplementierte THP1-Zellen und Kontrollzellen wurden für 3 d mit  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  differenziert und anschließend für 24 und 48 h mit GM-CSF stimuliert. Die Phagozytoserate wurde nach 30, 60 und 120 minütiger Inkubation mit fluoreszierenden *E. coli*-Membranbestandteilen bestimmt.

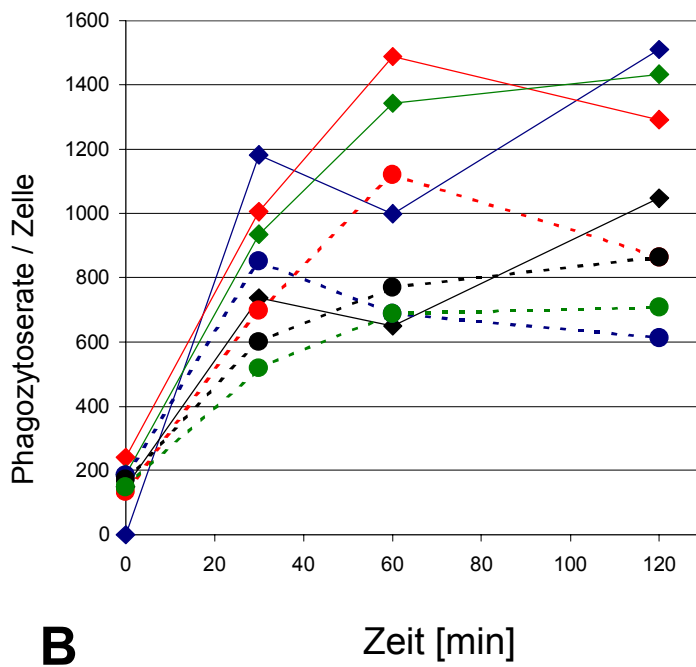
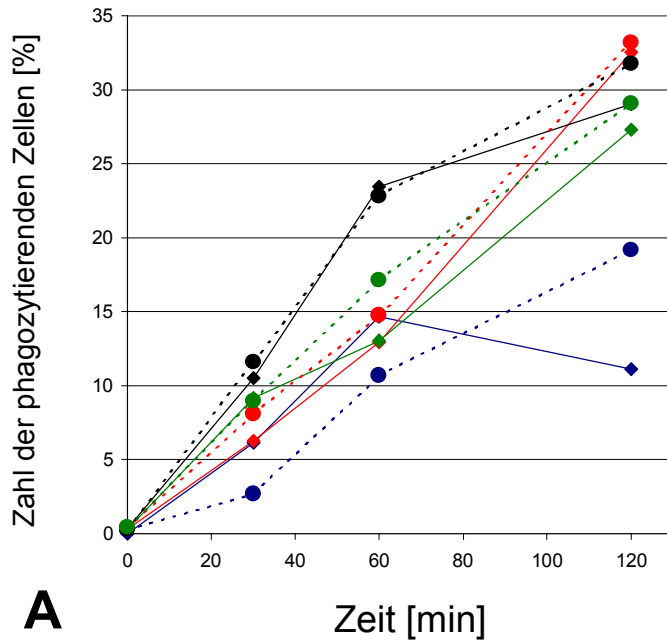
Abb. 32 A zeigt den prozentualen Anteil der phagozytierenden THP1-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Die Anzahl der unstimulierten phagozytierenden THP1-Zellen ist bei einer Inkubation von 30 und 60 min bei Selenitsupplementation (3 und 10%) niedriger als unter Normalbedingungen (6 und 15%). Nach 120 min Inkubation steigt die Zahl der phagozytierenden THP1-Zellen unter optimierter Selenitkonzentration weiterhin auf 19% an, wogegen die Zahl der unter Normalbedingungen gezogenen phagozytierenden Zellen auf 11% sinkt.

Nach 3 d Differenzierung der THP1-Zellen mit  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  und anschließender Inkubation mit Membranfragmenten von *E. coli* für 30, 60 und 120 min zeigt sich kaum ein Unterschied in der Anzahl der phagozytierenden Zellen, kultiviert in selenitfreiem bzw. in selenithaltigem Medium. Die Zellzahlen steigen von 6-7% (30 min Inkubation) über 14-15% (60 min) auf 33% (120 min Inkubation) an.

Der Graph mit Reutersymbolen zeigt die Anzahl der phagozytierenden Zellen nach Differenzierung und anschließender Stimulation mit GM-CSF für 24 h. Der Kurvenverlauf ist zunächst gleich. Nach 120 min Inkubation wird ein Maximum in der Phagozytose-Zellzahl erreicht. Die Anzahl der selenitfrei gezogenen Zellen (29%) liegt hier unter der Zahl der selenitsupplementierten Zellen (31%).

Ein Unterschied zwischen der Anzahl der phagozytierenden selenitsupplementierten und selenitfrei gezogenen Zellen wird nach Differenzierung mit  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  für 3 d und anschließender Stimulation mit GM-CSF für 48 h deutlich. Nach 60 min Inkubationsdauer phagozytieren 13% (selenitfrei) und 17% (selenithaltig) der Zellen. Die Werte steigen linear auf 27 und 29% an.

Abb. 32 B zeigt die Phagozytoserate der THP1-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Es fällt auf, dass selenitsupplementierte Zellen (Rauten) im Vergleich zu nichtsupplementierten Zellen (Kreise) tendenziell nach 120 min Phagozytosedauer eine höhere Phagozytoserate besitzen.



Legende	unbehandelt	1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin D <sub>3</sub> 3d	+GMCSF 24 h	+GMCSF 48 h
Kontrolle	●	●	●	●
Na-Selenit [100 nM]	◆	◆	◆	◆

Abb. 32: Effekt von Na-Selenit, 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> und GMCSF auf A) die Anzahl der phagozytierenden THP1-Zellen und B) die Phagozytose rate der THP1-Zellen nach unterschiedlicher Stimulationsdauer.

---

## E Diskussion

Lange Zeit galt das Prinzip, dass (seco)steroid-modifizierende Enzyme nur in glandulären Organen wie z. B. Leber und Nebenniere exprimiert werden und dort Hormone aktivieren und inaktivieren. Viele dieser Enzyme gehören zur Familie der p450-Enzyme, welche eine FAD-Bindungsdomäne besitzen und eine Häm-Gruppe in ihrem aktiven Zentrum tragen. p450-Enzyme sind eine in der Evolution sehr alte, hochkonservierte Enzymfamilie. Die aktivierten Hormone werden anschließend in den Blutstrom abgegeben und zu den Zielgeweben transportiert. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass auch Einzelzellen außerhalb glandulärer Organe in der Lage sind (seco)steroid-modifizierende Enzyme zu exprimieren und somit Hormone zu aktivieren und zu inaktivieren.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde unter anderem die Expression von Enzymen des Vitamin D<sub>3</sub>-Stoffwechsels in monozytären Zellen untersucht: Die 1 $\alpha$ -Hydroxylase führt an Position 1 des Secosteroidgerüsts des 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> eine Hydroxylgruppe ein und aktiviert somit den Hormonvorläufer zum aktiven 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>. Die 24-Hydroxylase dagegen hydroxyliert 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> an Position 24 und produziert somit 1,24,25(OH)<sub>3</sub> Vitamin D<sub>3</sub>. Weiterhin wird 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> zu 24,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> hydroxyliert. 24,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> wurde als ein Vitamin D<sub>3</sub>-Metabolit mit einem membranständigen Rezeptor identifiziert. 24,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> hat einen Einfluss auf die Membranfluidität und die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (Swain *et al.*, 1993; Langston *et al.*, 1990). Weiterhin ist 24,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> wichtig für die Embryogenese, für die Regulation des Knochenwachstums, der –Entwicklung und –Reparatur (St-Arnaud *et al.*, 1998). Die Aktivität der 1 $\alpha$ -Hydroxylase wurde nach Supplementation des Mediums mit ihrem Substrat (25(OH) Vitamin D<sub>3</sub>) und nach Stimulation mit Parathormon in peripheren Blutmonozyten und monozytären Zellen bestimmt. Parathormon bindet an seinen Rezeptor, den PTH Rezeptor Typ 1 (PTHr1). Ein weiterer Ligand dieses Rezeptors ist das auto- und parakrin wirkende PTH related Protein (PTHrP). Es wurde als Tumorerhyperkalzämie propagierender Faktor identifiziert und wirkt stimulierend auf die 1 $\alpha$ -Hydroxylase Aktivität und somit auf die Produktion von 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> (Sato *et al.*, 1993). Durch PCR-Amplifikation und Markierungsexperimente konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass monozytäre und auch dendritische Zellen den PTHr1 exprimieren und PTHrP an diesen Rezeptor bindet.

Das aktive 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>, welches in monozytären Zellen produziert wird, wirkt auf

---

deren Expression. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des Osteopontins untersucht. Osteopontin ist ein Matrixprotein mit einem RGD-Motiv in der Aminosäuresequenz, das an den Vitronektin-Rezeptor, das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin bindet und somit maßgeblich an der Zelladhäsion beteiligt ist. Das Selenoprotein Thioredoxin Reduktase 1 (TR1), ein weiteres  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -responsives Enzym, dessen Expression in monozytären Zellen untersucht wurde, moduliert durch Reduktion von Cysteinresten in Proteinen deren Sekundärstruktur und ist somit an Protein/Protein-Interaktionen und Protein/DNA-Interaktionen, wie der Bindung von Transkriptionsfaktoren an DNA, beteiligt. Als Beispiel sind hier die Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und AP1 zu nennen, deren Aktivität sowohl direkt als auch über die Reduktion von Thioredoxin durch die TR1 moduliert wird. Es wurde der Einfluss von Selenit,  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  und Wachstumsfaktoren zum einen auf die Aktivität der TR1, zum anderen auf die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und AP1 in monozytären Zellen untersucht.

In den letzten Jahren konnten mehrere Selenoproteine identifiziert werden, die alle ein Selenocystein im aktiven Zentrum tragen und maßgeblich an der Katalyse von Redox-Reaktionen beteiligt sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in monozytären Zellen exprimierten Selenoproteine mit  $^{75}\text{S}$  Selenit markiert und deren apparentes Molekulargewicht durch Auftrennung der Proteine in einem denaturierenden Polyacrylamidgel näher bestimmt. Die Aktivität des Selenoenzyms Glutathionperoxidase wurde durch einen enzymatischen Test vor und nach Selenit substitution in monozytären Zellen untersucht. Weiterhin wurde der Einfluss von Selenit auf die Funktion von Makrophagen mit Hilfe eines Phagozytose Tests bestimmt.

## **1 $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin $\text{D}_3$ responsive Gene in monozytären Zellen**

In der Literatur und im Rahmen dieser Arbeit wurden  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -responsive Gene in Monozyten/Makrophagen beschrieben und charakterisiert. Monozyten exprimieren den nukleären  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -Rezeptor und sind somit in der Lage auf  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -Stimuli zu reagieren. Eine wichtige Rolle hierbei spielen die Mikrotubuli der Zelle. Werden sie zerstört, wird der Transport von  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  zu den Mitochondrien inhibiert (Kamimura *et al.*, 1995). In den Mitochondrien befindet sich das  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -inaktivierende Enzym, die 24-Hydroxylase. Wird  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  nicht zu den Mitochondrien transportiert, kann es nicht inaktiviert werden.

Ein weiteres  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  responsives Gen in Monozyten und Makrophagen ist c-



---

Mitglieder der myk Proto-Onkogen Familie beeinflussen die Proliferation, Differenzierung und die Apoptose von Zellen. Wird c-myc überexprimiert kommt es zu gesteigerter Zellproliferation, die Differenzierung von Zellen wird inhibiert und Apoptose bei Abwesenheit von 'Überlebensfaktoren' induziert (Bahram *et al.*, 1999).

Die Expression des LPS-Rezeptors und Monozytenmarkers CD14 wird ebenfalls durch  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  reguliert.

### 1.1.1 $\alpha$ -Hydroxylase

Durch RT-PCR und Funktionsuntersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass das  $25(\text{OH})$  Vitamin  $\text{D}_3$ -aktivierende p450-Enzym  $1\alpha$ -Hydroxylase, in peripheren Blutmonozyten (PBM) exprimiert wird. Zur Aktivitätsbestimmung wurden die Zellen zum einen mit dem Substrat der  $1\alpha$ -Hydroxylase  $25(\text{OH})$  Vitamin  $\text{D}_3$  substituiert, zum anderen mit Parathormon stimuliert. Im systemischen  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -Stoffwechsel wird in der Niere die  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -Produktion durch PTH gesteigert. Die Höhe der Expression des Enzyms in Monozyten war unabhängig von der Art der Stimulation mit der Ausnahme, dass nach Behandlung mit dem p450-Enzym Inhibitor Ketoconazol, die mRNA-Menge verringert war. Aus der Literatur ist vor allem eine antimykotische Wirkung des Imidazolderivates Ketoconazol, welches die Ergosterinsynthese hemmt, bekannt (Loose *et al.*, 1983). Weiterhin wurde ein Ketoconazol-Effekt auf die Stabilität der mRNA der Stickoxid-Synthase in der Maus-Makrophagenzelllinie J 774 beschrieben. Über den Mechanismus ist jedoch noch nichts bekannt (Baroni *et al.*, 1999). Ketoconazol-Behandlung von peripheren Blutmonozyten verringerte die Konzentration von  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  im Zellüberstand auf 16,8%. Allein die Supplementation des Mediums mit dem Substrat der  $1\alpha$ -Hydroxylase ( $25(\text{OH})$  Vitamin  $\text{D}_3$ ) ließ die Konzentration an freigesetztem  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  um das 5-fache ansteigen. Es muss davon ausgegangen werden, dass die geringe  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -Produktion in nicht-supplementierten Monozyten auf einen Mangel an Substrat im Zellkulturmedium zurückzuführen ist. Durch PTH-Stimulation der supplementierten PBM konnte nur eine geringe, nicht signifikante Steigerung der freigesetzten  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -Menge im Vergleich zu  $25(\text{OH})$  Vitamin  $\text{D}_3$ -supplementierten Zellen erzielt werden. Möglicherweise kann die Aktivität der  $1\alpha$ -Hydroxylase bei einer Substratkonzentration von  $10^{-7}$  M nicht weiter durch PTH-Gabe gesteigert werden, da bereits basal nach Supplementation die Aktivität der  $1\alpha$ -Hydroxylase hoch ist. PTH alleine, ohne eine gleichzeitige Supplementation mit  $25(\text{OH})$  Vitamin  $\text{D}_3$ , hatte keinen Einfluss auf die  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -Produktion, was auf einen Mangel an Substrat zurückzuführen sein

---

zu können, wurde bei 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation sowohl das Enzym als auch die Transkription durch Ketoconazol inhibiert und gleichzeitig mit PTH stimuliert. PTH hatte in diesem Fall jedoch keinen Anstieg der produzierten 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Menge zur Folge im Vergleich zu entsprechenden Kontrollzellen. Es wird daher angenommen, dass die Hemmung der Transkription der 1 $\alpha$ -Hydroxylase durch Ketoconazol dominant war und keine weitere Stimulation durch PTH-Behandlung erzielt werden konnte. In THP1-Zellen zog eine Supplementation des Mediums mit 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> nur eine geringe Steigerung der 1 $\alpha$ -Hydroxylase Aktivität nach sich. Eine gleichzeitige Behandlung mit PTH ließ die freigesetzte Menge an 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> um das 1,4-fache ansteigen, eine Hemmung der 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Synthese durch Ketoconazol konnte in THP1-Zellen nur geringfügig erzielt werden.

