

# Untersuchungen zur Expressionsregulation der Phospholipid-Hydroperoxid Glutathion-Peroxidase

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologe Christoph Ufer  
geboren am 30. Januar 1976 in Potsdam-Babelsberg

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter: 1. Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel  
2. Prof. Dr. Hartmut Kühn  
3. Prof. Dr. Wolfgang Lockau

eingereicht: 04.01.2006

Datum der Promotion: 15.03.2006



## Zusammenfassung

Die Phospholipid-Hydroperoxid Glutathion-Peroxidase (phGPx) ist ein monomeres Selenoprotein, welches innerhalb der Familie der Glutathion-Peroxidasen aufgrund seiner breiten Substratspezifität und der Fähigkeit Proteinthiole zu modifizieren eine Sonderstellung einnimmt. Vom Gen der phGPx werden nach heutigem Kenntnisstand drei verschiedene Protein-Isoformen gebildet. Die mitochondriale Isoform enthält am N-Terminus ein mitochondriales Insertionssignal und wird bevorzugt im Testis exprimiert. Von einem im Leserahmen stromabwärts liegenden Startkodon wird die kürzere, ubiquitär exprimierte zytosolische Isoform synthetisiert. Eine dritte phGPx-Isoform besitzt eine N-terminale nukleäre Lokalisationssequenz (kodiert von einem alternativen Exon 1) und wird vornehmlich in den Kernen post-meiotischer Zellen der Spermatogenese gefunden. Aufgabe dieser Arbeit war es, die molekularen Mechanismen zu untersuchen, die am Zustandekommen des vielfältigen Expressionsmusters der phGPx-Isoformen beteiligt sind. Im ersten Teil der Arbeit wurden transkriptionelle Regulationsmechanismen der phGPx-Expression untersucht. Im proximalen Promotorbereich (-100 bp – +228 bp) des phGPx-Gens wurden unter *in vitro* (Supershift-Assay) und *in vivo* (Chromatin-Immunopräzipitation) Bedingungen die Transkriptionsfaktoren Sp1 und NF-Y identifiziert, die an drei GC-reiche Motive beziehungsweise zwei inverse CCAAT-Boxen binden. Darüber hinaus konnten in kompetitiven Gelshift-Assays im proximalen Promotorbereich zwei Bindungssequenzen identifiziert werden, die von Faktoren der Smad-Familie gebunden werden. Funktionelle *in vitro* Promotorstudien mit mutierten Promotorkonstrukten zeigten, dass die Mutagenesen der Sp1- und NF-Y Bindestellen einen starken Einfluss auf die Reportergenaktivität hatten. Im zweiten Teil der Arbeit wurden durch Untersuchungen von Protein-RNA-Interaktionen post-transkriptionelle Mechanismen der Expressionsregulation studiert. Mit Hilfe des *in vivo* Ansatzes des Hefe Drei-Hybrid Systems wurde der Guanin-reiche Sequenz bindende Faktor 1 (GRSF1) identifiziert, der in der 5'-untranslatierte Region der mitochondrialen phGPx-mRNA bindet. In RNA Gelshift-Assays wurde die Spezifität dieser Interaktion bestätigt und näher charakterisiert. Schließlich wurden für GRSF1 und die phGPx Expressionsprofile in murinen Gewebe erstellt sowie die zeitabhängige Expression beider Proteine während der Embryogenese verfolgt. Die auffällig ähnlichen Expressionsmuster lassen ähnliche Regulationsmechanismen vermuten. Die in dieser Arbeit identifizierten trans-regulatorischen Proteine Sp1, NF-Y, Smad und GRSF1 sollten an der differentiellen Expression der phGPx-Isoformen beteiligt sein.

### Schlagnworte:

Phospholipid-Hydroperoxid Glutathion-Peroxidase, Expressionsregulation, Nukleärer Faktor Y, Stimulierendes Protein 1, Guanin-reiche Sequenz-bindender Faktor

## **Abstract**

The Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase (phGPx) is a monomeric selenoprotein that is unique in the family of Glutathione Peroxidases due to its low substrate specificity and its ability to oxidise protein thiols. Three different isoforms are known to derive from one common gene. The mitochondrial Isoform contains an N-terminal mitochondrial insertion sequence and is preferentially expressed in postpubertal testis. The shorter, ubiquitously expressed, cytosolic isoform is expressed from an in-frame start codon. A third isoform contains an N-terminal nuclear localization signal coded for by an alternative exon 1 and is preferentially expressed in the nuclei of post-meiotic spermatides. The aim of the present study is to investigate the molecular mechanisms leading to the different isoforms and causing their tissue specific expression pattern. In the first part of this work transcriptional regulatory mechanisms will be analysed. Within the proximal promoter region (-100 to +228 bp) of the phGPx gene the transcription factors SP1 and NF-Y were identified to bind to three GC-boxes and two CCAAT-boxes respectively using in vitro methods (Supershift Assays) and in vivo methods (Chromatine immunoprecipitation). Moreover, performing competitive gel shift assays two binding elements for the smad family of transcription factors could be identified. Functional in vitro reporter gene assays provided evidence that the mutagenesis of the binding sequences for NF-Y and Sp1 has a strong impact on promoter activity. In the second part of this work post-transcriptional events in the expression regulation of the phGPx were analysed on the basis of protein/RNA interactions. Applying the in vivo approach of the yeast three hybrid system the Guanin-riche sequence binding factor 1 (GRSF1) could be identified binding to the 5'-untranslated region of the mitochondrial phGPx messenger. RNA mobility shift assays were performed to further characterize the specificity of this protein/RNA interaction. Eventually, the tissue distribution of GRSF1 and phGPx was studied in murine tissues and their expression kinetics were followed during murine embryogenesis. The obvious parallel expression kinetics for mitochondrial phGPx and GRSF1 suggest common regulatory mechanisms for these two genes. All the identified trans-regulatory elements are very likely to be involved in the differential expression regulation of the phGPx isoforms.

### **Keywords:**

Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase, expression regulation, Nuclear Factor Y, Stimulating Protein 1, Guanine Rich Sequence Binding factor 1

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Selenoproteine .....	1
1.1.1	Biosynthese von Selenoproteinen .....	2
1.1.2	Selen-abhängige Glutathion-Peroxidasen .....	3
1.2	Phospholipid-Hydroperoxid Glutathion-Peroxidase .....	5
1.2.1	phGPx und oxidativer Stress .....	7
1.2.2	phGPx als Modulator zellulärer Signalwege .....	8
1.2.3	phGPx als anti-apoptotischer Faktor .....	11
1.2.4	phGPx in der Spermatogenese .....	12
1.2.5	Embryonalentwicklung .....	15
1.3	Kontrolle der Genexpression Protein-kodierender Gene in eukaryotischen Zellen .....	15
1.3.1	Regulation der Transkription durch die RNA-Polymerase II .....	16
1.3.2	Post-transkriptionelle Ereignisse .....	18
2	Material und Methoden .....	21
2.1	Materialien .....	21
2.1.1	Chemikalien und Gebrauchswaren .....	21
2.1.2	Geräte .....	21
2.1.3	Enzyme .....	21
2.1.4	DNA-Banken und Plasmide .....	22
2.1.5	Bakterien- und Hefestämme und Zelllinien .....	22
2.2	Molekularbiologische Methoden .....	22
2.2.1	Konstruktion von Reportergenen .....	23
2.2.2	DNA-Gelshift-Assay .....	23
2.2.3	Chromatin-Immunopräzipitation .....	26
2.2.4	RNA-Gelshift-Assay .....	27
2.2.5	RNA-Präparation und Reverse Transkription .....	30
2.2.6	Real-Time-PCR .....	31
2.2.7	Rechner-gestützte Sequenzanalyse .....	33
2.3	Proteinchemische Methoden .....	34
2.3.1	Klonierung der cDNAs der GRSF1-Isoformen .....	34
2.3.2	Expression und Reinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine .....	35
2.3.3	SDS-Gelelektrophorese und Westernblot .....	36
2.4	Zellmethoden .....	37
2.4.1	Kultur von HEK293-Zellen .....	37
2.4.2	Transfektion mit FuGene 6 .....	38
2.4.3	Präparation nukleärer Extrakte .....	39
2.5	Hefemethoden .....	40
2.5.1	Kultur von Hefezellen .....	40
2.5.2	Hefe-Transformation .....	40
2.5.3	Plasmid-Präparation aus <i>S. cerevisiae</i> .....	41
2.5.4	RNA-Präparation aus <i>S. cerevisiae</i> .....	41
2.5.5	Hefe-Paarungsassay .....	42
2.5.6	$\beta$ -Galaktosidase-Assay .....	42
2.5.7	Semi-solide Bibliotheksamplifikation .....	42
2.5.8	Hefe Drei-Hybrid Screen .....	43
3	Zielstellung und experimentelle Strategie .....	47
4	Ergebnisse .....	49
4.1	Protein-DNA-Interaktionen am basalen Promotor der phGPx .....	49
4.1.1	Vorarbeiten .....	49

4.1.2	Identifizierung trans-regulatorischer Faktoren am basalen Promotor der phGPx	50
4.1.3	Mitglieder der Smad3/4-Familie von Transkriptionsfaktoren interagieren in vitro mit Sequenzen im Promotor der phGPx	53
4.1.4	NF-Y und Sp1 binden in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) in vivo am Promotor der phGPx	58
4.1.5	Funktionelle in vitro Promotorstudien	59
4.2	Protein-RNA-Interaktion an der 5'-untranslatierten Region der mitochondrialen phGPx	65
4.2.1	Der Guanin-reiche Sequenz-bindende Faktor 1 interagiert mit der 5'-untranslatierten Region der phGPx-mRNA	65
4.2.2	Expression und Reinigung des rekombinanten GRSF1	70
4.2.3	Analyse von Protein-RNA-Interaktion in RNA-Gelshift-Experimenten	73
4.2.4	Quantifizierung der Gewebeverteilung von GRSF1- und phGPx-Isoformen mittels Real-Time-PCR	79
5	Diskussion	84
5.1	Protein-DNA-Interaktionen am Promotor des murinen phGPx-Gens	84
5.1.1	Funktionelle Wechselwirkungen am Promotor der phGPx	89
5.1.2	Das Stimulierende Protein 1 bindet an drei unabhängige GC-Boxen	91
5.1.3	Der Nukleäre Faktor Y bindet an zwei inverse CCAAT-Boxen	94
5.1.4	Proteine der Smad-Familie binden in der 5' flankierenden Region des phGPx-Gens	95
5.2	Protein-RNA-Interaktionen in der 5'-untranslatierten Region der mitochondrialen phGPx-mRNA	97
5.2.1	Der Guanin-reiche Sequenz bindende Faktor 1	98
5.2.2	Expressionsmuster von GRSF1 und phGPx in murinen Geweben und während der Embryogenese	102
5.3	Abschließende Betrachtung und Ausblick	103

**Widmung**

... meinem Bruder Carsten.



## Abkürzungsverzeichnis

3-AT	3-Aminotriazol
5-FOA	5-Fluoroorotsäure
A	Adenin
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
ANT	Adenin-Nukleotid Translokator
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BMP	aus „bone morphogenetic protein“
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine)
C	Cytosin
cDNA	zur mRNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cfu	Kolonie formende Einheiten (colony forming units)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic Acid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPE	stromabwärts gelegenes Element (Downstream Position Element)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDS	Ethandimethansulfonat
EDTA	Ethylendiamintetra-essigsäure
eEF	eukaryotischer Translationselongations-faktor
EF	Elongationsfaktor
eIF	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor
eRF	eukaryotischer Translationsterminations-faktor
FAST1	aus „forkhead activin signal transducer“
FoxH1	aus „forkhead box H1“
FP	aus „Footprint“
G	Guanin
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA	GATA-bindendes Protein
GPx	Glutathion-Peroxidase
GRSF1	Guanin-reiche Sequenz bindender Faktor 1
GSH	reduzierte Form des Glutathions
GST	Glutathion-S-Transferase
GTFs	Generelle Transkriptionsfaktoren
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein
IL	Interleukin
Inr	Initiator-Element
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani Medium
LDL	Lipoprotein geringer Dichte (Low Density Lipoprotein)
Lox	Lipoxygenase
mDAZL	aus „murine deleted in azoospermia like-protein“
mRNA	Boten RNA (Messenger RNA)
mRNP	Boten-RNA Protein
MZF1	Myeloides Zinkfingerprotein 1
n.s.	nicht spezifisch

NFκB	Nukleärer Faktor κB
NF-Y	Nukleärer Faktor Y
nt	Nukleotid(e)
Oct1	Oktamer-Transkriptionsfaktor 1
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
phGPx	Phospholipid-Hydroperoxid Glutathion-Peroxidase
PolII	RNA-Polymerase II
PolIII	RNA-Polymerase III
RACE	schnelle Amplifizierung von cDNA-Enden (Rapid Amplification of cDNA ends)
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RRM	RNA Erkennungsmotiv (RNA Recognition Motive)
RT	Reverse Transkription
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SBE	Smad-bindendes Element
SBP2	SECIS bindendes Protein 2
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	Selenocystein
SECIS	Selenocystein-Insertionssequenz
siRNA	kleine störende RNA (small interfering RNA)
Smad	aus „Small mothers against decapentaplegic“
SOD	Superoxiddismutase
Sp1	Stimulierendes Protein 1
Sp3	Stimulierendes Protein 3
SREBP1	Sterol reguliertes Element bindendes Protein 1
SV40	Affenvirus 40 (Simian Virus 40)
T	Thymin
TAFs	TBP-assozierte Faktoren
TBP	TATA-bindendes Protein
TF	Transkriptionsfaktor
TGFβ	Transformierender Wachstumsfaktor β (transforming growth factor β)
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxinreduktase
U	Uracil
UTP	Uracil-5'-triphosphat
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolettes Licht
WT	Wildtyp

## 1 Einleitung

### 1.1 Selenoproteine

Selenoproteine kommen in den meisten Reichen des Lebens vor und besitzen eine Vielzahl von biochemischen Funktionen. In der Mehrzahl der bisher identifizierten Selenoproteine ist das Selen als Selenocystein Bestandteil der Polypeptidkette. In anderen Proteinen kann Selen in Form von Selenomethionin anstelle von Methionin eingebaut sein oder in wieder anderen Proteinen lediglich als Metallion gebunden sein (Behne und Kyriakopoulos, 2001).