Um die eingesetzte Methode zur 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Bestimmung in Zellkultur-Überständen mit Hilfe eines <sup>125</sup>I-1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-abhängigen Radioimmunoassays (RIA) zu validieren, wurden COS7-Zellen mit einem Überexpressionskonstrukt der humanen 1 $\alpha$ -Hydroxylase transfiziert. Die Transkription des Enzyms wurde durch eine RT-PCR nachgewiesen und die 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Produktion der COS7-Zellen bei gleichzeitiger 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation des Mediums bestimmt. Aus Gesamt-RNA der transfizierten COS7-Zellen konnte die 1 $\alpha$ -Hydroxylase mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Transfizierte COS7-Zellen produzierten die 8-fache Menge an 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> im Vergleich zu untransfizierten Kontrollzellen. Dies zeigt, dass der eingesetzte RIA, der ursprünglich für 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Bestimmungen aus humanem Serum entwickelt wurde, auch für Konzentrationsbestimmungen in Zellkultur-Überständen geeignet ist. Es ist weiterhin auszuschließen, dass unspezifisch 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> detektiert wurde, da nach Angaben des Herstellers nur eine 0,0013 %ige Kreuzreaktion mit 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> auftritt. Nach Ketoconazol-Behandlung der Monozyten sank die Konzentration der 1 $\alpha$ -Hydroxylase mRNA und nachfolgend die Produktion an freigesetztem 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>, was ebenfalls als Validierung für den verwendeten 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> RIA angesehen werden kann.

Durch die Expression der 1 $\alpha$ -Hydroxylase in Monozyten/Makrophagen und die daraus resultierende Sekretierung von aktivem 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Hormon wird für Monozyten/Makrophagen und ihr Milieu ein autokrines/parakrines Signal freigesetzt. Die Expression 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-responsiver Gene wird in diesen und benachbarten Zellen beeinflusst und die Immunantwort moduliert. Aus der Literatur ist bekannt, dass Makrophagen von Sarkoidose- und Morbus Crohn-Granulomen vermehrt

---

(Bosch, 1998; Sharma, 1996). Es wird angenommen, dass auch in diesem System 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-responsive Gene beeinflusst werden und zur Unterhaltung der Krankheit beitragen. Die Untersuchung 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-responsiver Gene in Monozyten/Makrophagen kann Mechanismen der Granulom-Entstehung und -Manifestation aufklären.

### 1.1.1 Rolle von PTHrP in Monozyten und Dendritischen Zellen

Im systemischen Ca<sup>2+</sup>- und Vitamin D<sub>3</sub>-Stoffwechsel wird die 1 $\alpha$ -Hydroxylase durch Parathormon durch Aktivierung des Promotors der 1 $\alpha$ -Hydroxylase stimuliert (Murayama *et al.*, 1998). Parathormon related Protein (PTHrP) wurde als pathogenetischer Faktor, der die Tumorerhyperkalzämie propagiert, identifiziert (Suva *et al.*, 1978) und bindet wie PTH an den PTH Rezeptor Typ 1. Wichtig für die Rezeptorerkennung ist die Aminosäuresequenz 1 bis 34, die in beiden Proteinen zu 40 % identisch ist. In der vorliegenden Arbeit konnte durch einen Bindungsassay mit Cy3.5 markiertem PTHrP gezeigt werden, dass PTHrP an die Membran von Monozyten und Dendritischen Zellen bindet. Durch eine nested RT-PCR aus Gesamt-RNA von peripheren Blutmonozyten und Dendritischen Zellen konnte der PTH Rezeptor Typ 1 unabhängig von der Art der Stimulation aus allen Proben amplifiziert werden. Dass eine 'nested' PCR zum Nachweis der Rezeptor-Expression nötig war zeigt, dass die Expression des PTHR1 sowohl in Monozyten als auch in Dendritischen Zellen sehr niedrig ist.

Während PTH in der Nebenschilddrüse gebildet wird und den systemischen Ca<sup>2+</sup>-Stoffwechsel reguliert, wird PTHrP in unterschiedlichen Geweben und Zellen wie Knochen und Keratinozyten exprimiert und besitzt eine autokrine/parakrine Funktion, die vor allem im System der Differenzierung von Knochenzellen beschrieben wurde. Durch PTHrP wird die Wirkung des in der Embryonalentwicklung exprimierten Indian hedgehog (Ihh) vermittelt. In PTHrP Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass PTHrP die Differenzierung von Chondrozyten in den Wachstumszonen von Knochen verlangsamt. Es tritt eine verfrühte Ossifikation ein, ebenso wird das Einwandern von Blutgefäßen verhindert (Vortkamp *et al.*, 1996). In Chondrozyten wird weiterhin PTHrP-abhängig die Expression von Bcl-2 gesteigert und die Apoptose verhindert (Amling *et al.*, 1997; Tsujimoto *et al.*, 2000). Bcl-2 gehört zu einer Proteinfamilie, deren Mitglieder pro-apoptotische und anti-apoptotische Wirkung besitzen. In der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK-293 wird dagegen über den PTHR1, dessen Ligand sowohl PTH als auch PTHrP sein kann, Phospholipase C und Ca<sup>2+</sup>-abhängig Apoptose vermittelt. PTH-Einwirkung führt hier zu einer Fragmentierung der DNA,

---

*al.*, 2000). In Dendritischen Zellen wird im Gegensatz zu Monozyten nach Inkubation mit Cy3.5-PTHrP(1–86) und gleichzeitiger DNA-Färbung mit DAPI eine Translokation von PTHrP in den Kern und zusätzlich eine Fragmentierung des Genoms beobachtet. Dies würde bedeuten, dass in Monozyten die Signalwirkung des PTHrP über den membranständigen PTH-Rezeptor Typ 1 v.ermittelt wird, in Dendritischen Zellen dagegen ein direkter Effekt des PTHrP auf die DNA und Transkription eine Rolle spielt. Es ist noch nicht bekannt, ob in Dendritischen Zellen durch PTHrP-Einwirkung Apoptose induziert werden kann. PTHrP könnte somit die Immunantwort dahingehend modulieren, dass die Genexpression in Monozyten beeinflusst wird, die Funktion von Dendritischen Zellen in der Immunabwehr dagegen durch mögliche Induktion von Apoptose inhibiert wird.

Zur Validierung des PTHrP-Cy3.5 Bindungsassays wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK-293) und HEK-293 Zellen, stabil transfiziert mit dem humanen PTH-Rezeptor Typ 1, mit PTHrP-Cy3.5 inkubiert. Native HEK-293 Zellen exprimieren den PTHR1 sehr schwach. Dies spiegelt sich im Bindungsassay wider. Während native HEK-293 Zellen nur schwach gefärbt werden, erfolgt eine starke Bindung des PTHrP-Cy3.5 an PTHR1-überexprimierende Zellen.

Es ist bisher noch nicht vollkommen geklärt, ob für PTHrP eine oder mehrere Kernlokalisationssequenzen existieren. Natives PTHrP besitzt an Position 87 bis 107 eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS), die eine Homologie zu bereits beschriebenen NLS-Elementen aufweist (Henderson *et al.*, 1995). Eine andere Arbeitsgruppe beschreibt eine putative Kernlokalisationssequenz zwischen Aminosäure 61 bis 94. Des Weiteren wird eine Zellzyklus-abhängige Phosphorylierung an Threonin-85 beobachtet, die über den Transport von PTHrP in den Kern (dephosphorylierter Zustand) oder den Verbleib im Zytoplasma (phosphorylierter Zustand) entscheidet (Lam *et al.*, 1999b). Der Mechanismus der PTHrP-Translokation in den Kern ist noch weitgehend ungeklärt. Einerseits wird eine receptor-unabhängige Bindung von PTHrP an die Zellmembran und nachfolgende Endozytose diskutiert, andererseits wird die Translokation des PTH-Rezeptors Typ 1 mit seinem Liganden PTHrP in den Kern diskutiert (Aarts *et al.*, 1999b; Watson *et al.*, 2000). Joun beschrieb 1997 das Auftreten unterschiedlicher Splicevarianten des PTHR1. Eine dieser Varianten besitzt kein Signalsequenzpeptid und stellt somit einen putativen, nicht-membranständigen intrazellulären PTH/PTHrP-Rezeptor dar. Eine weitere Arbeit beschreibt die Bindung von PTHrP an die  $\beta$ -Untereinheit von Importin (Lam *et al.*, 1999a). Für die Bindung von PTHrP an Importin sind die Aminosäuren 66 bis 94 des PTHrP verantwortlich. Importin ist ein Heterodimer aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Importin, wobei die  $\alpha$ -Kette eine NLS- und eine  $\beta$ -

---

(Görlich, 1998 und 1999). Importin ist im wesentlichen am Transport von Proteinen durch das Zytoplasma in den Kern beteiligt. Das in den Kern gelangte PTHrP ist in der Lage an RNA, vor allem an Poly-G- und GC-reiche doppelsträngige Sequenzen zu binden (Aarts *et al.*, 1999a).

Durch Expression des PTHrP-Rezeptors Typ 1 in peripheren Blutmonozyten und dendritischen Zellen kann lokal produziertes PTHrP über einen Rezeptor auto- und parakrin auf die untersuchten Zellen wirken und die Immunantwort modulieren. Aus der Literatur ist bekannt, dass PTHrP in Makrophagen während der Wundheilung und in Granulomen von Sarkoidosepatienten exprimiert wird und das Wachstum und die Differenzierung von Keratinozyten reguliert (Blomme *et al.*, 1999; Zeimer *et al.*, 1998). Bei der Propagierung und Manifestation der Sarkoidose ist als weiterer wichtiger Faktor GM-CSF zu nennen. In bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit von Sarkoidose-Patienten ließ sich durch RT-PCR eine erhöhte Konzentration an GM-CSF nachweisen. Es wird daher angenommen, dass GM-CSF granulomatöse Entzündungen propagiert und unterhält (Ishioka *et al.*, 1996). Dagegen sind die Konzentrationen an IL-4 in mononukleären Zellen der Lamina Propria von Morbus Crohn Patienten erniedrigt (West *et al.*, 1996). IL-4 wird von T-Zellen gebildet, stimuliert in Makrophagen die Antikörperproduktion und wirkt somit anti-inflammatorisch.

Es sind somit zwei Mechanismen der PTHrP-Wirkung an Monozyten denkbar: Zum einen die Stimulation der 1 $\alpha$ -Hydroxylase-Expression und die nachfolgende Beeinflussung 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-responsiver Gene, zum anderen die Induktion von Apoptose. Es ist unklar, ob die PTHrP-Wirkung auf Monozyten abhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen ist.

## 1.2 24-Hydroxylase

Die Expression der 24-Hydroxylase wurde als 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-responsives Gen im Rahmen dieser Arbeit in differenzierten THP1-Zellen untersucht. Die mRNA-Menge im Northern Blot war in THP1-Zellen nach 12 h Stimulation mit GM-CSF maximal, ebenso nach 8 h MCSF-Behandlung. Eine Induktion des Enzyms nach 3 d 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Behandlung konnte nicht beobachtet werden. Es wird deshalb angenommen, dass der transiente 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Stimulus nach dieser Zeit die Expression der 24-Hydroxylase nicht mehr beeinflusst. Die 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Signaltransduktion erfolgt über den klassischen Reaktionsmechanismus durch Bindung des Liganden an seinen Rezeptor mit anschließender Bindung an VDRE. In der Literatur wird die maximale

---

1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Stimulation erzielt (Chen *et al.*, 1995). Über die Regulation der 24-Hydroxylase durch GM-CSF ist in der Literatur nichts bekannt. GM-CSF wirkt über seinen Rezeptor, der aus einer α- und einer β-Kette besteht. Bindet der Ligand GM-CSF an den Rezeptor, wird über den Jak 2 (Janus-Kinase) und STAT5 (signal transducer and activator of transcription) Signaltransduktionsweg die Transkription reguliert. STAT5 bindet an sogenannte GAS-Elemente (gamma-interferon activation site) der Sequenz abfolge 5'-TTCXXXGAA-3' (Doyle *et al.*, 1998). Ebenso wird die MAP-Kinase Signaltransduktionskaskade und somit der Transkriptionsfaktor AP-1 aktiviert. In primären hämatopoetischen Zellen findet nach GM-CSF-Bindung an den Rezeptor abhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen eine Signaltransduktion über den JAK2 / STAT5 und MAP-Kinase Weg in unreifen Zellen statt. Nach drei Tagen Differenzierung der Zellen wird der MAP-Kinase Weg weiterhin aktiviert während über den JAK2 / STAT5 Weg keine Signaltransduktion mehr erfolgt (Wheadon *et al.*, 1999). Im Promotor der 24-Hydroxylase findet sich zwar kein GAS-Element, jedoch ist ein AP-1 ähnliches responsives Element vorhanden (Hiura *et al.*, 1999).

Aus den hier vorliegenden Daten kann gefolgert werden, dass in Makrophagen durch GM-CSF der Transkriptionsfaktor AP1 aktiviert wird, an das AP1-ähnliche Element im Promotor der 24-Hydroxylase bindet und die Expression des Enzyms steigert. Eine weitere Rolle in diesem System könnte die Thioredoxin Reduktase 1 spielen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch GM-CSF-Behandlung von 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-differenzierten THP1-Zellen die Aktivität der TR1 gesteigert werden konnte. TR1 ist im wesentlichen an der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie AP1 durch Reduktion von Disulfidbindungen beteiligt.

### 1.3 Osteopontin

Ein weiteres in Monozyten/Makrophagen untersuchtes 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-responsives Gen ist Osteopontin (OPN), das eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion spielt. Im Verlauf der THP1-Differenzierung zu Makrophagen steigt die OPN mRNA Konzentration an. Die Expression von OPN ermöglicht differenzierten Makrophagen sich im Zielgewebe anzuheften und dort Aufgaben in der Immunabwehr zu übernehmen. Unreife Zellen, die noch nicht mit den nötigen Enzymsystemen zur Immunabwehr ausgestattet sind exprimieren OPN vergleichsweise schwach und können nicht adhären. Immunhistochemische Untersuchungen an Granulomschnitten von Leber und Morbus Crohn-Präparaten ergaben eine starke Expression des untersuchten Proteins in den

---

den das Granulom umgebenden Bereich, im Granulom selbst konnte kein OPN detektiert werden.

Osteopontin induziert in T-Zellen und Makrophagen die Chemotaxis und die Adhäsion (O'Regan *et al.*, 1999). Eine kürzlich publizierte Arbeit beschreibt in Osteopontin Knockout-Mäusen eine ausbleibende Entwicklung von Granulomen nach Virusinfektion (Ashkar *et al.*, 2000). In frisch isolierten Rattenlebern wird OPN in Kupferzellen und Hepatozyten schwach exprimiert, während in nekrotischen Rattenlebern eine hohe Konzentration an OPN mRNA in Kupferzellen, Makrophagen und Stielzellen detektiert werden konnte (Kawashima *et al.*, 1999).

In Sarkoidose- und Morbus-Crohn-Granulomen wird lokal  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  in hohen Konzentrationen produziert. Dies kann dazu führen, dass Osteopontin und weitere  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -responsive Gene hochreguliert werden und die Ausbildung des Granuloms weiter propagieren. Osteopontin wiederum steigert in Makrophagen die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-12 und  $\text{IFN}\gamma$ . IL-12 induziert in NK- und TH1-Zellen die weitere Bildung von  $\text{IFN}\gamma$  und erhöht somit die zytotoxische Aktivität des Immunsystems.  $\text{IFN}\gamma$  wirkt immunmodulatorisch, d.h. in Abhängigkeit von den herrschenden Bedingungen wirkt es stimulierend oder supprimierend auf die Antikörperproduktion.

#### 1.4 Thioredoxin-Reduktasen - Selenoproteine

Durch  $^{75}\text{S}$ -Selen-Proteinmarkierung in THP1-Zellen konnten drei Banden im Polyacrylamid-Gel zwischen 45 und 66 kDa detektiert werden. Es könnte sich hierbei um Isoformen der Thioredoxin-Reduktasen handeln, die eine molare Masse von 55 kDa (TR1) und 56,5 kDa (TR3) besitzen. Die TR1 konnte sowohl im Northern Blot als auch durch Aktivitätsmessungen in Monozyten und in  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -differenzierten THP1-Zellen nachgewiesen werden. Bei der verwendeten Methode zur Aktivitätsmessung werden wahrscheinlich auch die TR2 und die TR3 mit erfasst, die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurden. In humanen fetalen Osteoblasten ist die TR3 jedoch nicht  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -responsiv (persönliche Mitteilung Dr. N. Schütze). In THP1-Zellen konnte die TR1 mRNA-Menge nach 1 bis 2 Stunden Inkubation mit  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  gesteigert werden. In *ex vivo* präparierten Monozyten wurde eine verstärkte TR1-Expression alleine durch den Prozess der Kultivierung und Anheftung der Zellen an der Kulturschale beobachtet, welche durch Gabe von  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  weiter gesteigert werden konnte. Die basale TR-Aktivität lässt sich in THP1-Zellen durch Inkubation mit  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  für 48 h um 66% steigern. Wird das Medium mit 100 nM Na-Selenit supplementiert, kann

---

1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-responsive Stimulation der TR in Selenit-supplementierten THP1-Zellen findet auf einem höheren Niveau in ähnlicher Relation statt. Durch Inkubation der THP1-Zellen mit dem TR und GPx-Inhibitor Aurothioglucose (ATG) (Chaudiere *et al.*, 1984; Gromer *et al.*, 1998b) ließ sich die TR-Aktivität bei einer ATG-Konzentration von 100 µM im Kulturmedium um 20 % hemmen. Eine Inhibition des Enzyms um 66 % ließ sich durch Zusatz von ATG im Reaktionsansatz erzielen.

Das Thioredoxin/TR1 System moduliert die Zellproliferation und Differenzierung in T- und B-Zellen. Es wurde gezeigt, dass Thioredoxin ein Wachstumsfaktor für Fibroblasten, B-Zellen und einige Krebszelllinien darstellt (Baker *et al.*, 1997; McKenzie *et al.*, 1998; Rosen *et al.*, 1995). Ein Weg, auf dem Thioredoxin in die Proliferation, Differenzierung und Apoptose eingreift, ist die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie NFκB und AP1, durch Reduktion von Cysteinresten. Dies ist wichtig für Protein/Protein-Interaktion, wie Ausbildung von Protein-Dimeren und für Protein/DNA-Interaktion, wie die Bindung von Transkriptionsfaktoren an DNA-responsive Elemente. Durch den Einfluss des TR/Trx-Systems auf die Proteinfaltung reguliert es indirekt die Expression von NFκB- und AP1-Zielgenen (Hirota *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997; Mitomo *et al.*, 1994). GM-CSF und der Tumornekrosefaktor α (TNF α) sind Beispiele für Gene, die unter der Kontrolle von NFκB transkribiert werden und eine wichtige Rolle in der Kommunikation zwischen Monozyten und T-Zellen bei Entzündungsreaktionen spielen können. Es wurde gezeigt, dass Thioredoxin in Tumorzelllinien Zytokinsekretion stimulieren und Apoptose inhibieren kann (Baker *et al.*, 1997; Schenk *et al.*, 1996). Das Thioredoxin/TR1 System ist ein antioxidatives System, welches Zellen vor oxidativem Stress schützt, der beim 'respiratory burst' nach Aktivierung von Monozyten/Makrophagen in der Phagozytose einwirkt (Seres *et al.*, 1996; Wieles *et al.*, 1997). In THP1-Zellen konnte nach Differenzierung der Zellen mit 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> gezeigt werden, dass die Zellen durch erhöhte Expression des Trx/TR1 Systems vor NO-vermittelter Zellschädigung geschützt waren im Vergleich zu Kontrollzellen (Ferre *et al.*, 2000).

Weitere antioxidative Systeme bilden die Familie der Glutathionperoxidasen, Katalase und Superoxiddismutase (Spolarics, 1996). Ein wichtiger Reaktionsweg der Bakterienabwehr in Makrophagen ist sauerstoffabhängig. Nach einer bakteriellen Infektion werden von Makrophagen reaktive Stickstoffverbindungen (Stickoxid NO) und reaktive Sauerstoffverbindungen (Superoxid O<sub>2</sub>•-), Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und Hydroxylradikale (OH•) produziert (Hyslop *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1998). Die Phagozytose von *Borellia burgdorferi* führt in Makrophagen zur Produktion von Stickoxiden und Sauerstoffradikalen,



---

Kompartimentierung dieser Systeme in der Zelle bekannt und ob zelluläre Abwehrmechanismen die Bekämpfung von Bakterien im Phagosom inhibieren können, wie dies z.B. das bakterielle Thioredoxin/Thioredoxin Reduktase System vermag. Durch Sezernierung von reaktiven Sauerstoffverbindungen und Stickstoffverbindungen durch Makrophagen bei m' respiratory burst werden auch benachbarte Zellen potentiell geschädigt. Die Expression des Thioredoxin/TR1 Systems und der Glutathionperoxidase (siehe unten) im Zytosol von Makrophagen stellt ein Puffersystem dar, das eine Zellschädigung verhindert. Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen werden von Makrophagen im Rahmen der Immunabwehr entweder sezerniert oder im Phagosom produziert, sodass das im Zytosol exprimierte Thioredoxin/TR1 System die Immunabwehr nicht beeinflusst.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die adäquate Versorgung mit Selen für die Funktion von monozytären Zellen von essentieller Bedeutung ist. Ist der Selen Gehalt niedrig, werden antioxidative Selenoenzyme wie TR niedrig exprimiert. Die Zellen werden nur unzureichend vor oxidativem Stress geschützt, eine mögliche Zellschädigung ist die Folge. Des Weiteren kann sich die geringe Expression der TR bei Selenmangel auf nachgeschaltete NF $\kappa$ B- und AP1-regulierte Gene auswirken, die nur unzureichend exprimiert werden.

## **2 Selenoproteine in Monozyten/Makrophagen**

In Monozyten/Makrophagen werden verschiedene Selenoproteine exprimiert. Durch 75-Selen-Markierungsexperimente in THP1-Zellen konnten im Rahmen dieser Arbeit mindestens neun Proteine zwischen etwa 14 und 80 kDa detektiert werden, von denen fünf offenbar sezerniert werden. Einige markierte Banden lassen sich Selenoproteinen bereits bekannter Funktion zuordnen, diese werden im folgenden hinsichtlich ihrer Expression und Funktion in Monozyten/Makrophagen diskutiert.

### **2.1 Glutathionperoxidasen**

Das Molekulargewicht der detektierten Proteine liegt um und unter 24 kDa. Es ist anzunehmen, dass es sich hierbei um Isoformen der Glutathionperoxidasen handelt, deren Molekulargewicht 22 kDa (GI-GPx), 22 kDa PH-GPx, 23 kDa (cGPx) und 25 kDa (pGPx) beträgt. Die cGPx wird in peripheren Blutmonozyten und Makrophagen im Vergleich zu neutrophilen Zellen höher exprimiert, ebenso ist die GPx-Aktivität höher (Pietarinen-Runtti

---

beschrieben, dagegen konnte die pGPx im Northern Blot nicht detektiert werden (Dreher *et al.*, 1997a). Die membranständige NADPH-Oxidase der Makrophagen produziert zur Abwehr von Mikroorganismen während Entzündungsprozessen  $H_2O_2$  (Rossi, 1986), bei gleichzeitiger Expression der pGPx würde dies wieder reduziert werden. Jedoch findet sich im Zellüberstand eine  $^{75}Se$ -markierte Bande bei 24 kDa, was auf ein sezerniertes Protein, z.B. die pGPx schließen lässt. Die GPx-Aktivität von THP1-Zellen wurde in einem Enzymassay bestimmt, der bisher nicht zwischen pGPx und cGPx unterscheiden kann. THP1-Zellen zeigen im Enzymassay GPx-Aktivität, die durch Selenitgabe (100 nM) annähernd um den Faktor 100 gesteigert werden kann. Dabei hat es kaum einen Einfluss, ob die Zellen undifferenziert oder für 3 d mit  $1,25(OH)_2$  Vitamin  $D_3$  stimuliert und anschließend mit GM-CSF 24 und 48 h behandelt wurden. Lange Zeit glaubte man, daß bei manchen Fällen der erblichen chronischen granulomatösen Erkrankung ein GPx-Mangel vorliegt, was letztlich allerdings auf Defekte der Untereinheiten der NADPH-Oxidase zurückgeführt werden konnte (Newburger *et al.*, 1994).

Bei mangelnder Versorgung von monozytären Zellen mit Selenit sinkt die Aktivität der GPx fast um den Faktor 100. Werden diese Zellen oxidativem Stress ausgesetzt, sind sie nicht in der Lage reaktive Sauerstoffverbindungen zu neutralisieren und werden potentiell geschädigt. Eine adäquate Versorgung mit Selenit ist für die Funktion von Makrophagen von essentieller Bedeutung.

## 2.2 Selenoprotein P

Selenoprotein P wurde bislang durch Northern Blot-Analysen in nativen THP1-Zellen einmal nachgewiesen, das Ergebnis konnte jedoch nicht verifiziert werden (persönliche Mitteilung Dr. I. Dreher). Im  $^{75}Se$ -Markierungsexperiment lässt sich jedoch eine Bande um 57 kDa detektieren, die auch in Zellüberständen auftritt und sezerniertes SeP sein könnte. Im Western Blot konnte mit einem polyklonalen SeP-Antikörper eine 57 kDa Bande sowohl aus THP1-Zellüberständen als auch aus Zelllysaten detektiert werden (persönliche Mitteilung A. Zierer).

## 2.3 Weitere Selenoproteine

Die substratbindende Selenoprotein-Untereinheit der Typ 1 5'-Deiodase wird in Monozyten nicht exprimiert, 5'-DI-Aktivität kann nicht nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung Dr. A. Baur). Bei etwa 14 kDa wurde ein weiteres Selenoprotein detektiert. Es könnte sich um das von Gladyshev *et al.* (1998) beschriebene 15 kDa Selenoprotein unbekannter Funktion

---

handeln. Weiterhin wurden im 75-Se-Markierungsexperiment Selenoproteine detektiert, die bisher nicht zugeordnet werden können.

### **3 Biologische Relevanz antioxidativer Selenoproteine in Zellen des Immunsystems**

Antioxidative Systeme neutralisieren reaktive Sauerstoffspezies (ROS), im Falle der TR wird auch ein antibiotisches/zytotoxisches Polypeptid (NK-Lysin) neutralisiert, das eine wichtige Funktion bei der Lyse von Tumorzellen und Bakterien hat (Andersson *et al.*, 1995 und 1996; Ruyschaert *et al.*, 1998). Aus der Sicht der Zelle bedeutet dies einen Schutz vor den durch die Zelle selbst oder von Nachbarzellen produzierten ROS. Andererseits werden durch ROS und antibiotische/zytotoxische Peptide Bakterien und Tumorzellen abgetötet. Die Balance der Produktion beider antagonistischer Systeme erscheint somit für den Nettoeffekt wichtig, um der Funktion der Abwehr ebenso wie der Erhaltung der zellulären Funktion gerecht zu werden. Inwiefern die Kompartimentierung z.B. der Phagosomen, innerhalb der Zelle in jeder Situation aufrecht erhalten werden kann, ist nicht erforscht. Je mehr ROS per Diffusion freien Zugang zu anderen Zellkompartimenten erlangen desto wichtiger wird die antioxidative Abwehrfunktion. Selenabhängige antioxidative Proteine tragen somit zur Erhaltung der Funktionalität der Zelle bei. Bezüglich der Kompartimentierung antioxidativer Polypeptide wurde in einer neueren Arbeit berichtet, dass Thioredoxin nach Behandlung der Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> praktisch vollständig in den Zellkern wandert, obwohl man in diesem Peptid kein klassisches nukleäres Lokalisationssignal (NLS) findet. Dies könnte sowohl die DNA vor oxidativen Schäden schützen, als auch die Funktion von Transkriptionsfaktoren erhalten, die vor der Oxidation geschützt werden müssen. In der gleichen Arbeit wurde gezeigt, dass Thioredoxin direkt in die Bindung von Glukokortikoid-Rezeptoren an ihr responsives DNA-Element eingreift (Makino *et al.*, 1999). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bewirkt zudem aber auch eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie NFκB (Baeuerle *et al.*, 1996). Zielgene dieses Transkriptionsfaktors sind u.a. TNFα und GM-CSF. Abhängig also von einem Ausfall der antioxidativen Schutzmechanismen, wie der GPx-Aktivität während des 'respiratory burst', können durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endogene Transkriptionsfaktoren stimuliert werden, die ihrerseits wiederum basale zelluläre Funktionen und deren 'Cross-Talk' mit Nachbarzellen beeinflussen. In Monozyten wird die Expression von TNFα durch Selensupplementation inhibiert, was zu einer Suppression der Replikation des HIV-1 Virus führt (Hori *et al.*, 1997). Ohne das sind es molekular bewiesen ist, könnte man sich den

---

Aktivierung von NF $\kappa$ B wiederum erniedrigt würde. Da HIV-1 NF $\kappa$ B-responsive Elemente in seinem Enhancer aufweist, würde hierdurch die HIV-Replikation gehemmt werden.

Antioxidative Systeme werden auch von Bakterien und Viren exprimiert. TR/Trx-Systeme kommen beispielsweise in Mykobakterien und in Plasmodien vor. Diese sind nach bisheriger Kenntnis nicht selenabhängig. Die Überexpression eines solchen Systems in Mykobakterien schützt diese in der ersten Phase der Infektion vor der Abtötung in Phagosomen (Zhang *et al.*, 1999). In dem Plathelminthen *Schistosoma mansoni* wurde eine 20 kDa Phospholipidhydroperoxid Glutathionperoxidase detektiert, die ebenfalls ein Selenoprotein ist (Maiorino *et al.*, 1996).

Die Expression von Selenoproteinen in Zellen des Immunsystems nimmt erheblichen Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung und die zellulären Funktionen dieser Zellen. Neben den hauptsächlich diskutierten cGPx und TR1 spielen möglicherweise die mitochondriale TR3 und das kürzlich beschriebene 14 kDa Selenoprotein sowie die noch nicht charakterisierten markierten Proteine eine ebenso wichtige Rolle (Gladyshev *et al.*, 1998). Viele dieser, wenn nicht gar alle Selenoproteine, sind in ihrer Funktion abhängig von Selen und damit könnte diesem Spurenelement als nutritiver Faktor in bestimmten Risikogruppen, auch in der Infektiologie und Autoimmunität eine Bedeutung zukommen.

#### **4 Einfluss von Selen auf die Phagozytose**

Die Hauptfunktion von Makrophagen ist die Antigenpräsentation und die Phagozytose von Mikroorganismen und Zelltrümmern. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Selen, 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> und GM-CSF auf die Phagozytose von THP1-Zellen untersucht. Im Rahmen der Differenzierung von THP1-Zellen zu Makrophagen lässt sich keine Tendenz in der Phagozytoserate der Einzelzelle und in der Anzahl der phagozytierenden Zellen feststellen. Je länger die Zellen mit fluoreszierenden *E. coli*-Membranbestandteilen inkubiert wurden, desto höher war die Phagozytoserate und die Zahl der phagozytierenden Zellen. Die Supplementierung des Mediums mit 100 nM Na-Selenit ließ die Zahl der phagozytierenden THP1-Zellen bei gleicher Stimulation leicht sinken. Die Phagozytoserate der einzelnen Zellen stieg jedoch an. Die vorliegenden Daten zeigen, dass ausreichend mit Selenit versorgte Makrophagen mehr Mikroorganismen und Zelltrümmer phagozytieren können im Vergleich zu weniger gut versorgten Zellen. Die Zahl der phagozytierenden Zellen sinkt jedoch in diesem Fall was darauf schließen lässt, dass die netto-Phagozytoseleistung der Makrophagen nicht durch Selenit beeinflusst wird.