Tab. 1: Identifizierte Selenoproteine in Säuger und ihre möglichen Funktionen.

Selenoprotein	Funktion	Referenz
<b>Glutathion-Peroxidasen (GPx)</b>		
Zytosolische GPx	Reduktion von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und organischen Hydroperoxiden	(Mills, 1957)
Gastrointestinale GPx	“	(Chu et al., 1993)
Plasma GPx	“	(Takahashi et al., 1987)
Phospholipid-Hydroperoxid GPx	Reduktion von Cholesterol- und Phospholipid-Hydroperoxiden, u.a.	(Ursini et al., 1982)
<b>Dejodinasen (DI)</b>		
Typ I 5'-DI	Dejodinierung von T4 zu T3, Inaktivierung von T3 und T4	(Arthur et al., 1990)
Typ II 5'-DI	Dejodinierung von T4 zu T3	(Davey et al., 1995)
Typ III 5'-DI	Inaktivierung von T3 und T4	(Croteau et al., 1995)
<b>Thioredoxinreduktasen (TrxR)</b>		
TrxR 1	Reduktion von Thioredoxin (Trx)	(Tamura und Stadtman, 1996)
Mitochondriale TrxR	“	(Miranda-Vizuete et al., 1999)
Testikuläre TrxR	“	(Sun et al., 1999)
TrxR-Homologe	unbekannt	(Lescure et al., 1999)
<b>weitere</b>		
Selenophosphat-Synthase 2	Selenophosphat-Synthese	(Guimaraes et al., 1996)
Selenoprotein P	Selentransport	(Motsenbocker und Tappel, 1984)
Selenoprotein W	unbekannt	(Vendeland et al., 1993)
15 kDa Selenoprotein	unbekannt	(Gladyshev et al., 1998)
Selenoprotein N, R, T, X	unbekannt	(Kryukov et al., 1999; Lescure et al., 1999)

Versuche mit [<sup>75</sup>Se]-Markierungen an Ratten geben Hinweis darauf, dass es bei Säugetieren etwa 30 bis 50 Selenocystein-enhaltende Proteine gibt (Behne et al., 1996). Nur den wenigsten konnte bis heute eine Funktion zugewiesen werden (Tabelle 1.1).

### 1.1.1 Biosynthese von Selenoproteinen

Die biologischen Effekte von Selen bei Säugetieren rühren überwiegend von Proteinen her, welche Selen in Form von Selenocystein enthalten. Selen existiert in organischer (Selenomethionin, Selenocystein) oder in anorganischer Form (Selenit, Selenat, Selenid) (Birringer et al., 2002). Bevor Selen in Form von Selenocystein, welches essentiell für die katalytische Aktivität ist, in Proteine eingebaut werden kann, müssen Selenverbindungen in eine anorganische Form umgewandelt werden (Carlson et al., 2004). Mutagenese-Experimente zeigten, dass der Einbau der Aminosäure Cystein anstelle von Selenocystein zu einem massiven Abfall der Enzymaktivität führt, weil Selen nukleophiler ist und Selenole bei physiologischem pH-Wert ionisiert vorliegen (Zhong und Holmgren, 2000). Selenocystein ist die 21. proteinogene Aminosäure und wird durch das Stoppkodon UGA kodiert (Chambers et al., 1986; Zinoni et al., 1986).

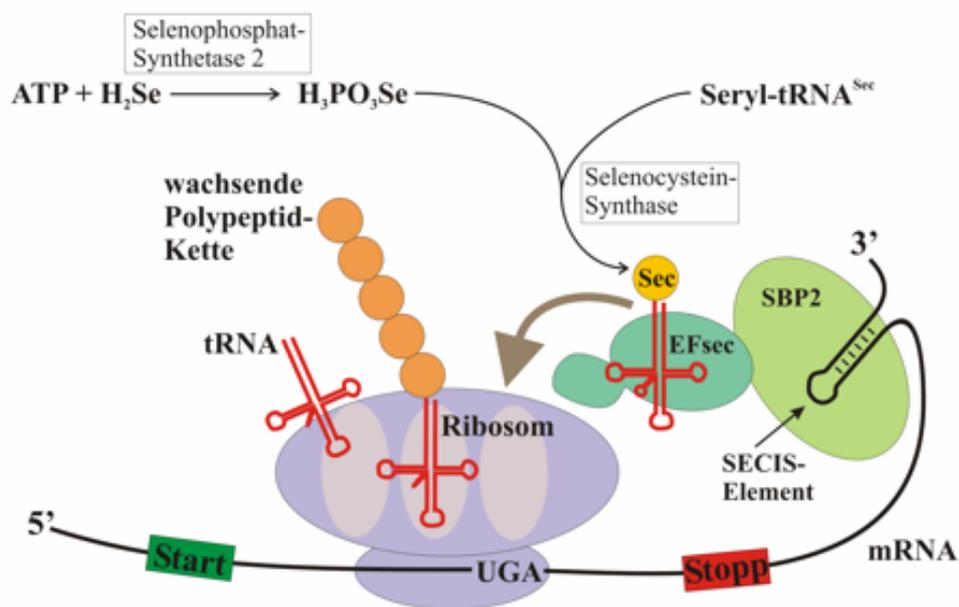


Abb. 1: Modell der Selenoprotein-Synthese in Eukaryoten (nach (Hatfield und Gladyshev, 2002; Kohrle et al., 2000)). Erläuterungen Siehe Text.

Die Schritte der Selenoprotein-Synthese sind in Abbildung 1 illustriert. Für den Einbau von Selen am Stoppkodon ist eine spezifische Haarnadelstruktur notwendig, die in Prokaryoten direkt hinter dem UGA-Triplett und in Eukaryoten in der 3'-untranslatierten Region der mRNA liegt, und als Selenocystein-Insertionssequenz (SECIS) bezeichnet wird (Low und

Berry, 1996). Bei Säugetieren werden zusätzliche Faktoren benötigt. Das SECIS-Element in der 3'-untranslatierten Region der mRNA wird vom SECIS-bindenden Protein SBP2 gebunden (Copeland et al., 2000; Copeland et al., 2001). Neben dem SECIS-Element interagiert SBP2 mit den Ribosomen und dem für Selenocystein spezifischen Elongationsfaktor EFSec, der wiederum die Selenocystein tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> bindet. Dadurch wird der kotranslatorischen Einbau des Selenocysteins in die wachsende Polypeptidkette vermittelt (Tujebajeva et al., 2000). In Bakterien werden die Funktionen von SBP2 und EFSec von einem einzigen Protein (SelB) übernommen (Forchhammer et al., 1989). Die Biosynthese des Selenocysteins selbst erfolgt an der tRNA, die zunächst mit Serin beladen wird (Amberg et al., 1996). Substrat der Selenocystein-Synthase sind daher die Seryl-tRNA<sup>Sec</sup> und das von der Selenophosphat-Synthetase 2 aus Selenid synthetisierte Selenophosphat (Hatfield und Gladyshev, 2002).

Ein weiterer interessanter Aspekt in der Biosynthese der Selenoproteine ist die Existenz einer so genannten Selen-Hierarchie. Die Biosynthese der Selenoproteine hängt von der Verfügbarkeit von Selen ab. Die Selen-Hierarchie stellt sicher, dass unter Selendefizienz in bestimmten Geweben die Expression der jeweiligen Selenoproteine auf einem bestimmten Niveau aufrechterhalten wird (Behne und Kyriakopoulos, 2001). Jene Proteine, die hoch in der Hierarchie stehen, werden unter Selenmangel in den entsprechenden Geweben besonders lange auf hohem Niveau exprimiert und bei erneuter Selengabe schneller wieder synthetisiert. Im Gegensatz dazu wird die Expression von Selenoproteinen, die in der Hierarchie weiter unten angesiedelt sind, bei Selenmangel stark herunter reguliert. Der Mechanismus für diese Selen-Hierarchie ist bislang unbekannt. Vorgeschlagen wurde, dass die SECIS-Elemente ein unterschiedliches Potential haben, den Selenocystein-Einbau zu steuern (Bermano et al., 1996; Low et al., 2000). Neben der viel untersuchten 3'-untranslatierten Region scheinen aber auch kodierende Sequenzen für die mRNA-Stabilität und Translationseffizienz der Selenoproteine ausschlaggebend zu sein (Müller et al., 2003). Für die Glutathion-Peroxidasen 1 und 4 konnte gezeigt werden, dass die hohe RNA-Stabilität der GPx4 unter Selenmangel, auf die Maskierung des Nonsense-vermittelten RNA-Abbaus zurückzuführen ist (Sun et al., 2001; Weiss und Sunde, 1998). Hierbei vermittelt das UGA-Kodon stromaufwärts einer Spleißstelle die Degradation der mRNA-Moleküle.

### 1.1.2 Selen-abhängige Glutathion-Peroxidasen

Selen-abhängige Glutathion Peroxidasen (GPx) bilden eine Familie von Enzymen, die unter Verbrauch von Glutathion oder anderen Thiolen Hydroperoxide in die entsprechenden Alkohole umwandeln können. Damit werden sie als Schutzenzyme zur Abwehr von

oxidativen Schäden an Zellbestandteilen diskutiert. Der erste Schritt der katalytischen Reaktion (Abb. 2.) ist eine Oxidation der Selenol-Gruppe durch das Hydroperoxid und Bildung eines Derivats der selenigen Säure (Ursini et al., 1985). Der zweite Schritt führt zur Bildung einer kovalenten Bindung zwischen dem Selen des Enzyms und dem Schwefel einer geeigneten Thiolverbindung, wie Glutathion. Im letzten Schritt wird das Enzym unter Verwendung eines zweiten Thiols wieder regeneriert (Abb. 2).

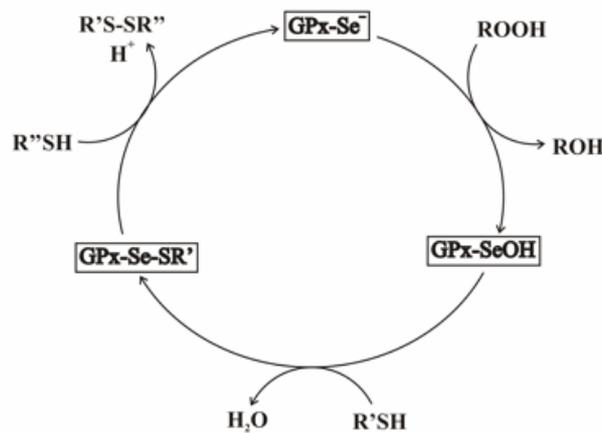


Abb. 2: Katalytischer Zyklus der Glutathion-Peroxidasen (nach (Birringer et al., 2002))

Die einzelnen Mitglieder der Glutathion-Peroxidasen zeigen jeweils eine ihnen spezifische Verteilung in Geweben und Organen. Die erste Glutathion-Peroxidase, die identifiziert wurde, ist die klassische oder zytosolische GPx (GPx1) (Mills, 1957). Die Phospholipid-Hydroperoxid Glutathion-Peroxidase (phGPx, GPx4) wurde zuerst 1982 (Ursini et al., 1982) beschrieben. Später kamen die Plasma-GPx (GPx3) und die Gastrointestinale GPx (GPx2) hinzu (Chu et al., 1993; Takahashi et al., 1987). Innerhalb der Glutathion-Peroxidasen liegt die Gastrointestinale GPx in der Selen-Hierarchie an erster Stelle, gefolgt von der phGPx. Die zytosolische GPx rangiert an letzter Stelle (Brigelius-Flohe, 1999). Die Expression der zytosolischen GPx und der phGPx ist unter Selenmangel besonders im Gehirn stabil (Mitchell et al., 1997).