---

## 5 Einfluss von Selen auf die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren

Das in Monozyten/Makrophagen exprimierte Thioredoxin Reduktase/Thioredoxin System (TR/Trx) moduliert wie oben beschrieben die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und AP1 durch Reduktion von Cysteinresten, durch welche eine Bindung der Proteine an DNA-responsive Elemente ermöglicht wird. Der Einfluss von Na-Selenit und Wachstumsfaktoren auf die Aktivierung von NF $\kappa$ B und AP1 in THP1-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

### 5.1 AP1

Der Transkriptionsfaktor AP1 wird in THP1-Zellen nach GM-CSF-Stimulation abhängig vom Selenstatus aktiviert. In selen-supplementierten Zellen wurde AP1 im Vergleich zu Kontrollzellen nach GM-CSF-Behandlung schwächer aktiviert. Eine Differenzierung der Zellen mit 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> für 3 d hatte keinen Einfluss auf die AP1-Aktivierung. Wurde jedoch mit GM-CSF behandelt, zeigte sich im Polyacrylamid-Gel ein Protein-DNA-Komplex. Wie auch schon andere Arbeitsgruppen berichteten, wird eine AP1-Aktivierung in den myeloischen Zelllinien HL60 und U937 durch GM-CSF-Behandlung induziert oder verstärkt (Adunyah *et al.*, 1991 und 1993).

### 5.2 NF $\kappa$ B, TNF $\alpha$ und pathologische Immunreaktionen

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B erfolgt in zu makrophagenähnlichen Zellen differenzierten THP1-Zellen nach Stimulation mit TNF $\alpha$ . 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-Behandlung der Zellen alleine führt nicht zu einer NF $\kappa$ B-Aktivierung. Nach einer Stimulation mit 30 ng/ml TNF $\alpha$  für 15 min wird NF $\kappa$ B bereits aktiviert. Nach 30 bis 60 min wird die DNA-Bindung zeitabhängig verstärkt und erreicht nach 60 min ihr Maximum. Wurden die Zellen mit 100 nM Na-Selenit kultiviert, erfolgte die NF $\kappa$ B-Aktivierung zeitverzögert, d. h. bei gleicher Behandlungszeit der Zellen mit TNF $\alpha$  war NF $\kappa$ B unter Selenit-Supplementation weniger aktiviert als unter Defizienz. In einem weiteren Experiment wurde NF $\kappa$ B unabhängig von Stimulationsart, -Dauer und Selenitsupplementation stark aktiviert, obwohl die Zellen gleich dicht ausgesät und stimuliert wurden. NF $\kappa$ B wird Zellzyklus-abhängig beim Eintritt der Zelle aus der G<sub>0</sub>- in die G<sub>1</sub>-Phase aktiviert (Goldstone *et al.*, 1997). Eine Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte deshalb ein Vorliegen der Zellen in unterschiedlichen

---

TNF $\alpha$ -Stimulation sowohl in Zellzyklus-arretierten als auch in proliferierenden Zellen aktiviert wird (Duckett *et al.*, 1995).

Durch Behandlung der Zellen mit IL-4 für 20 min konnte die Aktivierung von NF $\kappa$ B inhibiert werden. Dies ist insbesondere von Interesse, als dass die Behandlung von myeloischen Vorläuferzellen mit IL-4 und GM-CSF die Differenzierung zu dendritischen Zellen vorantreibt und den Makrophagenweg unterdrückt. Tatsächlich werden in unreifen dendritischen Zellen nach Inkubation mit GM-CSF und IL-4 die NF $\kappa$ B-Proteine c-Rel, RelB und p50 schwächer exprimiert im Vergleich zu reifen dendritischen Zellen. Ebenso erfolgt eine stärkere Expression dieser Proteine in dendritischen Zellen wie auch in Makrophagen mit zunehmendem Grad der Differenzierung (Neumann *et al.*, 2000). Die Behandlung der Zellen mit dem Thiothionin-Reduktase-Inhibitor ATG hatte keinen Einfluss auf die NF $\kappa$ B-Aktivierung in THP1-Zellen, was auf eine untergeordnete Rolle des TR/Trx-Systems in diesem Fall der Transkriptionsfaktor-Aktivierung schließen lässt.

In granulomatösen Erkrankungen wie Morbus Crohn und Sarkoidose spielt die Aktivierung von NF $\kappa$ B eine große Rolle. Immunhistologische Untersuchungen an Morbus Crohn Gewebe ergaben eine hohe Expression der NF $\kappa$ B-Untereinheit p65 in mononukleären Zellen der Mukosa, wie z.B. Makrophagen (Ellis *et al.*, 1998, Rogler *et al.*, 1998). Aber auch in nicht-entzündetem benachbartem Gewebe war das Auftreten von p65-Proteinen erhöht. Dies lässt darauf schließen, dass eine Aktivierung von NF $\kappa$ B bereits im Anfangsstadium der Entzündung auftritt und die Immunantwort gestört ist. Hierbei tritt TNF $\alpha$  als wichtiger Mediator zwischen Entzündungsreaktion und NF $\kappa$ B-Aktivierung auf. Beim Morbus Crohn und der Rheumatoiden Arthritis werden erhöhte Spiegel an proinflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$  gemessen. In der Behandlung dieser Krankheiten werden neuerdings TNF $\alpha$ -Blocker wie lösliche Rezeptoren und monoklonale Antikörper eingesetzt (van Dullemen *et al.*, 1995; Kavanaugh *et al.*, 2000). Zur Behandlung der Rheumatoiden Arthritis werden Goldderivate wie Aurothioglucose verwendet, die antiinflammatorisch wirken und die Aktivierung von NF $\kappa$ B reduzieren. Es wird angenommen, dass Aurothioglucose die Phosphorylierung der inhibitorischen I $\kappa$ B-Untereinheit durch Inhibierung der I $\kappa$ B-Kinase verhindert und so NF $\kappa$ B nicht aktiviert wird (Jeon *et al.*, 2000). Ein weiterer Effekt von ATG auf die NF $\kappa$ B-Aktivierung wird jedoch auch über das Trx/TR1 System vermittelt, da Trx/TR1 direkt durch Reduktion der Disulfidbindungen NF $\kappa$ B aktiviert.

---

der 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> Synthese und Inaktivierung reguliert die Expression 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub>-responsiver Gene, wie die Expression des Selenoproteins TR1, das einen direkten Einfluss auf den Redoxstatus und den Abbau reaktiver Sauerstoffverbindungen in diesen und Nachbarzellen ausübt.

---

## F Verzeichnis der Abkürzungen

AK	Antikörper
5'-DI	Typ I 5'-Deiodase
5'-DII	Typ II 5'-Deiodase
5-D	Typ III 5-Deiodase
AP1	Activator Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
ATG	Aurothioglucose
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGPx	cytosolische Glutathionperoxidase
cpm	'counts per minute'
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxynucleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAD	Flavinadenindinucleotid
FCS	fetales Kälberserum
GI-GPx	gastrointestinale Glutathionperoxidase
GMCSF	Granulozyten Makrophagen koloniestimulierender Faktor
GSH	Glutathion
GSH-Red.	Glutathion-Reduktase
GSSG	Glutathiondisulfid
GTC	Guanidin-Thiocyanat
IFN	Interferon
IGF	'insulin-like growth factor'
Ihh	Indian hedgehog
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalactosid
kb	Kilobasen
LB	Luria -Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	Mercaptoessigsäure



---

NADP+	Nicotinadenindinucleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)
NF $\kappa$ B	'nuclear factor $\kappa$ B'
OPN	Osteopontin
ORE	Sauerstoff-responsives Element
PBM	periphere Blutmonozyten
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
pBSSKII+	pBluescript SKII+
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
pGPx	Plasma-Glutathionperoxidase
PHGPx	Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase
PMA	Phorbol Myristat Acetat
PNK	T4 Polynukleotidkinase
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathormon related Protein
PTU	Propylthiouracil
Ref-1	'redox-factor 1'
ROIs	reaktive Sauerstoffintermediate
rpm	Umdrehungen pro Minute
rT3	3,3',5'-Triiod-I-Thyronin
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SECIS	'selenocysteine insertion sequence'
SEM	'standard error of the mean'
SeP	Selenoprotein P
T3	3,5,3'-Triiod-I-Thyronin
T4	I-Thyroxin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	'transforming growth factor'
TNF	Tumor Necrosis Faktor
TR	Thioredoxin-Reduktase
TSH	Thyrotropin
UTR	untranslatierte Region
X-Gal	5-Chor-4-Brom-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid

---

## G Literaturverzeichnis

- Aarts**, M. M., Levy, D., He, B., Stregger, S., Chen, T., Richard, S., Henderson, J. E. (1999a) Parathyroid hormone-related protein interacts with RNA. *J. Biol. Chem.* 274(8), 4832-4838.
- Aarts**, M. M., Rix, A., Guo, J., Bringham, R., Henderson, J. E. (1999b) The nucleolar targeting signal (NTS) of parathyroid hormone-related protein mediates endocytosis and nucleolar translocation. *J. Bone Miner. Res.* 14(9), 1493-1503.
- Adams**, J. S., Ren, S. Y. (1996) Autoregulation of 1,25-dihydroxyvitamin D synthesis in macrophage mitochondria by nitric oxide. *Endocrinology* 137, 4514-4517.
- Adunyah**, S. E. (1993) Granulocyte-macrophage colony stimulating factor stimulates rapid phosphorylation of tyrosines in human U937 and HL-60 leukemic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193(3), 890-896.
- Adunyah**, S. E., Unlap, T. M., Wagner, F., Kräft, A. S. (1991) Regulation of c-jun expression and AP-1 enhancer activity by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Biol. Chem.* 266(9), 5670-5675.
- Amling**, M., Neff, L., Tanaka, S., Inoue, D., Kuida, K., Weir, E., Philbrick, W. M., Broadus, A. E., Baron, R. (1997) Bcl-2 lies downstream of parathyroid hormone-related peptide in a signaling pathway that regulates chondrocyte maturation during skeletal development. *J. Cell. Biol.* 136(1), 205-213.
- Andersson**, M., Gunne, H., Agerberth, B., Boman, A., Bergman, T., Sillard, R., Jornvall, H., Mutt, V., Olsson, B., Wigzell, H. (1995) NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity. *EMBO J.* 14, 1615-1625.
- Andersson**, M., Holmgren, A., Spyrou, G. (1996) NK-lysin, a disulfide-containing effector peptide of T-Lymphocytes, is reduced and inactivated by human thioredoxin reductase. Implication for a protective mechanism against NK-lysin cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 271, 10116-10120.
- Angel**, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P., Karin, M. (1987) Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49, 729-739.
- Angel**, P., Karin, M. (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* 1072, 129-157.
- Arteel**, G. E., Briviba, K., Sies, H. (1999) Function of thioredoxin reductase as a peroxynitrite reductase using selenocystine or ebselen. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 264-269.
- Arteel**, G. E., Mostert, V., Oubrahim, H., Briviba, K., Abel, J., Sies, H. (1998) Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration. *Biol. Chem.* 379(8-9), 1201-1205.
- Ashkar**, S., Weber, G. F., Panoutsakopoulou, V., Sanchirico, M. E., Jansson, M., Zawaideh, S., Rittling, S. R., Denhardt, D. T., Gimcher, M. J., Cantor, H. (2000) Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* 287(5454), 860-864.

- 
- Avissar**, N., Ornt, D. B., Yagil, Y., Horowitz, S., Watkins, R.H., Kerl, E. A., Takahashi, K., Palmer, I. S., Cohen, H. J. (1994) Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am. J. Physiol.* 266, C367-C375.
- Axen**, E. (1995a) Purification from pig kidney of a microsomal cytochrome P450 catalyzing 1 $\alpha$ -hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *FEBS Lett.* 375, 277-279.
- Axen**, E., Postlind, H., Wikvall, K. (1995b) Effects on CYP27 mRNA expression in rat kidney and liver by 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, a suppressor of renal 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215, 136-141.
- Baeuerle**, P. A., Baltimore, D. (1996) NF- $\kappa$ B: Ten years after. *Cell* 87, 13-20.
- Baeuerle**, P. A., Henkel, T. (1994) Function and activation of NF- $\kappa$ B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 141-179.
- Bahram**, F., Wu, S., Oberling, F., Lüscher, B., Larsson, L. G. (1999) Posttranslational regulation of Myc function in response to phorbol ester/interferon-gamma-induced differentiation of v-Myc-transformed U-937 monoblasts. *Blood* 93(11), 3900-3912.
- Baker**, A., Payne, C. M., Briehl, M. M., Powis, G. (1997) Thioredoxin, a gene found overexpressed in human cancer, inhibits apoptosis in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 57, 5162-5167.
- Baroni**, A., Rucco, V., De Paolis, P., Cicatiello, L., Esimi, H., Tufano, M. A. (1999) Ketoconazole inhibits lipopolysaccharide-induced activation of the nitric oxide synthase gene in the murine macrophage cell line J774. *Arch. Dermatol. Res.* 291(1), 54-58.
- Behne**, D., Kyriakopoulos, A., Meinhold, H., Köhrle, J. (1990) Identification of type 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 1143-1149.
- Behne**, D., Weiler, H., Kyriakopoulos, A. (1996) Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. *J. Reprod. Fertil.* 106(2), 291-297.
- Behne**, D., Weiss Nowak, C., Westphal, C., Gessner, H., Kyriakopoulos, A. (1995) Studies on the distribution and characteristics of new selenium-containing proteins. *Analyst* 120, 823-825.
- Beilstein**, M. A., Vendeland, S. C., Barofsky, E., Jensen, O. N., Wanger, P. D. (1996) Selenoprotein W of rat muscle binds glutathione and an unknown small molecular weight moiety. *J. Inorg. Biochem.* 61(2), 117-124.
- Bell**, N. H. (1998) Renal and nonrenal 25-hydroxyvitamin D-1 $\alpha$ -hydroxylases and their clinical significance. *J. Bone Min. Res.* 13(3), 350-353.
- Bellido**, T., O'Brien, C. A., Roberson, P. K., Manolagas, S. C. (1998) Transcriptional activation of the p21 (WAF1, CIP1, SDI1) gene by interleukin-6 type cytokines. A prerequisite for their pro-differentiating and anti-apoptotic effects on human osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.*, 273(33), 21137-21144.
- Bellows**, C. G., Reimers, S. M., Heersche, J. N. (1999) Expression of mRNAs for type-I collagen, bone sialoprotein, osteocalcin, and osteopontin at different stages of osteoblastic differentiation and their regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Cell. Tissue Res.* 297(2), 249-259.
- Berry**, M. J., Banu, L., Chen, Y. Y., Mandel, S. J., Kieffer, J. D., Harney, J. W., Larsen, P. R. (1991b) Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature* 353, 273-276.

- 
- Berry, M. J., Kieffer, J. D., Larsen, P. R. (1991c)** Evidence that cysteine, not selenocysteine is in the catalytic site of type II iodothyronine deiodinase. *Endocrinology* 129, 550-552.
- Beutler, E. (1975)** Glutathione peroxidase (GSH-Px). *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*, Grune and Stratton, New York, p71-73.
- Bikle, D. D., Sr eekumar, P. ( 1993)** Vitamin D, calcium, and epidermal differentiation. *Endocr. Rev.* 14, 3-18.
- Biskobing, D. M., Fan, D., Rubin, J. (1997)** c-fms mRNA is regulated posttranscriptionally by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in HL-60 cells. *Calc. Tissue Int.* 61, 205-209.
- Blind, E., Bambino, T., Nissenson, R. A. (1995)** Agonist-stimulated phosphorylation of the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein. *Endocrinology* 136, 4271-4277.
- Blomme, E. A., Zhou, H., Kartsogiannis, V., Capen, C. C., Rosol, T.J. (1999)** Spatial and temporal expression of parathyroid hormone-related protein during wound healing. *J. Invest. Dermatol.* 112, 788-795.
- Böck, A., Forchhammer, K., Heider, J., Baron, C. (1991)** Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. *Trends Biochem. Sci.* 16, 463-467.
- Bosch, X. ( 1998)** Hypercalcemia due to endogenous overproduction of 1,25-dihydroxyvitamin D in crohn's disease. *Gastroenterology* 114, 1061-1065.
- Bösl, M. R., Takaku, K., Oshima, M., Nishimura, S., Taketo, M. M. (1997)** Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (Trsp). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5531-5534.
- Bouillon, R., Okamura, W. H., Norman, A. W. (1995)** Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr. Rev.* 16, 200-257.
- Bradford, M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brigelius-Flohé, R., Aumann, K. D., Blocker, H., Gross, G., Kiess, M., Kloppe, K. D., Maiorino, M., Roveri, A., Schuckelt, R., Ursini, F. (1994)** Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 269, 7342-7348.
- Bruch, H. R., Wolf, L., Budde, R., Romalo, G., Schweikert, H. U. (1992)** Androstenedione metabolism in cultured human osteoblast-like cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75(1), 101-105.
- Buettner, C., Harney, J. W., Larsen, P. R. (1998)** The 3'-untranslated region of human type 2 iodothyronine deiodinase mRNA contains a functional selenocysteine insertion sequence element. *J. Biol. Chem.* 273(50), 33374-33378.
- Bunce, C. M., Brown, G., Hewison, M. ( 1997)** Vitamin D and hematopoiesis. *Trends Endocrinol. Metabol.* 8, 245-251.
- Burk, R. F., Hill, K. E., Awad, J. A., Morrow, J. D., Kato, T., Cockell, K. A. and Lyons, P. R. (1995)** Pathogenesis of diquat-induced liver necrosis in selenium-deficient rats: assessment of the roles of lipid peroxidation and selenoprotein P. *Hepatology*, 21, 561-569.
- Burk, R. F., Hill, K. E., Read, R., Bellw, T. (1991)** Response of rat selenoprotein P to selenium administration and fate of its selenium. *Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*

- 
- Burk**, R. F., Lawrence, R. A., Lane, J. M. (1980) Liver necrosis and lipid peroxidation in the rat due to paraquat and diquat: effect of selenium deficiency. *J. Clin. Invest.* 65, 1024-1031.
- Butler**, W. T. (1989) The nature and significance of osteopontin. *Connect Tissue Res.* 23, 123-136.
- Chambers**, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Afara, N., McBain, W., Harrison, P. R. (1986) The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *EMBO J.* 5, 1221-1227.
- Chang**, P. L., Ridall, A. L., Prince, C. W. (1994) Calcitriol regulation of osteopontin expression in mouse epidermal cells. *Endocrinology* 135, 863-869.
- Chaudiere**, J., Tappel, A. L. (1984) Interaction of gold(I) with the active site of selenium-glutathione peroxidase. *J. Inorg. Biochem.* 20, 313-325.
- Chen**, K. S., DeLuca, H. F. (1995) Cloning of the human 1- $\alpha$  25 dihydroxyvitamin D-3 24 hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements. *Biochim. Biophys. Acta* 1263, 1-9.
- Chen**, T. L., Chang, L. Y., Bates, R. L., Perlman, A. J. (1991) Dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> modulation of insulin-like growth factor-binding proteins in rat osteoblast-like cell cultures. *Endocrinology* 128(1), 73-80.
- 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.
- Chien**, A., Edgar, D. B., Trela, J. M. (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* 127(3), 1550-1557.
- Chomczynski**, P., Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Chowdhury**, K. (1991) One step 'miniprep' method for the isolation of plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 19, 2792.
- Chu**, F. F., de Silva, R., Esworthy, R. S., Boteva, K. K., Walters, C. E., Roses, A., Rao, P. N., Pettenati, M. J. (1996) Polymorphism and chromosomal localization of the GI-form of human glutathione peroxidase (GPX2) on 14q24.1 by in situ hybridization. *Genomics* 32(2), 272-276.
- Chu**, F. F., Doroshov, J. H., Esworthy, R. S., (1992a) Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase,

- 
- Chu, F. F.**, Es worthy, R. S. (1995) The expression of an intestinal form of glutathione peroxidase (GSHPx-GI) in rat intestinal epithelium. *Arch. Biochem. Biophys.* 323, 288-295.
- Chu, F. F.**, Esworthy, R. S., Doro show, J. H., Doan, K., Li u, X. F. (1992b) Expression of plasma glutathione peroxidase in human liver in addition to kidney, heart, lung, and breast in humans and rodents. *Blood* 79, 3233-3238.
- Civitelli, R.**, Kim, Y. S., Gunsten, S. L., Fujimori, A., Huskey, M., Avioli, L. V., Hruska, K. A. (1990) Nongenomic activation of the calcium message system by vitamin D metabolites in osteoblast-like cells. *Endocrinology* 127(5), 2253-2262.
- Collins, S. J.**, Ruscetti, F. W., Gallagher, R. E., Gallo, R. C. (1978) Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2458-2462.
- Copeland, P. R.**, Fletcher, J. E., Carlson, B. A., Hatfield, D. L., Driscoll, D. M. (2000) A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. *EMBO J.* 19(2), 306-314.
- 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.
- Croteau, W.**, Davey, J. C., Galton, V. A., St. Germain, D. L. (1996) Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. *J. Clin. Invest.* 98, 405-417.
- Croteau, W.**, Whittemore, S. K., Schneider, M. J., St. Germain, D. L. (1995) Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase. *J. Biol. Chem.* 270, 16569-16575.
- Darnay, B. G.**, Haridas, V., Ni, J., Moore, P. A., Aggarwal, B. B. (1998) Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* 273(32), 20551-20555.
- Darwish, H. M.**, DeLuca, H. F. (1996) Recent advances in the molecular biology of vitamin D action. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 53, 321-344.
- Das, K. C.**, Guo, X. L., White, C. W. (1999) Induction of thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in lungs of newborn primates by oxygen. *Am. J. Physiol.* 276, 530-539.
- Doyle, S. E.**, Gasson, J. C. (1998) Characterization of the role of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha subunit in the activation of JAK2 and STAT5. *Blood* 92(3), 867-876.
- Dreher, I.**, Jakobs, T. C., Köhrle, J. (1997b) Cloning and characterization of the human selenoprotein P promoter. *J. Biol. Chem.* 272, 29364-29371.
- 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.
- Duckett, C. S.**, Perkins, N. D., Leung, K., Agranoff, A. B., Nabel, G. J. (1995) Cytokine induction of nuclear factor kappa B in cycling and growth-factor arrested cells. Evidence for cell-cycle independent activation. *J. Biol. Chem.* 270(32), 18836-18840.
- Eberle, B.**, Haas, H. J. (1993) Purification of selenoprotein Ph from human plasma *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 7, 217-221.

- 
- Ebert-Dümig, R.**, Schütze, N., Jakob, F. (1999) The thioredoxin reductase/thioredoxin system in cells of the monocyte/macrophage pathway of differentiation. *Biofactors* 10, 227-235.
- Eisman, J. A.** (1999) Genetics of osteoporosis. *Endocr. Rev.* 20, 788-804.
- Ellis, R. D.**, Goodlad, J. R., Limb, G. A., Powell, J. J., Thompson, R. P., Punc hard, N. A. (1998) Activation of nuclear factor kappa B in Crohn's disease. *Inflamm. Res.* 47(11), 440-445.
- Felgner, P. L.**, Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., Danielsen, M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7413-7417
- Felix, R.**, Cecchini, M. G., Fleisch, H. (1990) Macrophage colony stimulating factor restores in vivo bone resorption in the op/op osteopetrotic mouse. *Endocrinology* 127(5), 2592-2594.
- Ferret, P. J.**, Soum, E., Negre, O., Wollman, E. E., Fadelizi, D. (2000) Protective effect of thioredoxin upon NO-mediated cell injury in THP1 monocytic human cells. *Biochem. J.* 346(Pt 3), 759-765.
- Fisher, L. W.**, Stubbs, III J. T., Young, M. F. (1995) Antisera and cDNA probes to human and certain animal model bone matrix noncollagenous proteins. *Acta Orthop. Scand. Suppl.* 66(266), 61-65.
- Flohé, L.**, Günzler, W., Schock, H. H., (1973): Glutathione peroxidase, a selenoenzyme. *FEBS Lett.* 32, 132-134.
- Forchhammer, K.**, Leinfelder, W., Böck, A. (1989) Identification of a novel translation factor necessary for the incorporation of selenocysteine into protein. *Nature* 342, 453-456.
- Forchhammer, K.**, Rücknagel, P., Böck, A. (1990), Purification and biochemical characterization of SELB, a translation factor involved in selenoprotein synthesis. *J. Biol. Chem.* 265, 9346-9350.
- Franke, K. W.** (1935) Effect of feeding toxic stuffs in varying amounts, and for different time periods *J. Nutr.* 10, 223-231.
- Franke, K. W.**, Potter, v. R. (1935) A new toxicant occurring naturally in certain samples of plant food stuffs. IX. Toxic effects orally ingested selenium. *J. Nutr.* 10, 213-221.
- Freedman, L. P.**, Arce, V., Perez Fernandez, R. (1994) DNA sequences that act as high affinity targets for the vitamin D3 receptor in the absence of the retinoid X receptor. *Mol. Endocrinol.* 8(3), 265-273.
- Fritsche, J.**, Rehli, M., Krause, S. W., Andreesen, R., Kreutz, M., (1997) Molecular cloning of a 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3-inducible transcript (ddVit 1) in human blood monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 407-412.
- Fu, G. K.**, Lin, M., Zhang, M. Y. H., Bikle, D. D., Shackleton, C. H. L., Miller, W. L., Portale, A. A. (1997) Cloning of human 25-hydroxyvitamin D-1 $\alpha$ -hydroxylase and mutations causing vitamin D-dependent rickets type 1. *Mol. Endocrinol.* 11(13), 1961-1970.
- Galter, D.**, Mihm, S., Dörge, W. (1994) Distinct effects of glutathione disulphide on the nuclear transcription factors  $\kappa$ B and the activator protein-1. *Eur. J. Biochem.* 221, 639-648.
- Gasdaska, J. R.**, Gasdaska, P. Y., Gallegos, A., Powis, G. (1996) Human thioredoxin

- 
- Gasdaska**, P. Y., Berggren, M. M., Berry, M. J., Powis, G. (1999) Cloning, sequencing and functional expression of a novel human thioredoxin reductase. *FEBS Lett.* 442, 105-111.
- Gasdaska**, P. Y., Gasdaska, J. R., Cochran, S., Powis, G. (1995) Cloning and sequencing of a human thioredoxin reductase. *FEBS Lett.* 373, 5-9.
- Gladyshev**, V. N., Jeang, K. T., Stadtman, T. C. (1996) Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 6146-6151.
- Gladyshev**, V. N., Jeang, K. T., Wootton, J. C., Hatfield, D. L. (1998) A new selenium containing protein - purification, characterization and cDNA sequence. *J. Biol. Chem.* 273, 8910-8915.
- Goldstone**, S. D., Hunt, N. H. (1997) Redox regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway during lymphocyte activation. *Biochim. Biophys. Acta* 1355(3), 353-360.
- Görlich** D., Kutay, U. (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 15, 607-660.
- Görlich**, D. (1998) Transport into and out of the cell nucleus. *EMBO J.* 17(10), 2721-2727.
- Grandison**, L., Nolan, G. P., Pfaff, D. W. (1994) Activation of the transcription factor NF $\kappa$ B in GH3 pituitary cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 106, 9-15.
- Greenberg**, M. E., Ziff, E. B. (1984) Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos protooncogene. *Nature* 311(5985), 433-438.
- Griffin**, G. E., Leung, K., Folks, T. M., Kunkel, S., Nabel, C. J. (1989) Activation of HIV gene expression during monocyte differentiation by induction of NF- $\kappa$ B. *Nature* 339, 70-73.
- Grigoriadis**, A. E., Schellander, K., Wang, Z. Q., Wagner, E. F. (1993) Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. *J. Cell Biol.* 122(3), 685-701.
- Gromer**, S., Arscott, L. D., Williams, C. H., Schirmer, R. H., Becker, K. (1998b) Human placenta thioredoxin reductase - Isolation of the selenoenzyme, steady state kinetics and inhibition by therapeutic gold compounds. *J. Biol. Chem.* 273, 20096-20101.
- Gromer**, S., Wissing, J., Behne, D., Ashman, K., Schirmer, R. H. (1998a) A hypothesis on the catalytic mechanism of the selenoenzyme thioredoxin reductase. *Biochem J.* 332, 591-592.
- Gross**, M., Oertel, M., Köhrle, J. (1995) Differential selenium-dependent expression of type I 5'-deiodinase and glutathione peroxidase in the porcine epithelial kidney cell line LLC-PK1. *Biochem. J.* 306, 851-856.
- Gross**, M., Oertel, M., Köhrle, J. (1995) Differential selenium-dependent expression of type I 5'-deiodinase and glutathione peroxidase in the porcine epithelial kidney cell line LLC-PK1. *Biochem. J.* 306(Pt 3), 851-856.
- Gu**, Q. P., Beistein, M. A., Barofsky, E., Ream, W., Whanger, P. D. (1999) Purification, characterization, and glutathione binding to selenoprotein W from monkey muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 361(1), 25-33.
- Gu**, Q. P., Sun, Y., Ream, L. W., Whanger, P. D. (2000) Selenoprotein W accumulates primarily in primate skeletal muscle, heart, brain and tongue. *Mol. Cell. Biochem.* 204(1-2), 49-56.



- 
- Guimaraes**, M. J., Peterson, D., Vicari, A., Cocks, B. G., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Ferrick, D. A., Kastlein, R. A., Bazan, J. F., Zlotnik, A. (1996) Identification of a novel selD homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 15086-15091.
- Haslinger**, A., Karin, M. (1985) Upstream promoter element of the human metallothionein-IIA gene can act like an enhancer element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 8572-8576.
- Hathcock**, J. N. (1997) Vitamins and minerals: efficacy and safety. *Am. J. Clin. Nutr.* 66, 427-437.
- Hauschka**, P. V., Reid, M. L. (1978) Vitamin D dependence of a calcium-binding protein containing gamma-carboxyglutamic acid in chicken bone. *J. Biol. Chem.* 253(24), 9063-9068.
- Hausler** M. R., Whitfield, G. K., Hausler, C. A., Hsieh, J. C., Thompson, P. D., Selznick, S. H., Dominguez, C. E., Jurutka, P. W. (1998) The nuclear vitamin D receptor: Biological and molecular regulatory properties revealed. *J. Bone Min. Res.* 13, 325-349.
- Heider**, J., Baron, C., Böck, A. (1992) Coding frame dissection: dissection of the mRNA determinants required for the incorporation of selenocysteine into protein. *EMBO J.* 11, 3759-3766.
- Heider**, J., Böck, A. (1993) Selenium metabolism in micro-organisms. *Adv. Microbiol. Physiol.* 35, 71-109.
- Henderson**, J. E., Amizuka, N., Warshawsky, H., Biasotto, D., Lanske, B. M., Goltzman, D., Karaplis, A. C. (1995) Nucleolar localization of parathyroid hormone-related peptide enhances survival of chondrocytes under conditions that promote apoptotic cell death. *Mol. Cell. Biol.* 15(8), 4064-4075.
- Herrman**, J. L. (1977) The properties of a rat serum protein labelled by the injection of sodium selenite. *Biochim. Biophys. Acta* 500, 61-70.
- Heslop**, K. E., Goswami-Sampson, M. A., Muller, D. P. R., Curzon, G. (1996) Serotonin metabolism and release in frontal cortex of rats on a vitamin E-deficient diet. *J. Neurochem.* 66, 860-864.
- Hill**, K. E., Chittum, H. S., Lyons, P. R., Boegl in, M. E., Burk, R. F. (1996a) Effect of selenium on selenoprotein P expression in cultured liver cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1313(1), 29-34.
- Hill**, K. E., Dasouki, M., Phillips, J. A., Burk, R. F. (1996b) Human selenoprotein P gene maps to 5q31. *Genomics* 36, 550-551.
- Hill**, K. E., Lyons, P. R., Burk, R. F. (1992) Differential regulation of rat liver selenoprotein mRNAs in selenium deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185, 260-263.
- Hill**, K. E., McCollum, G. W., Boegl in, M. E., Burk, R. F. (1997) Thioredoxin reductase activity is decreased by selenium deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234, 293-295.
- Hirota**, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K., Yodoi, J. (1997) AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and ref-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3633-3638.