Die zytosolische GPx ist eine Homotetramer und katalysiert die Reduktion von Wasserstoffperoxid und verschiedenen wasserlöslichen Peroxiden. Sie wird ubiquitär exprimiert. Die höchste Aktivität findet sich in Erythrozyten (Behne und Wolters, 1983). Der homozygote GPx1-Knockout blieb ohne Phänotyp, zeigte jedoch eine erhöhte Empfindlichkeit gegen Substanzen wie Wasserstoffperoxid und Paraquat, die oxidativen Stress verursachen (de Haan et al., 1998; Ho et al., 1997).

Die Expression der ebenfalls homotetrameren Gastrointestinalen GPx scheint in Ratten auf das Epithel des Gastrointestinaltrakts beschränkt zu sein. Beim Menschen wird sie jedoch auch in der Leber gefunden (Chu et al., 1993; Chu und Esworthy, 1995). Wie auch beim

Knockout der GPx1 entwickelten sich homozygote GPx2<sup>-/-</sup>-Mäuse normal (Esworthy et al., 2000).

Im Gegensatz zu den übrigen Glutathion-Peroxidasen ist die ebenfalls tetramere Plasma-GPx ein Glykoprotein, das in den Extrazellulärraum sezerniert wird (Takahashi et al., 1987). Sie wird in vielen Organen, bevorzugt jedoch in der Niere exprimiert und dort in das Blutplasma abgegeben (Yoshimura et al., 1991). Da die Glutathion-Konzentration im Blutplasma sehr niedrig ist, war die Funktion der Plasma-GPx lange unklar. Hinweise auf ihre antioxidative Funktion ergaben sich jedoch in Experimenten, die zeigten, dass dieses Enzym bevorzugt Thioredoxin und Glutaredoxin als Elektronen-Donoren verwendet (Björnstedt et al., 1994).

Die Phospholipid-Hydroperoxid GPx wird im Folgenden ausführlicher besprochen.

## 1.2 Phospholipid-Hydroperoxid Glutathion-Peroxidase

Die Phospholipid-Hydroperoxid Glutathion-Peroxidase (phGPx) ist seit 1982 als „Peroxidation-hemmendes Protein“ bekannt (Ursini et al., 1982). Als viertes Mitglied der Familie der Glutathion-Peroxidasen nimmt die phGPx oder GPx4 in vielerlei Hinsicht eine Sonderstellung ein. Während die Selen-abhängigen Glutathion-Peroxidasen GPx1, GPx2 und GPx3 als Tetramere vorliegen, ist die phGPx ein monomeres Protein von etwa 20 kDa. Während die tetrameren Glutathion-Peroxidasen vorwiegend kleine, hydrophile Peroxide reduzieren, ist die phGPx imstande komplexere Substrate wie Phospholipid-, Cholesterol- und Cholesterolester-Hydroperoxide zu reduzieren, auch wenn sich diese in Membranen beziehungsweise Lipoproteinen befinden (Sattler et al., 1994; Thomas et al., 1990; Ursini et al., 1985). Aufgrund dieser Eigenschaft wurde die biologische Bedeutung der phGPx zunächst vor allem als Schutzmechanismus gegen oxidativen Stress von Biomembranen diskutiert. Während die katalytische Triade der Glutathion-Peroxidasen bestehend aus dem Selenocystein und einem Glutamin- und Tryptophanrest in der phGPx konserviert ist (Maiorino et al., 1995), sind die vier Argininreste, welche die Glutathion-Bindungsstelle repräsentieren, im Protein der phGPx deletiert bzw. mutiert. Daraus resultiert, dass die phGPx nicht nur komplexe Lipide als Substrate akzeptiert, sondern neben Glutathion auch makromolekulare Thiole (z.B. Proteinthiole) als Reduktionsäquivalente verwenden kann (Godeas et al., 1997). Sie besitzt daher eine „Thiol-Oxidase-Aktivität“ für Proteinthiole (Brigelius-Flohe, 1999). Eine Besonderheit der phGPx ist auch ihre ungewöhnliche Gewebeverteilung. Die phGPx ist bisher in vielen Geweben und Zellen nachgewiesen worden, wobei ihre Aktivität immer niedriger ist als die der GPx1. Eine Ausnahme bildet jedoch der Hoden, welcher die höchste phGPx-Aktivität aufweist (Lei et al., 1995).

Vom Gen der phGPx werden nach heutigem Kenntnisstand drei verschiedene Isoformen synthetisiert. Neben der ursprünglich identifizierten zytosolischen Isoform (z-phGPx) (Ursini et al., 1982) existieren eine mitochondriale (m-phGPx) (Arai et al., 1999) und eine nukleäre Isoform (n-phGPx) (Pfeifer et al., 2001). Die Isoformen unterscheiden sich nur hinsichtlich ihrer 5'-untranslatierten Region und ihrer N-terminalen Peptidsequenz. Das katalytische Zentrum mit dem Selenocystein und die 3'-untranslatierte Region mit der SECIS sind in allen Isoformen erhalten. Die Mechanismen, die zur Expression der einzelnen Isoformen führen, sind Gegenstand aktueller, wissenschaftlicher Diskussionen (siehe Kapitel 5). Die mitochondriale Isoform besitzt eine N-terminale, mitochondriale Insertionssequenz, welche den Transport in die mitochondriale Matrix vermittelt (Arai et al., 1996). Nach dem Transport in die Mitochondrien wird die Insertionssequenz abgespalten (Arai et al., 1999), so dass auf Proteinniveau die z- und die m-phGPx nicht mehr unterscheidbar sind. Zuletzt entdeckt wurde eine nukleäre Isoform in den Kernen später Spermatozyten (Pfeifer et al., 2001). Aufgrund ihrer nukleären Lokalisation wird diese Isoform im Zusammenhang mit der Chromatinkondensation und dem Schutz der DNA gegen oxidative Schädigungen während der Spermatogenese diskutiert (Puglisi et al., 2003). Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass neben der nukleären phGPx-Isoform auch das Protein der z-phGPx im Zellkern nachgewiesen wurde (Arai et al., 1999; Puglisi et al., 2003; Roveri et al., 1992).

Die Expressionsvielfalt des phGPx Gens wird noch weiter dadurch erhöht, dass es zumindest bei Mäusen ein exprimiertes Pseudogen gibt (Boschan et al., 2002). Dieses Retrotransposon trägt verglichen mit dem authentischen Gen lediglich zwei stumme Mutationen und kodiert für ein funktionsfähiges Enzym. Die für die Expression eines funktionellen Enzyms notwendige SECIS ist im Pseudogen ebenfalls frei von Mutationen. Das Transkript des Retrotransposons lässt sich in einer Reihe von Geweben in unterschiedlichen Konzentrationen nachweisen (Boschan et al., 2002).

All diese Besonderheiten der phGPx und die hochrangige Einordnung des Enzyms in der Selenhierarchie deuten darauf hin, dass das Konzept der phGPx als exklusiv anti-oxidativer Faktor möglicherweise nicht ausreichend ist (Abb. 3). So gibt es zahlreiche Hinweise dafür, dass die phGPx auch für andere physiologische bzw. patho-physiologische Prozesse (Spermatogenese, Atherogenese, Leukotrienbiosynthese) von Bedeutung zu sein scheint. Darüber hinaus liefern jüngere Untersuchungen Hinweise auf eine Rolle des Enzyms während der frühen Embryonalentwicklung. Die vielfältigen Funktionen der phGPx werden im Folgenden näher beleuchtet.

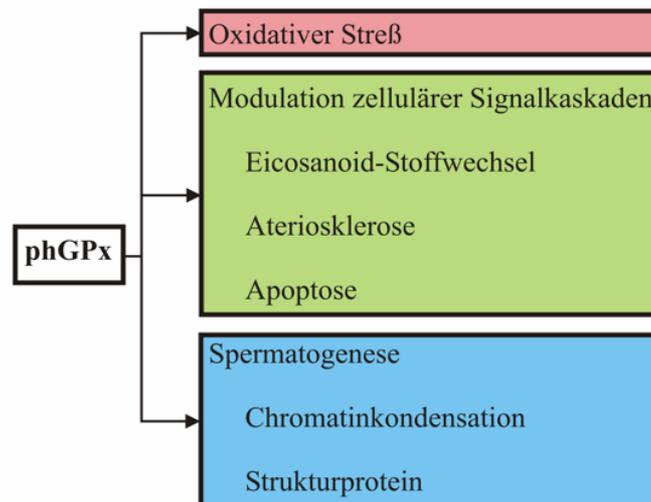


Abb. 3: Die phGPx ist ein „viel beschäftigtes“ Enzym

### 1.2.1 phGPx und oxidativer Stress

Oxidativer Stress resultiert aus einem Ungleichgewicht zwischen der zellulären Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) und den anti-oxidativen Verteidigungsmechanismen. Zu den ROS gehören das Superoxid-Anion, das Wasserstoffperoxid und das Hydroxylradikal. Reaktive Sauerstoffspezies werden in aeroben Organismen während der normalen Zellatmung permanent gebildet (Markesbery und Carney, 1999; Smith et al., 1999). Ungefähr 2-5 % des zellulären Sauerstoffverbrauchs führen zur Bildung von ROS. Superoxid-Radikale werden als Ausgangsprodukte für andere ROS hauptsächlich durch Einelektronenreduktion in der mitochondrialen Atmungskette gebildet. Eine übermäßige Produktion an ROS kann schädlich für Zellen sein, da sie zu oxidativen Schäden in Lipiden, Proteinen und DNA führen können. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind dabei besonders empfindlich für Oxidation durch ROS (Porter et al., 1995). Die resultierenden Fettsäure-Hydroperoxide können die Membranfluidität und die Aktivität von Membranproteinen verändern sowie eine durch freie Radikale vermittelte Kettenreaktion auslösen (Girotti, 1998). Die Bildung von Fettsäure-Hydroperoxiden kann sowohl durch enzymatische als auch durch nicht-enzymatische Prozesse erfolgen (Girotti, 1998). Zellen sind mit einem komplexen Netzwerk anti-oxidativer Schutzmechanismen ausgestattet, das im Stande ist, die Produktion von ROS genau zu regulieren. Superoxidradikale werden durch Dismutasen (SOD) zu Wasserstoffperoxid umgewandelt, was anschließend als Substrat für die Katalase dient und zu Wasser und Sauerstoff umgelagert wird. Wasserstoffperoxid kann aber auch in einer Metall-katalysierten Fenton-Reaktion zum hoch reaktiven Hydroxylradikal transformiert werden, das wiederum eine Kettenreaktion einleiten kann (zusammengefasst in (Imai und Nakagawa, 2003)). Die wichtigsten enzymatischen Verteidigungssysteme gegen organische und anorganische Hydroperoxide sind Glutathion-abhängige bzw. Thioredoxin-

abhängige Peroxidasereaktionen sowie die Katalase. Aufgrund ihrer Eigenschaft Fettsäurehydroperoxide in Biomembranen reduzieren zu können, kommt der phGPx eine wichtige Rolle beim Schutz von Biomembranen vor oxidativen Schädigungen zu. Die zytoprotektive Funktion der phGPx ist in vielfältigen Untersuchungen bestätigt worden. Als besonders geeignetes Modell hatten sich dabei Experimente mit phGPx-überexprimierenden Zelllinien erwiesen. Basophile Leukämiezellen 2H3 (Ratte), welche die zytosolische phGPx (z-phGPx) überexprimierten, waren resistenter gegen Zellschädigungen, die durch Fettsäurehydroperoxide induziert wurden (Arai et al., 1999; Imai et al., 1996). Weiterhin schützt die Überexpression der phGPx in Meerschweinchenzellen vor funktionellen Defiziten, die durch Phosphatidylcholinhydroperoxid induziert werden (Yagi et al., 1996). Die Überexpression der mitochondrialen phGPx schützte vor nekrotischem Zelltod, der durch Hemmstoffe der mitochondrialen Atmungskette induziert wurde. Dabei wurden die Bildung von Hydroperoxiden sowie der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und der Membranintegrität gehemmt (Arai et al., 1999). In humanen, epithelialen Brusttumorzellen vermittelte die Überexpression der m-phGPx eine Resistenz gegenüber Cholesterolhydroperoxid (Hurst et al., 2001). Es wird vermutet, dass die m-phGPx Veränderungen der Mitochondrienfunktion und den Zelltod verhindert, weil sie in der Lage ist, intrazelluläre Hydroperoxide zu reduzieren (Imai und Nakagawa, 2003). Basophile Leukämie-Zellen, welche die mitochondriale phGPx überexprimieren, erwiesen sich als resistenter gegenüber Schädigungen der Mitochondrien und gegen extrazellulären oxidativen Stress (Arai et al., 1999). Auch die Überexpression der m-phGPx in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 verhinderte die Lipidperoxidation und Zelltod, wohingegen die z-phGPx in diesem System keinen Einfluss hatte (Wang et al., 2001). Embryonale Fibroblasten aus heterozygoten phGPx-Knockout Mäusen erwiesen sich als deutlich empfindlicher gegen oxidativen Stress (Ran et al., 2004; Yant et al., 2003).