- 
- Hiura, Y., Inaba, M., Nishizawa, Y., Otani, S., Morii, H. (1999)** Synergistic enhancement by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and di butyryl c AMP of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> action in human promyelocytic leukemic HL-60 cells. *Endocr. J.* 46(2), 317-324.
- Hmama, Z., Nandan, D., Sly, L., Knuts on, K. L., H errera-Velit, P., R einer, N. E. (1999)** 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced myeloid cell differentiation is regulated by a vitamin D r eceptor-phosphatidylinositol 3- kinase s ignaling c omplex. *J. Ex p. M ed.* 190(11), 1583-1594.
- Ho, Y.-S., Magnenat, J.-L., Bronson, R. T., Cao, J., Gargano, M., Sugawara, M., Funk, C. D. (1997)** Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J. Biol. Chem.* 272, 16644-16651.
- Hoek, A., Al laerts, W., Leenen, P. J., Schoemaker, J., Drexhage, H. A. (1997)** Dendritic cells and macrophages in the pi tuitary and the gonads . Evidence for their role in the fine regulation of the reproductive endocrine response. *Eur. J. Endocrinol.* 136(1), 8-24.
- Hofbauer, L. C., D unstan, C. R., Spel sberg, T. C., R iggs, B. L., Khos la, S. ( 1998)** Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone m orphogenetic pr otein-2, and c ytokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250(3), 776-781.
- Holick, M. F., MacLaughlin, J. A., Clark, M. B., Holick, S. A., Potts, J. T. Jr, Anderson, R. R., Blank, I. H., Parrish, J. A., Elias, P. ( 1980)** Photosynthesis of previtamin D<sub>3</sub> in human skin and the physiologic consequences. *Science* 210(4466), 203-205.
- Holmgren, A. ( 1989)** Thioredoxin and gl utaredoxin system s. *J. Biol. Chem.* 264, 13963-13966.
- Holmgren, A., Björnstedt, M. ( 1996)** Thioredoxin and thi oredoxin r eductase. *Methods Enzymol.* 252, 199-208.
- Hori, K., Ha tfield, D., M aldarelli, F., Lee, B. J., C louse, K. A. ( 1997)** Sel enium supplementation suppresses tumor nec rosis f actor  $\alpha$ -induced hum an immunodeficiency virus type 1 replication in vitro. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 13(15), 1325-1332.
- Housteck, J., Vizek, K., Pavelka, S., Kopecky, J., Krejcova, E., Hermanska, J., Cermakova, M. (1993)** Type II iodothyronine 5'-deiodinase and uncoupling protein in brown adipose tissue of human newborns. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77, 382-387.
- Huang, W., Akesson, B., Svensson, B. G., Sch üt z, A., Bur k, R. F., Sk erfving, S. ( 1995)** Selenoprotein P and gl utathione per oxidase ( EC1.11.1.9) i n pl asma as i ndices of selenium status in relation to the intake of fish. *Brit. J. Nutr.* 73, 455-461.
- Hubert, N., Walczak, R., Carbon, P., Kr ol, A. ( 1996)** A pr otein bi nds the sel enocysteine insertion element in the 3'- UTR of selenoprotein mRNAs. *Nucleid Acids Re s.* 24(3), 464-469.
- Hugot, J. P., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Olson, J. M., Lee, J. C., Beaugerie, L., Naom, I., Dupas, J. C., Van Gossum, A., Orholm, M., Bonaiti-Pellie, C., Weissenbach, J., Mathew, C. G., Lennard-Jones, J. E., Cortot, A., Colombel, J. F., Thomas, G. (1996)** Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on Chromosome 16. *Nature* 379: 821.
- Hyslop, P. A., Hinshaw, D. B., Scraufstatter, I. U., Cochrane, C. G., Kunz, S., Vosbeck, K. (1995)** Hydrogen per oxide as a potent bac teriostatic anti biotic: i mplications f or hos t

- 
- Ishioka, S., Sai to, T., Hi yama, K., H aruta, Y., M aeda, A., H ozawa, S., Inamizu, T., Yamakido, M. (1996)** Increased expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6, platelet-derived growth factor-B and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA in cells of bronchoalveolar lavage fluids from patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis.* 13(2), 139-145.
- Jakob, F., Homann, D., Adam ski, J. (1995a)** Expression and regulation of aromatase cytochrome P450 and 17  $\beta$ -dehydrogenase type IV in human THP 1 leukemia cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 55 (5/6), 555-563.
- Jakob, F., Homann, D., Seuf ert, J., Sc hneider, D., K öhrle, J. (1995b)** Expression and regulation of CYP p450 aromatase in vitamin D-differentiated THP 1 human myeloid leukemia cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 110, 27-33.
- Jakob, F., Seuf ert, J., Sar razin, C., Sc hneider, D., Köhrle, J., Tony H .-P. (1994)** Topoisomerase I-inhibition enhances vitamin D-responsive expression of the receptor for lipopolysaccharide binding protein CD 14. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 199, 531-539.
- Jany, B., Betz, R., Schreck, R. (1995)** Activation of the transcription factor NF-kappa B in human tracheobronchial epithelial cells by inflammatory stimuli. *Eur. Respir. J.* 8, 387-391.
- Jeon, K. I., Jeong, J. Y., Jue, D. M. (2000)** Thiol-reactive metal compounds inhibit NF-kappa B activation by blocking Ikappa B kinase. *J. Immunol.* 164(11), 5981-5989.
- John, M., Weber, M., Schmitt, S., Al Iolio, B., Bl ind, E. (1999)** Characterization of inositol phosphate signaling of PTH1/PTH2 receptor hybrids. *J. Bone Miner. Res.* 14, suppl 1: S419 (Abstract SA 438).
- Jones, R. E., Chatham, W. W. (1999)** Update on sarcoidosis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 11(1), 83-87.
- Jornot, L., Junod, A. F. (1997)** Hydroperoxia, unlike phorbol ester, induces glutathione peroxidase through a protein kinase C-independent mechanism. *Biochem. J.* 326, 117-123.
- Joun, H., Lanske, B., Kar perien, M., Qian, F., Defize, L., Abou- Samra, A. (1997)** Tissue-specific transcription start sites and alternative splicing of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide (PTHrP) receptor gene: a new PTH/PTHrP receptor splice variant that lacks the signal peptide. *Endocrinology* 138(4), 1742-1749.
- Kalcklösch, M., Kyriakopoulos, A., Hammel, C., Behne, D. (1995)** A new selenoprotein found in the glandular epithelial cells of the rat parathyroid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217, 162-170.
- Kamimura, S., Gallieni, M., Zhong, M., Beron, W., Sl atopolsky, E., Dusso, A. (1995)** Microtubules mediate cellular 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> trafficking and the genomic response to 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in normal human monocytes. *J. Biol. Chem.* 270, 22160-22166.
- Karmali, R., Hewison, M., Rayment, R., (1991)** 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> regulates c-myc mRNA levels in tonsillar T-lymphocytes. *Immunology* 74, 589-593.
- Kavanaugh, A., St Clair, E. W., McCune, W. J., Braakman, T., Lipsky, P. (2000)** Chimeric anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  monoclonal antibody treatment of patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate therapy. *J. Rheumatol.* 27(4), 841-850.

- 
- Kawashima**, R., Mochida, S., Matsui, A., YouLuTuZ, Y., Ishikawa, K., Toshihima, K., Yamanobe, F., Inao, M., Ikeda, H., Ohno, A., Nagoshi, S., Uede, T., Fujiwara, K. (1999) Expression of osteopontin in kupffer cells and hepatic macrophages and stellate cells in rat liver after carbon tetrachloride intoxication: a possible factor for macrophage migration into hepatic necrotic areas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256(3), 527-531.
- Kelner**, M. J., Montoya, M. A. (1998) Structural organization of the human selenium-dependent phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene (GPX4): chromosomal localization to 19p13.3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249(1), 53-55.
- Kim**, I. Y., Stadtman, T. C. (1997) Inhibition of NF $\kappa$ B DNA binding and nitric oxide induction in human T cells and lung adenocarcinoma cells by selenite treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12904-12907.
- Kim**, S. Y., Angel, P., Lafyatis, R., Hattori, K., Kim, K. Y., Sporn, M. B., Karin, M., Roberts, A. B. (1990) Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol. Cell. Biol.* 10 (4), 1492-1497.
- Kitanaka**, S., Takeyama, K., Murayama, A., Sato, T., Okumura, K., Nogami, M., Hasegawa, Y., Niimi, H., Yanagisawa, J., Tanaka, T., Kato, S. (1998) Inactivating mutations in the 25-hydroxyvitamin D 3 1 $\alpha$ -hydroxylase gene in patients with pseudovitamin D-deficiency rickets. *N. Engl. J. Med.* 338(10), 653-661.
- Koeffler**, H. P., Bishop, J. E., Reichel, H., Singer, F., Nagler, A., Tobler, A., Wilka, M., Norman, A. W. (1990) Lymphocyte cell lines from vitamin D-dependent rickets type II show functional defects in the 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 26, 1-11.
- Köhrle**, J. (1999) Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Mol. Cell. Endocrinol.* 151, 103-119.
- Köhrle**, J., Rasmussen, U. B., Eckenbarger, D. M., Alex, S., Rokos, H., Hesch, R. D., Leonard, J. L. (1990a) Affinity labeling of rat liver and kidney type I 5'-deiodinase. Identification of the 27 kDa substrate binding subunit. *J. Biol. Chem.* 265, 6155-6163.
- Köhrle**, J., Rasmussen, U. B., Rokos, H., Leonard, J. L., Hesch, R. D. (1990b) Selective affinity labeling of a 27 kDa integral membrane protein in rat liver and kidney with N-bromoacetyl derivatives of L-thyroxine and 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine. *J. Biol. Chem.* 265, 6146-6154.
- Koyama**, T., Shibakura, M., Ohsawa, M., Kamiyama, R., Hirosawa, S., (1998) Anticoagulant effects of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on human myelogenous leukemia cells and monocytes. *Blood* 92, 160-167.
- Kreutz**, M., Hennemann, B., Ackermann, U., Grage-Griebenow, E., Krause, S. W., Andreesen, R. (1999) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor modulates lipopolysaccharide (LPS)-binding and LPS-response of human macrophages: inverse regulation of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-10. *Immunology* 98(4), 491-496.
- Kumar**, S., Rabson, A. B., Celinas, C. (1992) The RXXRXRXXC motif conserved in all Rel $\kappa$ B proteins is essential for the DNA-binding activity and redox-regulation of the v-Rel oncoprotein. *Mol. Cell. Biol.* 12, 3094-3106.
- Kyriakopoulos**, A., Kalcklösch, M., Weiss-Nowak, C., Behne, D. (1993) Studies on 16 kDa selenium-containing proteins enriched by means of preparative electrophoresis.

- 
- Lacey**, D. L., Timms, E., Tan, H. L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y. X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J., Boyle, W. J. (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93(2), 165-176.
- Laemmli**, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lagasse**, E., Weissman, I. L. (1997) Enforced expression of Bcl-2 in monocytes rescues macrophages and partially reverses osteopetrosis in op/op mice. *Cell* 89(7), 1021-1031.
- Lam**, M. H., Briggs, L. J., Hu, W., Martin, T. J., Gillespie, M. T., Jans, D. A. (1999a) Importin beta recognizes parathyroid hormone-related protein with high affinity and mediates its nuclear import in the absence of importin alpha. *J. Biol. Chem.* 274(11), 7391-7398.
- Lam**, M. H., House, C. M., Tiganis, T., Mitchelhill, K. I., Sarcevic, B., Cures, A., Ramsay, R., Kemp, B. E., Martin, T. J., Gillespie, M. T. (1999b) Phosphorylation at the cyclin-dependent kinases site (Thr85) of parathyroid hormone-related protein negatively regulates its nuclear localization. *J. Biol. Chem.* 274(26), 18559-18566.
- Langston**, G. G., Swain, L. D., Schwartz, Z., Del Toro, F., Gomez, R., Boyan, B. D. (1990) Effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on calcium influxes in chondrocyte cultures. *Calcif. Tissue Int.* 47(4), 230-236.
- Lanske**, B., Amling, M., Neff, L., Guiducci, J., Baron, R., Kronenberg, H. M. (1999). Ablation of the PTHrP gene or the PTH/PTHrP receptor gene leads to distinct abnormalities in bone development. *J. Clin. Invest.* 104, 399-407.
- Lee**, B. J., Rajagopalan, M., Kim, Y. S., You, K. H., Jacobson, K. B., Hatfield, D. (1990) Selenocysteine tRNA [Ser]<sup>Sec</sup> gene is ubiquitous within the animal kingdom. *Mol. Cell. Biol.* 10(5), 1940-1949.
- Lee**, S. K., Lorenzo, J. A. (1999) Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* 140(8), 3552-3561.
- Leeson**, A., Mehta, A., Singh, R., Chisolm, G. M., Driscoll, D. M. (1997) An RNA-binding protein recognizes a mammalian selenocysteine insertion sequence element required for cotranslational incorporation of selenocysteine. *Mol. Cell. Biol.* 17(4), 1977-1985.
- Leinfelder**, W., Zeherlein, E., Mandrand-Berthelot, M.-A., Böck, A. (1988), Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine. *Nature* 331, 723.
- Li**, J., Sarosi, I., Yan, X. Q., Morony, S., Capparelli, C., Tan, H. L., McCabe, S., Elliott, R., Scully, S., Van, G., Kaufman, S., Juan, S. C., Sun, Y., Tarpley, J., Martin, L., Christensen, K., McCabe, J., Kostenuik, P., Hsu, H., Fletcher, F., Dunstan, C. R., Lacey, D. L., Boyle, W. J. (2000) RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(4), 1566-1571.
- Liu**, M., Lee, M. H., Cohen, M., Bommakanti, M., Freedman, L. P. (1996) Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes & Development* 10, 142-153.
- Loose**, D. S., Kan, P. B., Hirst, M. A., Marcus, R. A., Feldman, D. (1983) Ketoconazole

- 
- Low, S. C., Berry, M. J.** (1996) Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 21, 203-207.
- Low, S. C., Harney, J. W., Berry, M. J.** (1995) Cloning and functional characterization of human selenophosphate synthetase, an essential component of selenoprotein synthesis. *J. Biol. Chem.* 270(37), 21659-21664.
- Lundstrom-Ljung, J., Birnbach, U., Rupp, K., Soling, H. D., Holmgren, A.** (1995) Two resident ER-proteins, CaBP1 and CaBP2, with thioredoxin domains, are substrates for thioredoxin reductase: comparison with protein disulfide isomerase. *FEBS Lett.* 357(3), 305-308.
- Luthman, M., Holmgren, A.** (1982) Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterisation. *Biochemistry* 21, 6628-6633.
- MacLaughlin, J. A., Anderson, R. R., Holic, M. F.** 1982 Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of provitamin D<sub>3</sub> and its photoisomers in human skin. *Science* 216(4549), 1001-1003.
- Maenpaa, P., Mahonen, A., Pirskanen, A.** (1991) Hormonal regulation of vitamin D receptor levels and osteocalcin synthesis in human osteosarcoma cells. *Calcif. Tissue Int.* 49, 85-86.
- Maiorino, M., Gregolin, C., Ursini, F.** (1990) Phospholipid glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 186 (47), 448-457.
- Maiorino, M., Roche, C., Kiess, M., Koenig, K., Gawlik, D., Matthes, M., Naldini, E., Pierce, R., Flohe, L.** (1996) A selenium-containing phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase in *Schistosoma mansoni*. *Eur. J. Biochem.* 238(3), 838-844.
- Maiorino, M., Ursini, F., Leonelli, M., Finato, N., Gregolin, C.** (1982) A pig heart peroxidation inhibiting protein with glutathione peroxidase activity on phospholipid hydroperoxide. *Biochem. Int.* 5, 557-583.
- Maiorino, M., Wissing, J. B., Brigelius-Flohe, R., Calabrese, F., Roveri, A., Steiert, P., Ursini, F., Flohe, L.** (1998) Testosterone mediates expression of the selenoprotein PHGPx by induction of spermatogenesis and not by direct transcriptional gene activation. *FASEB J.* 12(13), 1359-1370.
- Makino, Y., Yoshikawa, N., Okamoto, K., Hirota, K., Yodoi, J., Makino, I., Tanaka, H.** (1999) Direct association with thioredoxin allows redox regulation of glucocorticoid receptor function. *J. Biol. Chem.* 274, 3182-3188.
- Mannstadt, M., Juppner, H., Gardella, T. J.** (1999) Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. *Am. J. Physiol.* 277(5 Pt 2), F665-675.
- Marchaluk, E., Persson-Moschos, M., Thoring, E. B., Akesson, B.** (1995) Variation in selenoprotein P concentration in serum from different European regions. *Europ. J. Clin. Nutr.* 49, 42-48.
- Martin, G. W. III, Harney, J. W., Berry, M. J.** (1996) Selenocysteine incorporation in eukaryotes: Insights into mechanism and efficiency from sequence, structure, and spacing proximity studies of the type I deiodinase SECIS element. *RNA* 2, 171-182.
- Matsui, M., Oshima, M., Oshima, H., Takaku, K., Maruyama, T., Yodoi, J., Taketo, M. M.** (1996) Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev. Biol.* 178, 179-185.