### **1.2.2 phGPx als Modulator zellulärer Signalwege**

Es wird zunehmend deutlich, dass oxidativer Stress, wenn er zeitlich und räumlich reguliert wird, neben schädigenden Auswirkungen auch wichtige regulatorische Funktionen hat. So scheint regulierter oxidativer Stress z.B. bei Zellreifungsprozessen (van Leyen et al., 1998) und bei der Modulation von zellulären Signalkaskaden bedeutsam zu sein (Brigelius-Flohe et al., 2004; Imai und Nakagawa, 2003). Die verschiedenen anti-oxidativen Enzyme sind in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten lokalisiert. Katalase ist vorwiegend in Peroxisomen vorhanden, wird aber auch im Zytosol tierischer Zellen gefunden (Chen et al., 2005; Forman et al., 2002). GPx1 ist hauptsächlich im Zytosol vorhanden und die drei

Isoformen der phGPx liegen sowohl im Kern, im Zytosol als auch in den Mitochondrien vor. Ebenso zeigen ROS-produzierende Reaktionen eine charakteristische subzelluläre Verteilung (Forman et al., 2002). Dieses Verteilungsmuster lässt vermuten, dass jedes der Enzyme spezifisch oder kooperativ die Signaltransduktion im jeweiligen Organell modulieren kann.

Am besten untersucht sind in diesem Zusammenhang der Signalwege, die durch den Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin 1 (IL-1) induziert werden und zur Aktivierung des nukleären Faktors  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) führen. Interessanter Weise sind sowohl oxidative als auch reduzierende Prozesse daran beteiligt (Brigelius-Flohe, 1999). Die Überexpression der phGPx in einer humanen, endothelialen Zelllinie führte zu einer abgeschwächten Antwort auf IL-1 (Brigelius-Flohe et al., 1997). Da die Überexpression der GPx1 nicht zu diesem Effekt führte, scheinen bevorzugt Fettsäure-Hydroperoxide an diesem Prozess beteiligt zu sein (Brigelius-Flohe et al., 1997). Fettsäure-Hydroperoxide werden enzymatisch von Lipoxygenasen gebildet. Die Expression der phGPx selbst wiederum scheint unter anderem durch IL-1 und TNF moduliert zu werden, wobei die Mechanismen unklar sind. Dabei existieren jedoch Hinweise auf transkriptionelle, post-transkriptionelle und post-translationelle Mechanismen (Hattori et al., 2005; Sneddon et al., 2003).

Lipoxygenasen stellen eine große Familie Lipid-peroxidierender Enzyme dar, die freie oder veresterte, mehrfach ungesättigte Fettsäuren oxygenieren und damit zu den entsprechenden Hydroperoxiden umwandeln (Kühn, 1996). Innerhalb dieser Familie nimmt die 12/15-Lipoxygenase eine Sonderstellung ein, da sie in der Lage ist, veresterte, mehrfach ungesättigte Fettsäuren in komplexen Lipoproteinen und Membranen zu oxygenieren, (Schewe et al., 1975). Damit kann die phGPx, mit ihrer Eigenschaft Fettsäure-Hydroperoxide in Lipoproteinen und Membranen zu reduzieren, als direkter Gegenspieler der 12/15-Lipoxygenase diskutiert werden (Kühn und Borchert, 2002).

In der Tat konnte gezeigt werden, dass die phGPx die Aktivität verschiedener Lipoxygenasen beeinflussen kann, da diese für ihre Aktivität einen bestimmten Peroxid-Tonus benötigen. Aus humanen epidermoiden Karzinomzellen wurde ein endogener Hemmstoff der 12-Lipoxygenase identifiziert. Dieser endogene Lipoxygenase-Hemmstoff wurde später gereinigt und als phGPx identifiziert (Huang et al., 1998). Die Hemmung der phGPx hingegen führte zu einer verstärkten Bildung von 12-Lipoxygenase- und Cyclooxygenase-Produkten (Chen et al., 2000).

Die zelluläre Aktivität der 5-Lipoxygenase ließ sich durch Selengabe und durch die Induktion der phGPx reduzieren (Weitzel und Wendel, 1993). Bestätigt wurden diese Befunde durch Experimente an basophilen Leukämiezellen der Ratte. In diesem System ging eine

Überexpression der z-phGPx mit einer abgeschwächte Leukotrienbiosynthese einher (Imai et al., 1998). Darüber hinaus konnte in diesem Modell gezeigt werden, dass die Überexpression der z-phGPx die Prostaglandin-Synthese moduliert (Sakamoto et al., 2000). Leukotriene und Prostaglandine werden durch Oxygenierung freier Arachidonsäure über den Lipoxygenase-beziehungsweise Cyclooxygenaseweg gebildet und stellen wichtige Entzündungsmediatoren sowie Immunmodulatoren dar (Yoshikai, 2001).

Schließlich konnte auch die durch die 12/15-Lipoxygenase vermittelte Oxygenierung von Biomembranen und LDL durch das Absenken des Hydroperoxid-Tonus durch die phGPx gehemmt werden (Belkner et al., 1998; Schnurr et al., 1996). In diesem Zusammenhang konnte eine inverse Regulation der phGPx und der 12/15-Lipoxygenase durch die Interleukine 4 und 13 gezeigt werden (Schnurr et al., 1999). Induziert durch diese Interleukine wurde die Expression der 12/15-Lipoxygenase, wohingegen die Expression der phGPx absank. Diese inverse Regulation peroxidierender bzw. Peroxid-reduzierender Prozesse führt notwendiger Weise zu einem Anstieg des oxidativem Potentials der Zelle (Schnurr et al., 1999). Die Mechanismen, die zur Herunterregulation der phGPx führen sind unklar, wobei post-transkriptionelle Ereignisse wahrscheinlich sind (Kühn und Borchert, 2002).

Neben Lipoxygenasen und Cyclooxygenasen sind auch viele Proteinphosphatasen und Proteinkinasen das Ziel von Redox-Regulation (Monteiro und Stern, 1996). Die phGPx selbst scheint das Ziel von Phosphorylierungsprozessen während der Spermatogenese zu sein, deren Funktion aber noch unklar ist (Nagdas et al., 2005). Nicht nur die Fähigkeit der phGPx zur Reduktion von Hydroperoxiden scheint für ihre Relevanz bei der Modulation von Signalwegen bedeutsam zu sein. Unter bestimmten Bedingungen ist sie auch in der Lage Proteinthiole zu reduzieren. So könnte sie die Aktivität von Proteinen, welche an Signalkaskaden beteiligt sind, über die Oxidation spezifischer Thiol-Gruppen regulieren und damit die entsprechende Signalkaskade beeinflussen (Brigelius-Flohe, 1999).

Die Fähigkeit Signalkaskaden über die Regulation des zellulären Hydroperoxid-Tonus zu regulieren, wird auch im Zusammenhang mit pathologischen Prozessen wie der Arteriosklerose diskutiert. Die Pathogenese dieser Erkrankung ist ein komplexer Prozess, der eine Vielzahl von Ereignissen, wie Lipidablagerung, Entzündung, Zellproliferation usw. umfasst. Da oxidativer Stress vermittelt durch oxidativ modifiziertes LDL in die Atherogenese involviert zu sein scheint, wurde ein anti-atherogener Einfluss der phGPx vermutet (Brigelius-Flohe, 1999). Interassenterweise werden die als antagonistisch angesehenen Enzyme phGPx und 12/15-Lipoxygenase beide als anti-atherogene Faktoren

diskutiert (Banning und Brigelius-Flohe, 2005; Banning et al., 2004). Damit könnten sie im Rahmen der Atherogenese nicht antagonistisch sondern eher synergistisch wirken.

### **1.2.3 phGPx als anti-apoptotischer Faktor**

Apoptose oder programmierter Zelltod spielt in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle (Steller, 1995). Eine zentrale Schnittstelle der Apoptose sind Caspasen, die in den meisten Zellen als katalytisch inaktive Proenzyme vorliegen. Durch proteolytische Spaltung (limitierte Proteolyse) im Rahmen der Apoptosekaskade werden sie aktiviert und induzieren den Abbau zellulärer Organellen. Zwei Prozesse, die zur Induktion der Apoptose führen sind gut beschrieben (zusammengefasst in (Green, 1998)). Der erste Weg (Rezeptorweg) beinhaltet das Binden eines Liganden an einen Zelloberflächenrezeptor, was zur intrazellulären Bildung des Apoptosoms führt, in welchem die Procaspasen aktiviert werden. Im zweiten Weg (mitochondriale Weg) vermitteln verschiedene Formen von zellulärem Stress die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Hierbei spielen Proteine der Bcl-2-Familie, die in den mitochondrialen Membranen sitzen, eine große Rolle (Boya et al., 2001). Cytochrom c wird nach Freisetzung aus den Mitochondrien von einem Protein (apoptotischer Protease-aktivierender Faktor 1) gebunden, was zur Bildung eines Apoptosoms führt (Reed, 1997). An diesen Prozessen können nachweislich reaktive Sauerstoffspezies beteiligt sein. Pro-oxidative Agenzien können Apoptose induzieren und Antioxidantien den Zelltod verhindern (Nomura et al., 2001). Mitochondrien sind die Hauptquelle reaktiver Sauerstoffspezies, die während der mitochondrialen Atmung entstehen (Guarnieri et al., 1992). Sie sind in der Lage, durch Freisetzung von Cytochrom c Apoptose zu induzieren (Brookes et al., 2002; Shimizu et al., 1996).

Die Überexpression der mitochondrialen Form der phGPx in basophilen Leukämiezellen der Ratte führte zu einer gesteigerten Resistenz gegen Apoptose-induzierende Agenzien (Nomura et al., 1999). Vergleichbare Ergebnisse wurden nicht erhalten, wenn die zytosolische Form der phGPx überexprimiert wurde. Diese Apoptoseresistenz wurde auf eine verringerte Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium zurückgeführt (Nomura et al., 1999). Cytochrom c liegt in hohen Konzentrationen vor allem im Intermembranraum zwischen der äußeren und inneren mitochondrialen Membran vor. Dort kann es von einem Mitochondrien-spezifischen Phospholipid, dem Cardiolipin, gebunden werden (Demel et al., 1989). Ein Schritt in der Freisetzung des Cytochrom c aus Mitochondrien scheint die Peroxidation des Cardiolipins zu sein, was zu einer verminderten Affinität zum Cytochrom c führt und durch die phGPx unterdrückt wird (Nomura et al., 2000). Reduziertes Cardiolipin erhält seine hohe Affinität zum Cytochrom c zurück. Eine weitere Rolle scheint der Adenin-Nukleotid

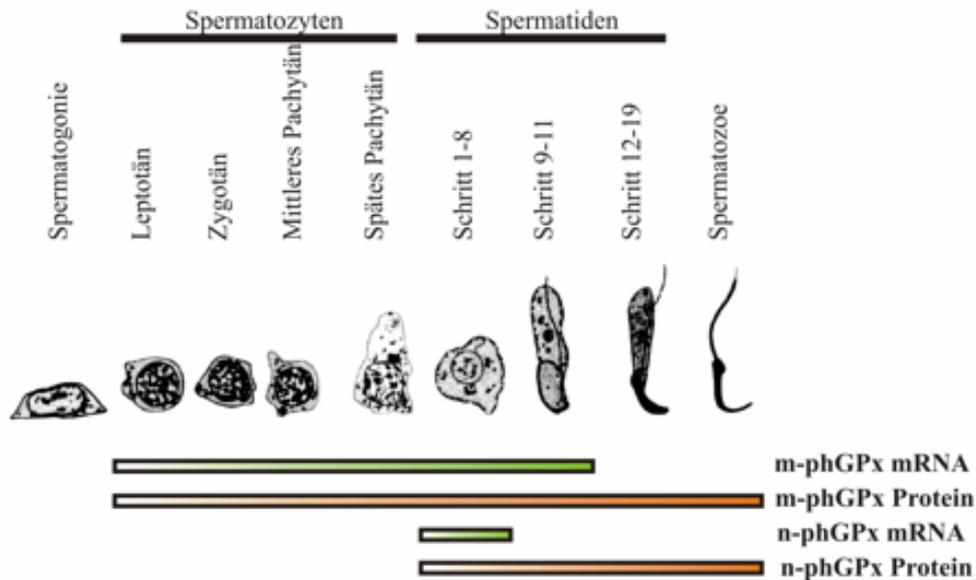
Translokator (ANT) zu spielen. Dieser reguliert unter Beteiligung von pro-apoptischen Mitgliedern der Bcl-2-Proteinfamilie jene Poren der äußeren Mitochondrienmembran, durch welche Cytochrom c ins Zytosol gelangt (Boya et al., 2001). Die Aktivität von ANT scheint wiederum durch Cardiolipin-Hydroperoxid gehemmt zu werden. Durch Reduktion des Hydroperoxids zum entsprechenden Hydroxyderivat durch die phGPx kann die Aktivität von ANT wieder hergestellt werden (Imai und Nakagawa, 2003).

Weiterführende Untersuchungen zur Funktion der phGPx als anti-apoptischen Faktor in verschiedenen Zellsystemen bestätigten diese Funktion (Brielmeier et al., 2001; Brigelius-Flohe et al., 2000; Huang et al., 2002; Imai et al., 2003). Transgene Mäusen, welche die phGPx überexprimierten, zeigen eine verringerte Tendenz zur Apoptose (Ran et al., 2003) und heterozygote phGPx-Knockout Mäuse waren deutlich empfindlicher gegenüber Strahlen-induzierter Apoptose (Yant et al., 2003).

Die Apoptose ist auch ein zentraler Vorgang bei der Spermatogenese. Die Überexpression beziehungsweise Herunterregulation verschiedener Bcl-2-Proteine führt in den meisten Fällen zu männlicher Sterilität (Baum et al., 2005). Die Funktion der phGPx als anti-apoptischer Faktor bestätigte sich in Versuchen mit EDS (Ethandimethansulfonat) an Ratten. EDS tötet spezifisch Leydig-Zellen ab. Behandlung mit EDS führt zu einer verminderten phGPx-Expression (Maiorino et al., 1998) und einer erhöhte Apoptoserate in Pachytän-Spermatozyten und in Spermatischen (Woolveridge et al., 1999).

### **1.2.4 phGPx in der Spermatogenese**

Die Spermatogenese ist ein hoch komplexer Vorgang, der Zellproliferation, mitotische und meiotische Zellteilungen unreifer Vorläuferzellen sowie Differenzierungsprozesse beinhaltet. Während der Spermatogenese teilen sich die Spermatogonien mehrere Male, bevor sie in die verlängerte Prophase der Meiose eintreten und zu primären Spermatozyten werden. Die meiotischen Teilungen führen zu haploiden Zellen, den Spermatischen, welche sich zu Zellen – den Spermatozoen – differenzieren, die spezialisierte Organellen für Motilität und Befruchtung enthalten. Dass Selen essentiell für die Spermatogenese ist, zeigten Versuche mit Selen-defizienten Tieren, welche eine niedrige Spermienproduktion bzw. Spermienqualität aufwiesen (Behne et al., 1996). Die phGPx scheint dabei die entscheidende Verknüpfung zwischen Selen, Spermienqualität und Fruchtbarkeit darzustellen.



**Abb. 4:** Expression der phGPx-Isoformen während der Spermatogenese in Ratten (nach (Puglisi et al., 2005)). Erläuterungen Siehe Text.

In den komplexen Prozessen der Spermatogenese hat die phGPx mit ihren Isoformen unterschiedlichste Funktionen inne. Die höchste Expression der phGPx in vielen tierischen Spezies ist im Testis nachzuweisen. Sowohl in den Mitochondrien als auch in Kernen verschiedener Differenzierungsstufen spermatoider Zellen kann phGPx nachgewiesen werden (Godeas et al., 1994; Godeas et al., 1996). Während die Expression der n-phGPx erst nach der Meiose angeschaltet wird, kann die m-phGPx bereits in Spermatozyten des mittleren Pachytäns nachgewiesen werden (Abb. 4) (Puglisi et al., 2005). Die zytosolische Isoform der phGPx (z-phGPx) spielt im Testis eine eher untergeordnete Rolle (Pushpa-Rekha et al., 1995) und wird dort bevorzugt in Leydig-Zellen gefunden (Nayernia et al., 2004).

Im Testis wird die phGPx erst nach der Pubertät exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass die phGPx-Expression in hypophysektomierten Ratten vollständig unterdrückt und durch Gonadotropingabe teilweise wiederhergestellt werden kann (Roveri et al., 1992). Diese Befunde legten eine direkte hormonelle Regulation nahe, die aber nicht bestätigt werden konnte (Brigelius-Flohe et al., 1994; Maiorino et al., 1998). Vielmehr scheint die außergewöhnlich hohe Expression der phGPx besonders in Spermatischen unter Kontrolle von Leydig-Zellen zu stehen (Maiorino et al., 1998). In reifen Spermatozoen sind weder Transkripte noch die enzymatische Aktivität der phGPx nachweisbar (Ursini et al., 1999).

Weitere Untersuchungen ergaben, dass die phGPx als enzymatisch inaktives Strukturprotein in der mitochondrialen Kapsel des Spermienmittelstückes vorliegt (Ursini et al., 1999). Wie bereits erwähnt, zeigt die phGPx eine breite Substratspezifität für Thiole. Im Laufe der Spermatogenese kommt es in den sich entwickelnden Spermien zu einem Absinken des Glutathiongehaltes, was von einer Zunahme an Superoxid-Radikalen und einer Thiol-

Oxidation in bestimmten Proteinen begleitet wird (Aitken und Vernet, 1998; Brigelius-Flohe, 1999). Aufgrund des Mangels an Glutathion könnte die phGPx Cystein-reiche Protamine im Spermienkern oder das Cystein-reiche mitochondriale Kapselprotein der Spermienmittelstücke als Wasserstoffdonatoren verwenden (Godeas et al., 1997; Roveri et al., 2001). Tatsächlich besteht das keratinartige Material der mitochondrialen Kapsel zu etwa 50% aus phGPx, die hier kreuzvernetzt über Disulfid, Diselenid- oder Selendisulfidbrücken mit sich selbst und anderen Proteinen vorliegt (Ursini et al., 1999). In der Literatur wird diskutiert, dass die mitochondriale Kapsel ubiquitinierte Proteine der Spermienmitochondrien maskiert, welche nach dem Eindringen in die Eizelle durch Auflösen der Kapsel freigelegt und danach gezielt proteolytisch abgebaut werden. Dadurch werden die Spermienmitochondrien abgebaut, was die selektive Vererbung der mütterlichen Mitochondrien-Gene gewährleistet (Roveri et al., 2001; Sutovsky et al., 1999; Sutovsky und Schatten, 2000).

Spermatozoen sind aufgrund ihres Reichtums an mehrfach ungesättigten Fettsäuren besonders anfällig für oxidative Schädigungen, die sich nachteilig auf die Beweglichkeit und damit auf die männliche Fruchtbarkeit auswirken könnten (Aitken und Vernet, 1998). Aus diesem Grund muss die Produktion von Sauerstoffradikalen einer exakten Kontrolle unterliegen und die hohe Expression der phGPx könnte bei diesem Regulationsprozess von Bedeutung sein. Andererseits scheint sich die Funktion der phGPx während der Spermatogenese von der Peroxidase, welche vor oxidativem Stress schützt, hin zu einem enzymatisch inaktiven Strukturprotein zu wandeln. Diese vielfältigen Funktionen der phGPx können die Tatsache erklären, dass Selen essentiell für die Ausbildung differenzierter Spermatozoen ist (Behne et al., 1996). Eine Abhängigkeit der phGPx-Expression vom Selenstatus konnte belegt werden (Nam et al., 1997).

Der Zusammenhang zwischen männlicher Unfruchtbarkeit und defekter phGPx-Expression ist in klinischen Studien an infertilen Männern untersucht und zum Teil bestätigt worden (Foresta et al., 2002; Imai et al., 2001; Maiorino et al., 2003). Die Bedeutung der phGPx in der Spermatogenese wird darüber hinaus dadurch unterstrichen, dass sie in ihrem Verteilungsmuster in Spermien evolutionär von der *Drosophila melanogaster* bis zum Menschen konserviert ist (Nayernia et al., 2004).

Die Funktion der nukleären phGPx-Isoform ist bislang noch nicht vollständig verstanden. Jüngste Untersuchungen zeigten, dass Mäuse, die durch gezielte Genmanipulation keine nukleäre phGPx mehr bildeten, sowohl lebensfähig als auch fruchtbar sind (Conrad et al., 2005). Darüber hinaus scheint das Enzym für die Chromatinkondensation nicht essentiell zu

sein (Conrad et al., 2005). Möglicherweise wird die Funktion der n-phGPx von der zytosolischen Isoform übernommen, die im Spermienkopf nachgewiesen wurde (Maiorino et al., 2005).

### **1.2.5 Embryonalentwicklung**

Zwei unabhängigen Arbeitsgruppen ist es im Jahre 2003 gelungen homozygote phGPx-Knockout Mäuse herzustellen (Imai et al., 2003; Yant et al., 2003). In beiden Studien konnte gezeigt werden, dass homozygote Knockout-Mäuse den Tag E7,5 nicht überleben. Diese Resultate demonstrieren eine essentielle Bedeutung der phGPx während der Embryogenese. Immunohistologische Daten mit einem monoklonalen phGPx-Antikörper geben Hinweis auf eine Expression der phGPx in Wildtyp-Mäusen ab Tag E7,5 (Imai et al., 2003). Weitere Hinweise gibt es auf eine Expression der phGPx-mRNA im embryonalen Maus-Hirn (Lei und Cheng, 2002). Die Ursachen für den letalen Phänotyp der homozygoten Knockout-Mäuse und die Funktion der phGPx in der Embryogenese bedürfen weiterer Klärung. Jüngste Untersuchungen auf mRNA-Ebene geben Hinweis darauf, dass die Isoformen der phGPx während der Embryogenese der Maus differentiell exprimiert werden (Borchert *et al.*, in Vorbereitung, 2006a). Gezieltes Abschalten der phGPx-Isoformen durch siRNA führt darüber hinaus zu gestörter Organogenese während der Embryonalentwicklung (Borchert *et al.*, in Vorbereitung, 2006b).

## **1.3 Kontrolle der Genexpression Protein-kodierender Gene in eukaryotischen Zellen**

Im Laufe ihrer Entwicklung müssen Zellen auf unterschiedlichste Signale reagieren. Dazu müssen sie in der Lage sein, ihr genetisches Material differentiell zu exprimieren. Die Expression eines Proteins von einem entsprechenden Gen kann auf vielfältige Weise kontrolliert werden. Der erste und wohl wichtigste Schritt in der Expressionskontrolle ist die Regulation der Transkription. Hierbei wird festgelegt, ob und wie häufig ein Gen abgelesen und ein primäres Transkript gebildet wird. Daran schließen sich vielfältige post-transkriptionelle Prozesse an, die ebenfalls einer exakten Kontrolle unterliegen. Dazu gehören Modifizierungen des primären Transkriptes wie Spleißen, Poly-Adenylierung und Capping. Nach dem Transport des reifen Transkripts aus dem Kern ins Zytosol, können die Lokalisation des Transkripts im Zytoplasma, die Transkriptstabilität und die Translation reguliert werden. Schließlich ist die Lokalisation, Stabilität und Aktivität der synthetisierten Proteine Ziel weiterer Kontrollmechanismen. Das Ziel der folgenden beiden Kapitel ist es einen Überblick über die vielfältigen Regulationsmechanismen zu geben, welche die

Expression Protein-kodierender Gene bis hin zum fertigen Genprodukt (modifiziertes Protein) beeinflussen.

### **1.3.1 Regulation der Transkription durch die RNA-Polymerase II**

Die Transkription Protein-kodierender Gene erfolgt durch die RNA-Polymerase II und erfordert die konzertierte Aktion multipler Proteine und Transkriptionsfaktoren. Diese Faktoren können in drei Gruppen unterteilt werden (Martinez, 2002):

1. sequenz-spezifische DNA-bindende Regulatoren, die im proximalen Promotorbereich und/oder an weiter entfernten cis-regulatorischen DNA-Elementen binden und so die Effizienz der Transkription des Zielgens in gewebe- oder zellspezifischem Muster oder als Antwort auf unterschiedliche Signale regulieren können.

2. basale Transkriptionsfaktoren, die ubiquitär vorkommen und die RNA-Polymerase II (PolII) einschließen. Zu diesem Satz an generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs) gehören auch die Proteine der Transkriptionsinitiation, die an DNA-Sequenzen (z.B. TATA-Box oder Initiator (Inr) -Element) des minimalen Promotors binden und die PolII zu den spezifischen Promotoren leiten.

3. Co-Faktoren, die mit Sequenz-spezifischen Regulatoren und der basalen Transkriptionsmaschinerie interagieren können und so die Effekte dieser Regulation direkt durch Protein-Protein-Interaktionen oder indirekt durch Modifizierung der Chromatinstruktur beeinflussen.