- 
- McBride**, O. W., Mitchell, A., Lee, B. J., Mullenbach, G., Hatfield, D. L. (1988) Gene for selenium-dependent glutathione peroxidase maps to human chromosomes 3, 21 and X. *BioFactors* 1, 285-292.
- McKenzie**, R. C., Rafferty T. S., Beckett G. J. (1998) Selenium: an essential element for immune function. *Immunol. Today* 19, 342-345.
- Medhora**, M. M., Teitelbaum, S., Chappel, J., Alvarez, J., Mimura, H., Ross, F. P., Hruska, K. (1993) 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> up-regulates expression of the osteoclast integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3. *J. Biol. Chem.* 268, 1456-1461.
- Metcalf**, D. (1985) The granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Science*. 229, 16-22.
- Milewich**, L., Whisenant, M. G. (1982) Metabolism of androstenedione by human platelets: a source of potent androgens. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 54(5), 969-974.
- Mills**, G. G. (1959) The purification and properties of glutathione peroxidase of erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 234, 502-506.
- Mitomo**, K., Nakayama, K., Fujimoto, K., Sun, X., Seki, S., Yamamoto, K. (1994) Two different cellular redox systems regulate the DNA-binding activity of the p50 subunit of NF- $\kappa$ B in vitro. *Gene* 145, 197-203.
- Mizutani**, T., Kurata, H., Yamada, K., Totsuka, T. (1992) Some properties of murine selenocysteine synthase. *J. Biol. Chem.* 267, 827-834.
- Modolell**, M., Schaible, U. E., Rittig, M., Simon, M. M. (1994) Killing of *Borrelia burgdorferi* by macrophages is dependent on oxygen radicals and nitric oxide and can be enhanced by antibodies to outer surface proteins of the spirochete. *Immunol. Lett.* 40(2), 139-146.
- Monkawa**, T., Yoshida, T., Wakino, S., Shiniki, T., Anazawa, H., DeLuca, H. F., Suda, T., Hayashi, M., Saruta, T. (1997) Molecular cloning of cDNA and genomic DNA for human 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239(2), 527-533.
- Moscow**, J. A., Morrow, C. S., He, R., Mullenbach, G. T., Cowan, K. H. (1992) Structure and function of the 5'-flanking sequence of the human cytosolic selenium-dependent glutathione peroxidase gene (hgp1). *J. Biol. Chem.* 267, 5949-5958.
- Motchnik**, P. A., Tappel, A. L. (1989) Rat plasma selenoprotein P properties and purification. *Biochim. Biophys. Acta* 993, 27-35.
- Motsenbocker**, M.A., Tappel, A.L. (1982) A selenocysteine-containing selenium-transport protein in rat plasma. *Biochim. Biophys. Acta*, 709, 160-165.
- Muller**, R., Curran, T., Muller, D., Guilbert, L. (1985) Induction of c-fos during myelomonocytic differentiation and macrophage proliferation. *Nature* 314, 546-548.
- Mullis**, K. B., Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350.
- Murayama**, A., Takeyama, K., Kitahara, S., Kodera, Y., Hosoya, T., Kato, S. (1998) The promoter of the human 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase gene confers positive and negative responsiveness to PTH, calcitonin, and 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249(1), 11-16.
- Nagpal**, S., Athanikar, J., Chandraratna, R. A. S. (1995) Separation of transactivation and

- 
- Nakstad, B., Lyberg, T.** (1990) Characterization of cytoadhesion molecules on human monocytes and tissue macrophages. *Thromb. Res.* 60(1), 43-54.
- Nemere, I., Dormanen, M. C., Hammond, M. W., Okamura, W. H., Norman, A. W.** (1994) Identification of a specific binding protein for 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in basal-lateral membranes of chick intestinal epithelium and relationship to transcaltachia. *J. Biol. Chem.* 269(38), 23750-23756.
- Nemere, I., Schwartz, Z., Pedrozo, H., Sylvia, V. L., Dean, D. D., Boyan, B. D.** (1998) Identification of a membrane receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> which mediates rapid activation of protein kinase C. *J. Bone Miner. Res.* 13(9), 1353-1359.
- Neumann, M., Fries, H., Scheicher, C., Keikavoussi, P., Kolb-Maurer, A., Bröcker, E., Serfling, E., Kämpgen, E.** (2000) Differential expression of Rel/NF-kappaB and octamer factors is a hallmark of the generation and maturation of dendritic cells. *Blood* 95(1), 277-285.
- Newburger, P. E., Malawista, S. E., Dinauer, M. C., Gelbart, T., Woodman, R. C., Chada, S., Shen, Q., van Blaricom, G., Quie, P.G., Curnutte, J.T.** (1994) Chronic granulomatous disease and glutathione peroxidase deficiency, revisited. *Blood* 84, 3861-3869.
- Nishishita, T., Okazaki, T., Ishikawa, T., Igarashi, T., Hata, K., Ogata, E., Fujita, T.** (1998) A negative vitamin D response DNA element in the human parathyroid hormone-related peptide gene binds to vitamin D receptor along with Ku antigen to mediate negative gene regulation by vitamin D. *J. Biol. Chem.* 273(18), 10901-10907.
- Oblong, J. E., Gasdaska, P. Y., Sherrill, K., Powis, G.** (1993) Purification of human thioredoxin reductase: properties and characterization by adsorption and circular dichroism spectroscopy. *Biochemistry* 32, 7271-7277.
- O'Regan, A. W., Chupp, G. L., Lowry, J. A., Goetschkes, M., Mulligan, N., Berman, J. S.** (1999) Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J. Immunol.* 162(2), 1024-1031.
- Pallud, S., Lennon, A. M., Ramage, M., Gavaret, J. M., Croteau, W., Pierre, M., Courtin, F., St. Germain, D. L.** (1997) Expression of the type II iodothyronine deiodinase in cultured rat astrocytes is selenium-dependent. *J. Biol. Chem.* 272 (29), 18104-18110.
- Perkins, S. L., Kling, S. J., Ross, F. P., Teitelbaum, S. L.** (1995) 1,25 Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> stimulates differentiation of committed murine bone marrow-derived macrophage precursor cells. *Endocrinology* 136, 5643-5650.
- Persson-Moschos, M., Huang, W., Srikumar, T. S., Akesson, B.** (1995) Selenoprotein P in serum as a biochemical marker of selenium status. *Analyst* 120, 833-836.
- Pietarinen-Runtti, P., Lakari, E., Raivio, K. O., Kinnula, V. L.** (2000) Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278(1), C118-125.
- Ralston, S. H.** (1997) The genetics of osteoporosis. *Q. J. Med.* 90(4), 247-251.
- Ramage, M., Pallud, S., Esfandari, A., Gavaret, J.-M., Lennon, A.-M., Pierre, M., Courtin, F.** (1996) Evidence that type III iodothyronine deiodinase in rat astrocytes is a selenoprotein. *Endocrinology* 137, 3021-3025.
- Randolph, G. J., Beaulieu, S., Lebecque, S., Steinman, R. M., Muller, W. A.** (1998) Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282(5388), 480-483.



- 
- Rogler, G., Brand, K., Vogl, D., Page, S., Hofmeister, R., Andus, T., Kneuchel, R., Baeuerle, P. A., Scholmerich, J., Gross, V. (1998)** Nuclear factor kappa B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 115(2), 357-369.
- Rosen, A., P., Lundman, M., Carlsson, K., Bhavani, B. R., Srinivasa, G., Kjellstrom, K., Nilsson, A. (1995)** CD4+ T cell line-secreted factor, growth promoting for normal and leukemic B cells, identified as thioredoxin. *Int. Immunol.* 7, 625-633.
- Rossi, F. (1986)** The O<sub>2</sub>-forming NADPH oxidase of the phagocytes: nature, mechanisms of activation and function. *Biochim. Biophys. Acta* 853(1), 65-89.
- 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.
- Rots, N. Y., Liu, M., Anderson, E. C., Freedman, L. P. (1998)** A differential screen for ligand-regulated genes: identification of HoxA10 as a target of vitamin D3 induction in myeloid leukemic cells. *Mol. Cell. Biol.* 18, 1911-1918.
- Ruysschaert, J. M., Goormaghtigh, E., Homble, F., Andersson, M., Liepinsh, E., Otting, G. (1998)** Lipid membrane binding of NK-lysin. *FEBS Lett.* 425, 341-344.
- Safran, M., Farwell, A. P., Leonard, J. L. (1991)** Evidence that type II 5'-deiodinase is not a selenoprotein. *J. Biol. Chem.* 266(21), 13477-13480.
- Saito, Y., Hayashi, T., Tanaka, A., Watanabe, Y., Suzuki, M., Saito, E., Takahashi, K. (1999)** Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein P. *J. Biol. Chem.* 274(5), 2866-2871.
- Salvatore, D., Bartha, T., Harney, J. W., Larsen, P. R. (1996)** Molecular biological and biochemical characterization of the human type 2 selenodeiodinase. *Endocrinology* 137, 3308-3315.
- Salvatore, D., Low, S. C., Berry, M. J., Maia, A. L., Harney, J. W., Croteau, W., St.Germain, D. L. (1995)** Type 3 iodothyronine deiodinase: cloning, in vitro expression, and functional analysis of the placental selenoenzyme. *J. Clin. Invest.* 96, 2421-2430.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989)** Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edn, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977)** DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Santiso-Mere D., Sone, T., Hilliard 4<sup>th</sup>, G. M., Pike, J. W., McDonnell, D. P. (1993)**, Positive regulation of the vitamin D receptor by its cognate ligand in heterologous expression systems. *Mol. Endocrinol.* 7 833-839.
- Sato, K., Akaki, T., Tomioka, H. (1998)** Differential potentiation of anti-mycobacterial activity and reactive nitrogen intermediate-producing ability of murine peritoneal macrophages activated by interferon-gamma (IFN-gamma) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha). *Clin Exp Immunol.* 112(1), 63-68.
- Sato, K., Imaki, T., Toraya, S., Demura, H., Tanaka, M., Kasajima, T., Takeuchi, A., Kobayashi, T. (1993)** Increased 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub> concentration in a patient with malignancy-associated hypercalcemia receiving intravenous hyperalimentation inadvertently supplemented with vitamin D<sub>2</sub>. *Intern. Med.* 32(11), 886-890.

- 
- Schenk, H.**, Klein, M., Erdbrugger, W., Dröge, W., Schulze-Osthoff, K. (1994) Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1672-1676.
- Schenk, H.**, Vogt, M., Dröge, W., Schulze-Osthoff, K. (1996) Thioredoxin as a potent costimulus of cytokine expression. *J. Immunol.* 156, 765-771.
- Schipani, E.**, Karga, H., Karaplis, A. C., Potts, J. T., Kronenberg, H. M., Abou-Samra, A.-B. B., Segre, G. V., Jueppner, H. (1993) Identical complementary deoxyribonucleic acids encode a human rat and bone parathyroid hormone (PTH)-related peptide receptor. *Endocrinology* 132, 2157-2165.
- Schmidt, K. N.**, Amstad, P., Cerutti, P., Bauerle, P. A. (1995) The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *Chemistry & Biology* 2, 13-22.
- Schröder, M.**, Kahlen, J. P., Carlberg, C. (1997) Functional characterization of a novel type of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> response element identified in the mouse c-fos promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230(3), 646-651.
- Schreck, R.**, Bauerle, P. A. (1994) Assessing oxygen radicals as mediators in activation of inducible eukaryotic transcription factor NF- $\kappa$ B. *Methods Enzymol.* 234, 151-163.
- Schreck, R.**, Rieber, P., Bauerle, P. A. (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- $\kappa$ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10, 2247-2258.
- Schütze, N.**, Bachthaler, M., Lechner, A., Köhrle, J., Jakob, F. (1998b) Identification by differential display PCR of the selenoprotein thioredoxin reductase as a 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub>-responsive gene in human osteoblasts - regulation by selenite. *BioFactors* 7, 299-310.
- Schütze, N.**, Fritsche, J., Eberth-Dümig, R., Schneider, D., Andreesen, R., Krutz, M., Köhrle, J., Jakob, F. (1999) The selenoprotein thioredoxin reductase is expressed in peripheral blood monocytes and THP1 human myeloid leukemia cells - regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and selenite. *BioFactors* 10, 329-338.
- Schütze, N.**, Lechner, A., Groll, C., Siggelkow, H., Hufner, M., Köhrle, J., Jakob, F. (1998a) The human analog of murine cysteine-rich protein 61 [correction of 16] is a 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> responsive immediate early gene in human fetal osteoblasts: regulation by cytokines, growth factors, and serum. *Endocrinology* 139(4), 1761-1770.
- Schwartz, Z.**, Sylvia, V. L., Del Toro, F., Hardin, R. R., Dean, D. D., Boyan, B. D. (2000) 24R,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> mediates its membrane receptor-dependent effects on protein kinase C and alkaline phosphatase via a phospholipase A(2) and cyclooxygenase-1 but not cyclooxygenase-2 in growth plate chondrocytes. *J. Cell Physiol.* 182(3), 390-401.
- Schwarz, K.**, Foltz, C. M. (1957) Selenium is an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3292-3293.
- Sen, C. K.**, Packer, L. (1996) Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 10, 709-720.
- Seres, T.**, Ravichandran, V., Moriguchi, T., Rokutan, K., Thomas, J. A., Johnston Jr., R. B. (1996) Protein S-thiolation and dethiolation during the respiratory burst in human monocytes. A reversible post-translational modification with potential for buffering the effects of oxidant stress. *J. Immunol.* 156, 1973-1980.