Diese multiplen, kooperativen Protein-Protein- und Protein-DNA-Interaktionen führen zur Ausbildung spezifischer Nukleoprotein-Komplexe – so genannter Enhanceosomen (Carey, 1998). Diese wiederum ermöglichen die exakte Platzierung und Etablierung des basalen Transkriptionsapparates aus PolII und GTFs am basalen Promotor (Roeder, 1996). Transkriptionsfaktoren müssen verschiedene Eigenschaften mit sich bringen (Latchman, 1990). Erstens, müssen sie bestimmte Struktur motive besitzen, mittels derer sie Sequenz-spezifisch DNA binden können (Zink-Finger, Helix-Turn-Helix-Motiv, Leucin-Zipper, u.a.). Zweitens, müssen sie in der Lage sein, nach dem Binden an die DNA mit anderen Faktoren oder der PolII selbst zu interagieren, um die Transkription positiv oder negativ zu beeinflussen. Drittens, müssen die Faktoren selbst einem Regulationszyklus unterliegen, der gewährleistet, dass ihre regulatorische Aktivität in Abhängigkeit vom Muster stimulierender bzw. hemmender Faktoren beeinflusst wird.

Der basale Transkriptionsapparat in eukaryotischen Zellen besteht aus PolII und sechs GTFs einschließlich des Transkriptionsfaktors IIA (TFIIA), TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF und

TFIIH. Mit der Ausnahme von TFIIIB, welches ein einziges Polypeptid ist, sind alle anderen humanen GTFs stabile Komplexe von bis zu 14 verschiedenen Proteinen (Martinez, 2002). Die PolII selbst ist ein großer Multi-Enzym-Komplex von etwa 0,5 MDa. Trotz ihrer Komplexität ist PolII nicht selber in der Lage, Promotoren zu erkennen und die Transkription zu initiieren. Dazu bedarf es der Erkennung spezieller DNA-Elemente (wie TATA-Box oder Inr-Element) durch GTFs, die mit der PolII den Präinitiationskomplex bilden und anschließend die Transkriptionsinitiation ermöglichen (Roeder, 1996).

Die TATA-Box, welche etwa 30 bp vor dem Transkriptionsstart liegt, ist eines der bekanntesten DNA-Elemente im minimalen Promotor und wird vom TATA-bindenden Protein (TBP), einer Untereinheit von TFIID, gebunden (Burley und Roeder, 1996). Tatsächlich findet sich jedoch nur in etwa 32% der humanen Promotoren eine TATA-Box ähnliche Sequenz (Suzuki et al., 2001). Dem gegenüber scheinen GC-, CCAAT- und Inr-Elemente mit einer Häufigkeit von 97%, 64% beziehungsweise 85% viel häufiger in humanen Promotoren aufzutreten (Suzuki et al., 2001). In TATA-losen Promotoren scheint die Transkription eher von Faktoren wie dem Inr- oder dem DPE-Element (stromabwärts gelegenes Promotorelement) abhängig zu sein, welche von Untereinheiten des TFIID, den TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) erkannt und gebunden werden (Kadonaga, 2002; Smale, 1997). Die Interaktion von TFIID, GC-Box-bindendem Sp1 und anderen Faktoren regelt die Transkription von TATA-losen Promotoren (Azizkhan et al., 1993; Crawford et al., 1999; Faber et al., 1993; Wiley et al., 1992).

Eine weitere Herausforderung für die Transkriptionsmaschinerie ist die Tatsache, dass DNA in eukaryotischen Zellen mit Histon-Proteinen assoziiert vorliegt. Diese Komplexen Strukturen werden als Nukleosomen bezeichnet. In ihrer kondensierten Struktur sind Nukleosomen nicht transkribierbar. Aus diesem Grunde müssen transkriptionelle Aktivatoren dem inhibitorischen Einfluss der Histone entgegenwirken. Eine Klasse solcher Aktivatoren sind Chromatin-remodellierende Komplexe, die unter ATP-Verbrauch Chromatinstrukturen öffnen und für DNA-bindende Proteine zugänglich machen (Kingston und Narlikar, 1999). Zum anderen beeinflussen Histon-Azetyltransferasen bzw. Histondeazetylasen, die den Azetylierungsgrad der Histonproteine regulieren, die Chromatinstruktur, indem sie die Interaktion der Histone mit der DNA verändern (Orphanides und Reinberg, 2000).

Ein weiterer regulatorischer Prozess der Genexpression ist die Methylierung von Cytosin in CpG-Nukleotiden, welche negativ mit der transkriptionellen Aktivität bestimmter DNA Abschnitte korreliert (Heby, 1995). Die Verteilung methylierten Cytosins im Genom ist nicht zufällig. Insgesamt ist der größte Teil des menschlichen Genoms methyliert. In bestimmten

Regionen, den so genannte CpG-Inseln, liegt Cytosin unmethyliert vor. Diese CpG-Inseln machen 1-2% des Säuger-Genoms aus und finden sich meist in den Promotor-Regionen so genannter Haushaltsgene. Ihr nicht-methylierter Status ist essentiell für ihre korrekte Expression (Caiafa und Zampieri, 2005; Heby, 1995).

### **1.3.2 Post-transkriptionelle Ereignisse**

Nachdem sich am Promotor eines Gens der Präinitiationskomplex gebildet hat, die Transkription initiiert und die Elongationsphase eingeleitet wurden, erfolgen kotranskriptionell die ersten prä-mRNA-Prozessierungsschritte. Das Transkript ist dabei zu jeder Zeit durch eine Vielzahl von Proteinen, den heterogenen nukleären Ribonukleoproteinen (hnRNPs) oder den mRNA-Protein-Komplexproteinen (mRNPs) gebunden (Dreyfuss et al., 2002). Die Proteinbindung beginnt bereits während der Transkription am wachsenden Transkript und die Proteine bleiben teilweise bis zur Translation an die RNA gebunden. Die Ribonukleoprotein-Komplexe (RNPs) stellen die funktionelle Form dar, in der prä-mRNA und mRNA in der Zelle existieren und sind hochgradig dynamisch angelegt. Zu jedem Zeitpunkt der Expressionskaskade wird der RNP verändert und diese Veränderungen beeinflussen den Export, die Lokalisation, die Translation und die Stabilität der mRNA.

Sobald die wachsende prä-mRNA 20-40 Nukleotide lang ist, findet vermittelt durch die Interaktion der PolIII und der Capping-Enzyme die Cap-Reaktion statt (Neugebauer, 2002). Daran schließen sich die ersten Spleißprozesse an. Erkennt der Transkriptionsapparat die Polyadenylierungssequenz auf der DNA, bildet sich der Polyadenylierungskomplex heraus, der die Termination der Transkription und Poly-Adenylierung des Primärtranskriptes einleitet (Neugebauer, 2002; Proudfoot et al., 2002).

Die 5'-terminale Cap-Struktur ist ein Merkmal von durch PolIII transkribierten prä-mRNA Spezies und wird im Kern vom so genannten Cap-bindenden Komplex und im Zytosol vom eukaryotischen Translationsfaktor 4E (eIF4E) gebunden. Sie vermittelt einen Schutz vor Abbau durch RNasen und spielt für eine Reihe anderer Prozessen (prä-mRNA-Spleißen, Poly-Adenylierung, nukleären Export) eine wichtige Rolle (Lewis und Izaurralde, 1997).

Die Modifizierung des 3'-Endes der transkribierten RNA beinhaltet das Schneiden der RNA hinter dem Poly-Adenylierungssignal (AAUAAA) und die anschließende Poly-Adenylierung (Wahle und Keller, 1996). Diese Reaktion findet in enger Kommunikation mit der PolIII, dem Cap-bindenden Komplex und den ersten Spleißprozessen statt (Proudfoot et al., 2002). Das poly(A)-Ende der RNA wird gebunden von Poly(A)-bindenden Proteinen. Diese stellen ein Gerüst dar, das notwendig für den Export der reifen mRNA aus dem Kern ins Zytoplasma ist.

Weiterhin spielt dieser Komplex für die Initiation und Termination der Translation und die Regulation des Abbaus der mRNA eine wichtige Rolle (Mangus et al., 2003).

Ungefähr 85-95% der Gene in Säugern, Nematoden und Pflanzen enthalten Introns, welche die kodierenden Exons von einander trennen (Singh, 2002). Das Entfernen der Introns (Splicing) kann sowohl ko- als auch post-transkriptionell erfolgen und umfasst einen komplexen Prozess in einem Multienzym-Komplex, dem Spleißosom (Goldstrohm et al., 2001). Neben alternativen Transkriptionsstarts und alternativen Poly-Adenylierungen stellt die alternative Verwendung von Exons, das alternative Spleißen, eine dritte Möglichkeit dar, die Vielfalt der wahrscheinlich mehr als 100.000 produzierten Proteine von einem Genom von wohl kaum mehr als 35.000 Genen zu gewährleisten (Goldstrohm et al., 2001).

Die reife mRNA wird als Ribonuklein-Komplex (mRNP) durch nukleäre Poren in das Zytosol geschleust (Zenklusen und Stutz, 2001). Daraufhin können die mRNAs intrazellulär in bestimmte Regionen lokalisiert werden. Da die mRNAs als Matrizen für die Translation dienen, ist es auf diese Weise möglich, dass Proteine in jenen speziellen, subzellulären Regionen synthetisiert werden können, wo sie benötigt werden (Bassell et al., 1999; St Johnston, 1995). Die nun reife mRNA lässt sich in 5'-untranslatierte Region, die kodierende Sequenz und 3'-untranslatierte Region untergliedern.

Der nächste Schritt in der Genexpression ist die Übersetzung der genetischen Information von mRNA in Protein – die Translation. Die Regulation der Translation ist ein überaus komplexer Mechanismus, der in vielen Situationen des zellulären Lebenszyklus, wie z.B. der Embryogenese, unter Stressbedingungen, während der Apoptose, moduliert wird (Holcik und Sonenberg, 2005; Kean, 2003; Kleene, 2003; Pickering und Willis, 2005; van der Velden und Thomas, 1999). Die Translation erfolgt im Ribosom unter Beteiligung einer Vielzahl von allgemeinen eukaryotische Initiations- (eIF), Elongations- (eEF) und Terminationsfaktoren (eRF) und kann in drei Phasen unterteilt werden – die Initiation, die Elongation und die Termination. Obwohl alle drei Phasen unterschiedlichen regulatorischen Mechanismen unterliegen, scheint unter den meisten Umständen die Translationsinitiation der limitierende Schritt zu sein.

Die vielfältigen Regulationsmechanismen der Translation lassen sich in zwei Gruppen untergliedern. Zum einen stellt die globale Kontrolle einen Mechanismus dar, über den der translationale Status fast des ganzen Transkripts beeinflusst werden kann. Durch Modulierung der intrazellulären Konzentration oder der Aktivität von Translationsfaktoren (z.B. Phosphorylierung) kann das erreicht werden (de Haro et al., 1996; Gingras et al., 2001; Gray und Wickens, 1998; Morley et al., 1997). Zum anderen ist es durch mRNA-spezifische

Kontrollmechanismen möglich, die Translation einzelner mRNA-Spezies zu modulieren (Wilkie et al., 2003). Die geschieht vor allem durch regulatorische Proteine, die spezifisch an mRNA-Elemente binden, die in der 5'- und/oder 3'-untranslatierten Region sitzen. Dazu gehören die Cap-Struktur, interne ribosomale Bindestellen, stromaufwärts gelegene Startkodone sowie sekundäre RNA-Strukturen wie Haarnadel-Elemente und zytosolische Polyadenylierungssignale (Gebauer und Hentze, 2004; Gray und Wickens, 1998).

Der letzte Schritt im Leben einer mRNA ist ihr kontrollierter Abbau. Die Regulation dieses Schrittes ist ein wichtiger Kontrollpunkt, da er neben der RNA-Synthese die Konzentration eines Transkripts in der Zelle bestimmt. Ein Weg der zum mRNA-Abbau führt, wird durch die Verkürzung des poly-A-Endes initiiert. Ein weiteres Signal zum RNA Abbau wird durch das Entfernen der Cap-Struktur gegeben, das den sukzessiven Verdau der verbleibenden mRNA durch Exonukleasen einleitet (Wilusz et al., 2001). Zumindest in *Saccharomyces cerevisiae* scheint dies in so genannten zytoplasmatischen Prozessierungskörpern abzulaufen (Sheth und Parker, 2003; Wickens und Goldstrohm, 2003). Der Abbau der RNA wird unter anderem durch den Translationsapparat (eIF4E und eIF4G), durch cis-regulatorische Sequenzen in der 5'- und 3'-untranslatierten Region oder Protein-Komplexen an Exon/Exon-Verbindungen (Nonsense-vermittelten Abbau) reguliert (Le Hir et al., 2000; Schwartz und Parker, 1999; Wilusz et al., 2001).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien und Gebrauchswaren

Standardchemikalien wurden sofern nicht anders angegeben von den Firmen Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), ICN (Eschwege), Merck (Darmstadt) oder J.T.Baker (Deventer, Niederlande) bezogen. Weitere Chemikalien und Gebrauchswaren werden in der Beschreibung der Methoden aufgeführt.

#### 2.1.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Elektrophoreseeinheit Hoefer, Mighty Small Mini-Vertical Unit	Amersham Biosciences, Freiburg
Blot-Kammer, Fastblot B44	Biometra, Göttingen
Elektrophoreseeinheit, Modell S2	Biometra, Göttingen
Brutschrank	COTECH, Berlin
Inkubator	COTECH, Berlin
Laminarboxen	Stuart Scientific, UK
Gel-Imager	Biometra, Göttingen
Wasserbäder	Haake, Karlsruhe
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Gerät	Janke & Kunkel GmbH, Staufen
Stromversorgungsgeräte	Biometra, Göttingen
Brutschrank T6120	Heraeus, Hanau
GeneQuant	Amersham Biosciences, Freiburg
UV Transilluminator Ti5	Biometra, Göttingen
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Zentrifuge Sorvall TC; Rotor H400	DuPont
Zentrifuge Sorvall RC28S; Rotor GS3; Rotor SS-34	DuPont
MilliQUF PLUS	MilliPore, Bedford, USA
UV-160A UV-visible Spektrophotometer	Shimadzu, Duisburg
Rotor-Gene RG-3000	Corbett Research, Sydney, Australien
Luminometer, Lumat	Berthold, Bundoora, Australien
Ultraschallsonde Labsonic U	B.Braun, Melsungen
Ultraschallsonde UP 50H	Dr. Hielscher, Teltow

#### 2.1.3 Enzyme

Enzym	Hersteller
T4 DNA Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim
T4 Polynukleotid Kinase	Promega, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
Alkalische Kälberdarm-Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim

### 2.1.4 DNA-Banken und Plasmide

Maus Testis Matchmaker cDNA Expressionsbibliothek (Clontech, Palo Alto, USA)

Plasmid	Hersteller
pGL3 Control (Luziferase-Kontrollvektor)	Promega, Mannheim
pCR4-TOPO (Klonierungsvektor)	Invitrogen, Karlsruhe
pCR2.1-TOPO (Klonierungsvektor)	Invitrogen, Karlsruhe
pBlueTOPO (β-Galaktosidase Reportervektor)	Invitrogen, Karlsruhe
pGEX-4T-3 (Expressionsvektor)	Amersham Biosciences, Freiburg
pIIIA-MS2-1 (Expression der MS2-Hybrid-RNA in <i>S. cerevisiae</i> )	D. Bernstein, Universität Wisconsin, USA
pACT2 (Vektor der Matchmaker cDNA Expressionsbibliothek)	Clontech, Palo Alto, USA)

### 2.1.5 Bakterien- und Hefestämme und Zelllinien

- Escherichia coli:
- TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe)
  - XL1Blue (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)
  - BNN132 (Clontech, Palo Alto, USA)
  - BL21 (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Saccharomyces cerevisiae:
- YBZ-1 (Mata, *ura3-52, leu2-3, 112, his3-200, trp1-1, ade2, LYS2::(LexAop)-HIS3, ura3::(lexA-op)-LacZ, LexA-MS2 coat (N55K)*) (D. Bernstein, Universität Wisconsin, USA)
  - R40 (MAT $\alpha$ , *ura3-52, leu2-3, 112, his3-200, trp1-1, ade2, LYS2::(LexAop)-HIS3, ura3::(lexA-op)-LacZ, LexA-MS2 coat (TRP1)*) (D. Bernstein, Universität Wisconsin, USA)
- Humane Zellen:
- Humane embryonale Nierenzellen 293 (HEK293), DSM ACC 305 Zelltyp (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig)

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

Grundlegende molekularbiologische Methoden wie Nukleinsäurepräparationen, Reinigung von DNA-Fragmenten, Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäurelösungen, Agarose-Gelelektrophorese und Klonierungen (Spaltung mit Restriktionsendonukleasen, Phosphatase- bzw. Kinase-Behandlungen, Ligation und Transformation) erfolgten nach Standardmethoden entsprechend der Produktinformationen und Vorschriften der Hersteller. Sequenzierungen wurden bei MWG Biotech, Ebersberg durchgeführt.

### 2.2.1 Konstruktion von Reportergenen

- Oligonukleotide (synthetisiert von TIB MOLBIOL, Berlin):

Oligonukleotid	Sequenz 5'... 3'	Mutagenese von
mFP1-up	CGT AAG CCC ATG CTA GTC CAA GCC GTC CCT	Sp1-Bindemotiv in FP1
mFP1-do	AGG GAC GGC TTG GAC TAG CAT GGG CTT ACG	
mFP2-up	ATT CAG GCT TCC CTA CCG CTG CAG GGG	NF-Y-Binde- motiv in FP2
mFP2-do	CCC CTG CAG CGG TAG GGA AGC CTG AAT	
mFP3-up	AAG AGA CGT CAG TGT ACG TGC CCG AGG GCG GGC	Sp1-Bindemotiv in FP3
mFP3-do	GCC CGC CCT CGG GCA CGT ACA CTG ACG TCT CTT	
mFP4A-up	TCG CGC GTC CAT CGG TCG GCT GCG TGA	NF-Y-Binde- motiv in FP4A
mFP4A-do	TCA CGC AGC CGA CCG ATG GAC GCG CGA	
mFP4B-up	TCG GCT GCG TGA GTG GAG GAG CCG CTG	Sp1-Bindemotiv in FP4B
mFP4B-do	CAG CGG CTC CTC CAC TCA CGC AGC CGA	

Die von mir verwendeten Expressionsvektoren wurden von A. Borchert unter Verwendung des pBlueTOPO-Reportervektors (Invitrogen, Karlsruhe) hergestellt. Entsprechend der Herstellerangaben wurden die PCR-Fragmente B1 (915 bp – 1160 bp) und C1 (915 bp – 1239 bp) des murinen (*Mus musculus*) pHGPx-Gens (Accession ID: AJ012104) in den Promotor-losen Vektor pBlueTOPO vor das Reporter-gen der  $\beta$ -Galaktosidase kloniert.

In den Reporter-gen-Konstrukte wurden die cis-regulatorischen DNA-Sequenzen der identifizierten Protein-DNA-Interaktionen so mutiert, dass die entsprechenden trans-regulatorischen Faktoren nicht mehr binden konnten. Nachdem im kompetitiven DNA-Gelshift-Assay (siehe 2.2.2) überprüft worden war, dass die mutierten Sequenzen die entsprechenden Proteine nicht mehr binden konnten, wurden die Mutationen durch ortsgerichtete Mutagenese mit Hilfe des QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) entsprechend der Herstellerangaben in die Reporter-gen-Konstrukte eingeführt. Erfolgreiche Mutagenese wurde durch Sequenzieren bestätigt.

### 2.2.2 DNA-Gelshift-Assay

- 5X Bindungspuffer: 100 mM HEPES; 250 mM KCl; 15,63 mM EDTA; 40% Glycerol; 2,5 mM DTT
- 10X TBE-Puffer: 890 mM Tris; 890 mM Borsäure; 20 mM EDTA
- 5%iges Acrylamid-Gel: 2,5 ml Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1) (Roth, Karlsruhe); 1,25 ml 40% (w/v) Acrylamid; 1,2 ml 10X TBE; 19,18 ml destilliertes Wasser; 20  $\mu$ l TEMED; 240  $\mu$ l 10% (w/v) APS
- Oligonukleotide (synthetisiert von BIOTEZ, Berlin):

DNA-Sonden	Sequenz 5'... 3'	Beschreibung
<b>Gelshift-Sonden</b>		
FP1 up	GTA AGC CCA GCC CCG CCC AAG CCG TCC CTT CAT TCA	Footprint- Region 1
FP1 do	TGA ATG AAG GGA CGG CTT GGG CGG GGC TGG GCT TAC	
FP2 up	ATT CAG GCT TCC CAT TGG CTG CAG GGG CCT CGC GTC	Footprint- Region 2
FP2 do	GAC GCG AGG CCC CTG CAG CCA ATG GGA AGC CTG AAT	

## 2 Material und Methoden

FP3 up	AAT AAG AGA CGT CAG TGG GCG TGC CCG AGG GCG GGC	Footprint-Region 3
FP3 do	GCC CGC CCT CGG GCA CGC CCA CTG ACG TCT CTT ATT	
FP4A up	CCA TAC TCG GCC TCG CGC GTC CAT TGG TCG GCT GCG	Footprint-Region 4A
FP4A do	CGC AGC CGA CCA ATG GAC CGC CGA GGC CGA GTA TGG	
FP4B up	TCG GCT GCG TGA GGG GAG GAG CCG CTG GCT CCG GCC	Footprint-Region 4B
FP4B do	GGC CGG AGC CAG CGG CTC CTC CCC TCA CGC AGC CGA	
E1A up	G GCT CCG GCC GCC GAG ATG AGC TGG GGC CGT CTG AGC CGC TTA CTT	Exon 1a Teil A
E1A do	AAG TAA GCG GCT CAG ACG GCC CCA GCT CAT CTC GGC GGC CGG AGC C	
E1B up	GC CGC TTA CTT AAG CCA GCA CTG CTG TGC GGG GCT CTG GCT GCG CC	Exon 1a Teil B
E1B do	GG GCG AGC CAG AGC CCC GCA CAG CAG TGC TGG CTT AAG TAA GCG GC	
E1C up	CTG GCT GCG CCT GGT CTG GCA GGC ACC ATG GTG GGC TAC TGG GAA C	Exon 1a Teil C
E1C do	G TTC CCA GTA GCC CAC CAT GGT GCC TGC CAG ACC AGG CGC AGC CAG	

### Konsensus-Oligonukleotide (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)

Smad3/4 up	TCG AGA GCC AGA CAA AAA GCC AGA CAT TTA GCC AGA CAC
Smad3/4 do	GTG TCT GGC TAA ATG TCT GGC TTT TTG TCT GGC TCT CGA

### Kompetitive Gelshift-Oligonukleotide mit mutierten DNA-Erkennungsmotiven

mFP1 up	CGT AAG CCC ATG CTA GTC CAA GCC GTC CCT	Footprint-Region 1
mFP1 do	AGG GAC GGC TTG GAC TAG CAT GGG CTT ACG	
mFP2 up	ATT CAG GCT TCC CTA CCG CTG CAG GGG CCT CGC GTC	Footprint-Region 2
mFP2 do	GAC GCG AGG CCC CTG CAG CGG TAG GGA AGC CTG AAT	
mFP3 up	AAT AAG AGA CGT CAG TGT ACG TGC CCG AGG GCG GGC	Footprint-Region 3
mFP3 do	GCC CGC CCT CGG GCA CGT ACA CTG ACG TCT CTT ATT	
mFP4A up	CCA TAC TCG GCC TCG CGC GTC CAT TCG TCG GCT GCG	Footprint-Region 4A
mFP4A do	CGC AGC CGA CGA ATG GAC CGC CGA GGC CGA GTA TGG	
mFP4B up	TCG GCT GCG TGA GTG GAG GAG CCG CTG GCT CCG GCC	Footprint-Region 4B
mFP4B do	GGC CGG AGC CAG CGG CTC CTC CAC TCA CGC AGC CGA	

### • Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg):

Antikörper	Antigen
Kaninchen polyklonaler anti-Sp1 (PEP2) Antikörper; 2 µg/µl	Transkriptionsfaktor Sp1
Kaninchen polyklonaler anti-Sp3 (D-20) Antikörper; 2 µg/µl	Transkriptionsfaktor Sp3
Kaninchen polyklonaler anti-NF-Y (H209) Antikörper; 2 µg/µl	Untereinheit NF-YA (CBF-B) des Transkriptionsfaktors NF-Y
Maus monoklonaler anti-Smad1,2,3 (H-2) Antikörper; 0,2 µg/µl	Transkriptionsfaktor Smad3, schwach mit Smad1, Smad2 und Smad5
Kaninchen polyklonaler anti-Smad3 (FL-425) Antikörper; 0,2 µg/µl	Transkriptionsfaktor Smad3 und Smad2, schwach mit Smad 5, Smad1 und Smad8
Ziege polyklonaler anti-Smad4 (C-20) Antikörper; 0,2 µg/µl	Transkriptionsfaktor Smad4

Der DNA-Gelshift-Assay dient dem Nachweis von Protein-DNA-Wechselwirkungen. Das Prinzip beruht darauf, dass Protein-DNA-Komplexe in einer Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen langsamer laufen als freie DNA. Einzelsträngige, komplementäre DNA-

Oligonukleotide wurden gemäß der Protokolle des DIG Gel Shift Kits (Roche Diagnostics, Mannheim) dimerisiert und end-ständig mit Digoxigenin markiert.