- 
- Shen, Q., McQuilkin, P. A., Newburger, P. E.** (1995) RNA-binding proteins that specifically recognize the selenocysteine insertion sequence of human cellular glutathione peroxidase mRNA. *J. Biol. Chem.* 270(51), 30448-30452.
- Sies, H.** (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 217, 213-219.
- Sies, H.** (1997) Oxidative Stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82(2), 291-295.
- Siggelkow, H., Schulz, H., Kaesler, S., Benzler, K., Atkinson, M. J., Hüfner, M.** (1999) 1,25-dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub> attenuates the confluence-dependent differences in the osteoblast characteristic proteins alkaline phosphatase, procollagen I peptide, and osteocalcin. *Calcif. Tissue Int.* 64(5), 414-421.
- Song, X., Norman, A. W.** (1998) 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and phorbol ester mediate the expression of alkaline phosphatase in NB4 acute promyelocytic leukemia cells. *Leuk. Res.* 22(1), 69-76.
- Southern, E.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Spolarics, Z.** (1996) Endotoxin stimulates gene expression of ROS-eliminating pathways in rat hepatic endothelial and Kupffer cells. *Am. J. Physiol.* 270, G660-G666.
- Stadtman, T.C.** (1996) Selenocysteine. *Ann. Rev. Biochem.* 65, 83-100.
- St-Arnaud, R., Glorieux, F. H.** (1998) 24,25-dihydroxyvitamin D - active metabolite or inactive catabolite? *Endocrinology* 139(8), 3371-3374.
- St-Arnaud, R., Messerlian, S., Moir, J. M., Omdahl, J. L., Glorieux, F. H.** (1997) The 25-Hydroxyvitamin D 1-alpha-Hydroxylase gene maps to the pseudovitamin D-Deficiency rickets (PDDR) disease locus. *J. Bone Min. Res.* 12, 1552-1559.
- Subramaniam, M., Colvard, D., Keeting, P. E., Rasmussen, K., Riggs, B. L., Spelsberg, T. C.** (1992) Glucocorticoid regulation of alkaline phosphatase, osteocalcin, and proto-oncogenes in normal human osteoblast-like cells. *J. Cell Biochem.* 50(4), 411-424.
- Sun, Q. A., Wu, Y., Zappacosta, F., Jeang, K. T., Lee, B. J., Hatfield, D. L., Gladyshev, V. N.** (1999) Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. *J. Biol. Chem.* 274(35), 24522-24530.
- 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.
- Suva, L. J., Winslow, G. A., Wettenhall, R. E., Hammonds, R. G., Moseley, J. M., Diefenbach-Jagger, H., Rodda, C. P., Kemp, B. E., Rodriguez, H., Chen, E. Y., Hudson, P. J., Martin, J. T., Wood, W. I.** (1987) A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression. *Science* 237(4817), 893-896.
- Suzuki, T., Okuno, H., Yoshida, T., Endo, T., Nishina, H., Iba, H.** (1991) Difference in transcriptional regulatory function between c-Fos and Fra-2. *Nucleic Acids Res.* 19, 5537-5542.
- Swain, L. D., Schwartz, Z., Caulfield, K., Brooks, B. P., Boyan, B. D.** (1993) Nongenomic regulation of chondrocyte membrane fluidity by 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> is dependent on cell maturation. *Bone* 14(4), 609-617.
- Takahashi, K., Avissar, N., Whittin, J., Cohen, H.** (1987) Purification of human plasma

- 
- Tamura, T., Stadtman, T. C. (1995)** A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1006-1011.
- Thanos, D., Maniatis, T. (1995)** NF- $\kappa$ B: A lesson in family values. *Cell* 80, 529-532.
- Thompson, P. D., Jurutka, P. W., Haussler, C. A., Whitfield, G. K., Haussler, M. R. (1998)** Heterodimeric DNA binding by the vitamin D receptor and retinoid X receptors is enhanced by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and inhibited by 9-cis-retinoic acid. Evidence for allosteric receptor interactions. *J. Biol. Chem.* 273(14), 8483-8491.
- Turner, B., Roder, C., Dieckmann, D., Heuer, M., Kruse, M., Glaser, A., Keikavoussi, P., Kämpgen, E., Bender, A., Schuler, G. (1999)** Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J. Immunol. Methods.* 223(1), 1-15.
- Treisman, R. (1985)** Transient accumulation of c-fos RNA following serum stimulation requires a conserved 5' element and c-fos 3' sequences. *Cell* 42(3) 889-902.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., Tada, K. (1980)** Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* 26, 171-176.
- Tsujimoto, Y., Shimizu, S. (2000)** Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett.* 466(1), 6-10.
- Tujebajeva, R. M., Harney, J. W., Berry, M. J. (2000)** Selenoprotein P expression, purification, and immunochemical characterization. *J. Biol. Chem.* 275, 6288-6294.
- Turner, P. R., Mefford, S., Christakos, S., Nissenson, R. A. (2000)** Apoptosis mediated by activation of the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein. *Mol. Endocrinol.* 14(2), 241-254.
- Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., Flohé, L. (1999)** Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* 285(5432), 1393-1396.
- Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohé, K., Aumann, A., Roveri, D., Schomburg, L., Flohé (1995)** Diversity of glutathione peroxidases. *Methods. Enzymol.* 252, 38-53.
- Ursini, F., Maiorino, M., Gregolin, C. (1985)** The selenoenzyme phospholipid glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 839, 62-70.
- Urdin, T. B., Gruber, C., Bonner, T. I. (1995)** Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH<sub>2</sub> receptor. *J. Biol. Chem.* 270(26), 15455-15458.
- Urdin, T. B., Hilton, J., Vertesi, T., Harta, G., Segre, G., Mezey, E. (1999)** Distribution of the parathyroid hormone 2 receptor in rat: immunolocalization reveals expression by several endocrine cells. *Endocrinology* 140(7), 3363-3371.
- Vaananen, K., Morris, D. C., Munoz, P. A., Parvonen, E. K. (1987)** Immunohistochemical study of alkaline phosphatase in growth plate cartilage, bone, and fetal calf isolated chondrocytes using monoclonal antibodies. *Acta Histochem.* 82(2), 211-217.
- van Dullemen, H. M., van Deventer, S. J., Hommes, D. W., Bijl, H. A., Jansen, J., Tytgat, G. N., Woody, J. (1995)** Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* 109(1), 129-135.

- 
- van Leeuwen, J. P., Birkenhager, J. C., van den Bemd, G. C., Pols, H. A. (1996)** Evidence for coordinated regulation of osteoblast function by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and parathyroid hormone. *Biochim. Biophys. Acta.* 1312(1), 54-62.
- Vendeland, S. C., Beilstein, M. A., Chen, C. L., Jensen, O. N., Barofsky, E., Whanger, P. D. (1993)** Purification and properties of selenoprotein W from rat muscle. *J. Biol. Chem.* 268, 17103-17107.
- Visser, T. J., Kaplan, M. M., Leonard, J. L., Larsen, P. R. (1983)** Evidence for two pathways of iodothyronine 5' deiodination in rat pituitary that differ in kinetics, propylthiouracil sensitivity, and response to hypothyroidism. *J. Clin. Invest.* 71, 992-1002.
- Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G. V., Kronenberg, H. M., Tabin, C. J. (1996)** Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 273(5275), 613-622.
- Walczak, R., Westhof, E., Carbon, P., Król, A. (1996)** A novel structural motif in the selenocysteine insertion element of eukaryotic selenoprotein mRNAs. *RNA* 2, 367-379.
- Watson, P. H., Fraher, L. J., Natale, B. V., Kiesel, M., Hendy, G. N., Hodsman, A. B. (2000)** Nuclear localization of the type 1 parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor in MC3T3-E1 cells: association with serum-induced cell proliferation. *Bone* 26(3), 221-225.
- Weir, E. C., Horowitz, M. C., Baron, R., Centrella, M., Kacinski, B. M., Insogna, K. L. (1993)** Macrophage colony-stimulating factor release and receptor expression in bone cells. *J. Bone Miner. Res.* 8(12), 1507-1518.
- Welham, M. J., Wyke, J. A., Lang, A., Wyke, A. W. (1990)** Mitogenesis induced by pp60v-src is not accompanied by increased expression of immediate early response genes. *Oncogene* 5, 161-169.
- West, G. A., Matsuura, T., Levine, A. D., Klein, J. S., Fiocchi, C. (1996)** Interleukin 4 in inflammatory bowel disease and mucosal immune reactivity. *Gastroenterology* 110(6), 1683-1695.
- Wheadon, H., Roberts, P. J., Watts, M. J., Lynch, D. C. (1999)** Changes in signal transduction downstream from the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor during differentiation of primary hemopoietic cells. *Exp. Hematol.* 27(6), 1077-1086.
- Wiele, B., Ottenhoff, T. H. M., Steenwijk, T. M., Franken, K. L. M. C., DeVries, R. R. P., Langermans, A. M. (1997)** Increased intracellular survival of Mycobacterium smegmatis containing the Mycobacterium leprae thioredoxin-thioredoxin reductase gene. *Infect Immun.* 65, 2537-2541.
- Wiktor-Jedrzejczak, W., Bartocci, A., Ferrante Jr., A. W., Ahmed-Ansari, A., Selig, K. W., Pollard, J. W., Stanley, E. R. (1990)** Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(12), 4828-4832.
- William, F., Wagner, F., Karin, M., Kraft, S. (1990)** Multiple doses of diacylglycerol and calcium ionophore are necessary to activate AP-1 enhancer activity and induce markers of macrophage differentiation. *J. Biol. Chem.* 265(30), 18166-18171.
- Wingler, K., Bocher, M., Flohe, L., Kolimus, H., Brigelius-Flohe, R. (1999)** mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins. *Eur. J. Biochem.* 259(1-2), 149-157.

- 
- Wong**, B. R., Josien, R., Choi, Y. (1999) TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function. *J. Leukoc. Biol.* 65(6), 715-724.
- Wu**, X., Bishopric, N. H., Dische, r D. J., Murphy, B. J., Webster, K. A. (1996) Physical and functional sensitivity of zinc finger transcription factors to redox change. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1035-1046.
- Xanthoudakis**, S., Curran, T. (1992a) Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. *EMBO J.* 11, 653-665.
- Xanthoudakis**, S., Miao, G., Wang, F., Pan, A.-C., Curran, T. (1992b) Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO J.* 11, 3323-3335.
- Yang**, G., Yin, S., Zhou, R., Gu, L., Yan, B., Liu, Y., Liu, Y. (1989) Studies of safe maximal dietary Se-intake in a seleniferous area in China. Part II: Relation between Se-Intake and the manifestation of clinical signs and certain biochemical alterations in blood and urine. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 3 (3), 123-130.
- Yang**, J. G., Morrison-Plummer, J., Burk, R. F. (1987) Purification and quantitation of a rat plasma selenoprotein distinct from glutathione peroxidase using monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* 262, 13372-13375.
- Yeh**, J.-Y., Beilstein, M. A., Andrews, J. S., Wanger, P. D. (1995) Tissue distribution and influence of selenium status on levels of selenoprotein W. *FASEB J.* 9, 392-396.
- Yoshimura**, A., Suemizu, H., Taniguchi, Y., Arimori, K., Kawabe, N., Moriuchi (1994) The human plasma glutathione peroxidase-encoding gene: organization, sequence and localization to chromosome 5q32. *Gene* 145, 293-297.
- Yoshimura**, S., Watanabe, K., Suemizu, H., Onozawa, T., Mizoguchi, J., Tsuda, K., Hatta, H., Moriuchi, T (1991) Tissue specific expression of the plasma glutathione peroxidase gene in rat kidney. *J. Biochem.* 109, 918-923.
- Zeimer**, H. J., Greenaway, T. M., Slavin, J., Hards, D. K., Zhou, H., Doery, J. C., Hunter, A. N., Duffield, A., Martin, T. J., Grill, V., (1998) Parathyroid-hormone-related protein in sarcoidosis. *Am. J. Pathol.* 152, 17-21.
- Zhang**, D. E., Hetherington, C. J., Gonzalez, D. A., Chen, H. M., Tenen, D. G. (1994) Regulation of CD14 expression during monocytic differentiation induced with 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *J. Immunol.* 153(7), 3276-3284.
- Zhang**, Z., Hillis, P. J., Ortiz de Montellano, P. R. (1999) Reduction of peroxides and dinitrobenzenes by mycobacterium tuberculosis thioredoxin and thioredoxin reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* 363, 19-26.
- Zhao**, Y., Nichols, J. E., Bulun, S. E., Mendelson, C. R., Simpson, E. R. (1995) Aromatase P450 gene expression in human adipose tissue. Role of a Jak/STAT pathway in regulation of the adipose-specific promoter. *J. Biol. Chem.* 270(27), 16449-16457.
- Zinoni**, F., Birkmann, A., Stadtman, T. C., Böck, A. (1986) Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine-containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogen-lyase-linked) from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4650-4654.

## Publikationen

Winzer R., Schmutzler C., Jakobs T. C., **Ebert R.**, Rendl J., Reiners C., Jakob F., Köhrle J. (1998) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of thyroid-relevant genes in fine-needle aspiration biopsies of the human thyroid. *Thyroid* 8: 981-987.

Schütze N., Fritsche J., **Ebert-Dümig R.**, Schneider D., Andreesen R., Kreutz M., Köhrle J., Jakob F. (1999) The selenoprotein thioredoxin reductase is expressed in peripheral blood monocytes and THP1 human myeloid leukemia cells - regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and selenite. *Biofactors* 10: 329-338.

**Ebert-Dümig R.**, Schütze N., Jakob F. (1999) The thioredoxin reductase/thioredoxin system in cells of the monocyte/macrophage pathway of differentiation. *Biofactors* 10: 227-235.

**Ebert-Dümig R.**, Seufert J., Schneider D., Köhrle J., Schütze N., Jakob F. (1999) Expression von Selenoproteinen in Monocyten und Makrophagen – Implikationen für das Immunsystem. *Medizinische Klinik* 94 (Suppl. III): 29-34.

**Ebert-Dümig R.**, Seufert J., Blind E., Schneider D., Köhrle J., Jakob F. (2000) Co-Expression of 25-hydroxyvitamin D3 1-alpha-hydroxylase and the PTH/PTHrP receptor in human peripheral blood monocytes – a local regulatory system. eingereicht zur Publikation

## Kongressbeiträge

Fritsche J., Schütze N., Schneider D., **Ebert R.**, Jakob F., Andreesen R., Kreutz M. (1998) Thioredoxin reductase is regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and selenite in human monocytes. XIV. Spring Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Immunologie, Frankfurt.

Schütze N., Fritsche J., Schneider D., **Ebert R.**, Kreuz M., Jakob F. (1998) Thioredoxin reductase is regulated by 1,25 $\alpha$ (OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> and selenite in human monocytes. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 106 (Suppl.1), S43, v171.

**Ebert R.**, Seufert J., Schneider D., Jakob F. (1999) Expression and Regulation of 25(OH) Vitamin D3-1 $\alpha$ -Hydroxylase in HL60 and THP1 monocytic leukemia cells. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 107 (Suppl. 1), S26, v059.

**Ebert-Dümig R.**, Schütze N., Schneider D., Köhrle J., Jakob F. (1999) Expression von Selenoproteinen in Monozyten - Implikationen für das Immunsystem. IV. Dresdner Selenosymposium, 15.-16. Mai 1999, Dresden.

Hoyland J., **Ebert-Dümig R.**, Schütze N., Jakob F. (2000) Local Expression of 1 $\alpha$ -hydroxylase in bone. *Osteologie* 2000, 1.-4. März 2000, Würzburg.

**Ebert-Dümig R.**, Schneider D., Köhrle J., Jakob F. (2000) Expression und Regulation der 1 $\alpha$ -Hydroxylase in Monozyten. *Med. Klin.* 95, 175, P-288.

**Ebert-Dümig R.**, Schneider D., Blind E., Seufert J., Köhrle J., Jakob F. (2000) Parathyroid hormone receptor type 1 is expressed in human monocytes – regulation of 1 $\alpha$ -hydroxylase by PTH/PTHrP. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 108 (Suppl. 1), S13, vDo039.