Für die Gelshift-Reaktion wurden 48 fmol doppelsträngige, Digoxigenin-markierte Sonde mit nukleären Extrakten (10 µg) in Gegenwart von 167 ng/µl Poly-[d(I-C)] (Amersham Biosciences, Freiburg) und 17 ng/µl Poly-L-Lysin in 1X Bindungspuffer 30 Minuten auf Eis inkubiert. Als Kontrolle dienten Ansätze ohne nukleäre Extrakte.

Darauf erfolgte die Elektrophorese der Gelshift-Reaktionen in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel (8 x 9 cm) in 0,5X TBE-Puffer bei 200 V und 8 °C. Vor der Elektrophorese wurde das Gel bei 200 V und 8 °C mit 0,5X TBE-Puffer äquilibriert.

Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Protein-DNA-Komplexe mittels Kontaktblotting auf eine Nylonmembran (Tropilon Plus; Tropix, Bedford, MA, USA) übertragen. Die Detektion der Protein-DNA-Komplexe erfolgte mit dem DIG Gel Shift Kit entsprechend der Herstellerangaben. Chemilumineszenzsignale wurden durch Exposition auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL; Amersham Biosciences, Freiburg) sichtbar gemacht.

In **kompetitiven Gelshift-Assays** wurde der Gelshift-Reaktion ein molarer Überschuss an nicht markierter DNA-Sonde zugesetzt. Die Bindungsreaktion erfolgte nach zehnminütiger Vorinkubation auf Eis in Gegenwart eines 200-fachen molaren Überschusses an unmarkierter DNA-Sonde. Kompetitive Gelshift-Assays dienen dem Nachweis spezifischer Protein-DNA-Interaktionen. So genannte Konsensus-Oligonukleotide enthalten Erkennungssequenzen (Konsensus-Motive) bekannter DNA-bindender Proteine. Durch Zugabe eines molaren Überschusses an unmarkiertem Konsensus-Oligonukleotid, lässt sich eine Gelshift-Reaktion mit der markierten Sonde verhindern, wenn sie mit demselben DNA-bindenden Faktor interagiert. Oligonukleotide, welche nicht denselben oder keinen Protein-Faktor binden (beispielsweise durch erfolgreiche Mutagenese der DNA-Erkennungssequenz) sind nicht in der Lage mit der markierten Sonde zu kompetieren.

Für **Supershift-Experimente** erfolgte eine einstündige Vorinkubation der nukleären Extrakte mit 2 µg eines spezifischen Antikörpers gegen einen bekannten Transkriptionsfaktor in Bindungspuffer mit Poly-[d(I-C)] und Poly-L-Lysin auf Eis, bevor die Gelshift-Reaktion durch Zugabe der markierten Sonde gestartet wurde. Mithilfe von Supershift-Experimenten lassen sich DNA-bindende Faktoren identifizieren, die an der Bildung spezifischer Protein-DNA-Komplexe beteiligt sind. Kommt es zu einer Antikörper-Reaktion mit dem DNA-bindenden Protein, verringert sich die Migrationsgeschwindigkeit des Komplexes aus Antikörper, Protein und DNA-Sonde im Vergleich zum Protein-DNA-Komplex allein. Es

bildet sich ein so genanntes Supershift-Signal. Stört die spezifische Antikörper-Reaktion die Protein-DNA-Interaktion, führt dies zu einem Aufheben des Shift-Signals.

### 2.2.3 Chromatin-Immunopräzipitation

- Puffer A: 10 mM HEPES, pH 7,9; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM EDTA; 0,5 mM DTT und Protease Inhibitoren Complete Mini (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Puffer B: 20 mM HEPES, pH 7,9; 10% Glycerol; 420 mM NaCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM EDTA; 0,5 mM DTT und Protease Inhibitoren Complete Mini (Roche Diagnostics, Mannheim)
- RIPA-Puffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Natrium-deoxycholat; 1% (v/v) Triton X-100; 0,25 mM EDTA und Protease Inhibitoren Complete Mini (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Elutionspuffer: 1% (w/v) SDS; 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>
- PCR-Primer (synthetisiert von BIOTEZ, Berlin):  
P1(5'-CGC CAA CAA GTC CGC ACG-3');  
P2 (5'-AAA GGC GGC CGA GGC TCA TC-3')
- 50X TAE-Puffer: 2 M Tris, pH 8,1; 10 mM EDTA; 1 M Essigsäure
- 10X DNA-Ladungspuffer: 0,025% (w/v) Bromphenolblau; 20% (w/v) Ficoll 400; 0,1 M EDTA, pH 8,0; 1% (w/v) SDS
- Antikörper (AK): anti-Sp1-AK; anti-Sp3-AK; anti-NF-Y-AK (siehe 2.2.2);  
Huhn polyklonaler anti-Kaninchen 15-Lipoxygenase-Antikörper, 0,68 µg/µl (BioGenes, Berlin)

Die Chromatin-Immunopräzipitation dient dem *in vivo* Nachweis von Protein-DNA-Interaktion an genomischer DNA.

Im ersten Schritt erfolgte die Protein-DNA-Kreuzvernetzung in einer geeigneten Zelllinie (humanen embryonalen Nierenzellen HEK293). Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit DPBS (PAA, PASCHING) erfolgte die Vernetzung durch Inkubation mit 1% Formaldehyd in DPBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden nach Waschen mit DPBS durch Klopfen abgelöst und durch fünfminütige Zentrifugation bei 1000 rpm und Raumtemperatur pelletiert.

Durch zehnmünütige Inkubation der gerneteten Zellen in eiskaltem Puffer A auf Eis wurden die Zellen lysiert und anschließend im Dounce-Homogenisator homogenisiert. Die Kerne wurde durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 4000 g und 4 °C pelletiert und in eiskaltem Puffer C resuspendiert. Mittels Ultraschall (3 x 30s) wurde die genomische DNA in Fragmente von 500 – 1000 bp zerkleinert. Die Abtrennung der Zellfragmente erfolgte durch Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C für 10 Minuten. Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

In einem Ansatz von einem Milliliter wurden 100 µl der Extrakte in RIPA-Puffer mit 5 µg eines Antikörpers über Nacht bei 8 °C inkubiert. Als Negativ-Kontrollen dienten ein Ansatz ohne Zugabe von Antikörper beziehungsweise ein Ansatz mit einem anti-Kaninchen 15-Lipoxygenase-Antikörper. Die Präzipitation der Immunkomplexe erfolgte durch Zugabe von je 50 µl Protein-A-Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), Inkubation für 3

Stunden bei 8 °C, Zentrifugation für eine Minute bei 1000 g. Das Präzipitat wurde anschließend zweimal mit je einem Milliliter DPBS gewaschen und jeweils eine Minute bei 1000 g zentrifugiert.

Die präzipitierten Protein-DNA-Komplexe wurden durch zweimalige Inkubation in Elutionspuffer für 15 Minuten bei Raumtemperatur von der Agarose eluiert. Die Protein-DNA-Kreuzvernetzung wurde durch Inkubation bei 65 °C über 4 Stunden in Gegenwart von 0,3 M NaCl aufgelöst. Als Positiv-Kontrolle wurde in einem Aliquot von unbehandeltem Ausgangsmaterial ebenfalls die Protein-DNA-Kreuzvernetzung aufgehoben. Anschließend wurden die Proteine in den Ansätzen durch 40 µg Proteinase K in 40 mM Tris-HCl und 10 mM EDTA für eine Stunde bei 60 °C verdaut.

Die DNA-Extraktion erfolgte durch Zugabe von 500 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) (Sigma, Deisenhofen), kräftiges Mischen und anschließendes Zentrifugieren bei 14.000 g und 4 °C für drei Minuten. Die wässrige Phase wurde abgetrennt und mit 20 µg Glykogen (Roche Diagnostics, Mannheim) als Fällhilfe und 500 µl 96%igem Ethanol versetzt und über Nacht bei -20 °C erfolgte die DNA-Fällung. Die Ansätze wurden daraufhin 15 Minuten bei 14.000 g und 19 °C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl sterilem Wasser aufgenommen.

Der Nachweis der gefällten DNA-Fragmente erfolgte mittels PCR und den Gen-spezifischen Primern P1 und P2. Es wurden 10 µl der gelösten DNA mit dem Advantage2-Polymerasemix (Clontech, Palo Alto, USA) entsprechend der Herstelleranweisungen amplifiziert. Die Wahl der PCR-Primer erfolgte so, dass sie die cis-regulatorischen DNA-Sequenzen der Transkriptionsfaktoren am Gen der phGPx einschlossen.

Die resultierenden PCR-Fragmente wurden in 1X DNA-Ladungspuffer auf einem 1%igem Agarose-Gel (Promega, Mannheim) mit Ethidiumbromid in 1X TAE-Puffer zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker (New England Biolabs, Schwalbach) elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

#### **2.2.4 RNA-Gelshift-Assay**

- Maleinsäurepuffer: 0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; pH 7,5
- Waschpuffer: Maleinsäurepuffer; 0,3% (v/v) Tween 20
- 10X Blockierungspuffer: Maleinsäurepuffer; 10% (w/v) Blocking reagent (Roche Diagnostics, Mannheim)
- 1X Blockierungspuffer: Maleinsäurepuffer; 10% (v/v) 10X Blockierungspuffer
- Streptavidinpuffer: 1X Blockierungspuffer; 0,2 u/ml Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Detektionspuffer: 0,1 M Tris-HCl, pH 9,5; 0,1 M NaCl
- CSPD-Arbeitslösung: Detektionspuffer; 1% (v/v) CSPD (Roche Diagnostics, Mannheim)

## 2 Material und Methoden

- PCR-Primer (synthetisiert von Biotez, Berlin):  
T7-Kon3-up: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT ACT CAG GGG CCT CGC GTC TTA GCG-3'  
Kon3-do: 5'-GGG GGC TAG CTC TCG GCG GCC GGA GCC AGC G
- TEN-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,1 M NaCl
- 8M Harnstoff-Polyacrylamidgel: 3,6 g Harnstoff; 0,75 ml 10X TBE; 0,95 ml Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 40% (29:1) (Roth, Karlsruhe); DEPC-Wasser auf 15 ml; 8 µl TEMED; 60 µl 10% (w/v) APS)
- DEPC-Wasser: MilliQ-Wasser; 0,05% (v/v) DEPC

Wie der DNA-Gelshift-Assay dient auch der RNA-Gelshift-Assay dem Nachweis von Protein-Nukleinsäure-Interaktionen. Das Prinzip beruht hier darauf, dass Protein-RNA-Komplexe in einer nativen Gelelektrophorese langsamer laufen als freie RNA.

Für die Gelshift-Reaktion wurden unterschiedliche Mengen an Protein (3 µg falls nicht anders angegeben) für 20 Minuten bei 30 °C in 0,5X Bindungspuffer (siehe 2.2.2) in Gegenwart von 7,5 µg/µl Heparin und 25 ng/µl Hefe-tRNA präinkubiert. Als Protein wurden rekombinantes, dialysiertes Protein (siehe 2.3.2) oder als Negativkontrolle BSA (Sigma, Deisenhofen) eingesetzt. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 1 pmol Biotin-markierter RNA gestartet, welche zuvor für 3 Minuten bei 80 °C denaturiert und in einem Eisbad abgekühlt worden war. Die Reaktionsansätze inkubierten darauf weitere 20 Minuten bei 30 °C. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Protein.

- Synthetische DNA-Oligonukleotide (synthetisiert von MWG, Ebersbach):

DNA-Oligo-nukleotid	Sequenz 5'... 3'	RNA-Sonde
T7-up	AAT TTA ATA CGA CTC ACT ATA GG	
T7-Kon3-A-do	CAT CTC GGC GGC CGG AGC CAG CGG CTC CTC CCC TCA CGC AGC CGA CCA ATA GTA CCC TAT AGT GAG TCG TAT TAA ATT	Kon3A
T7-Kon3-B-do	GGA CGC GCG AGG CCG AGT ATG GCT TGC CCG CCC TCG GGC ACG CCC ACT GAA GTA CCC TAT AGT GAG TCG TAT TAA ATT	Kon3B
T7-Kon3-C-do	CGT CTC TTA TTG GTC AGA TGC GCC TGC GCT AAG ACG CGA GGC CCC TGC CTA TAG TGA GTC GTA TTA AAT T	Kon3C
T7-Kon3-A1-do	CAT CTC GGC GGC CGG AGC CAG CGG CTC CTC CCC TCA CCT ATA GTG AGT CGT ATT AAA TT	Kon3A1
T7-Kon3-A2-do	CAT CTC GGC GGC CGG ACC CTC ACG CAG CCG ACC AAT CCT ATA GTG AGT CGT ATT AAA TT	Kon3A2
T7-Kon3-A3-do	GGA GCC AGC GGC TCC TCC CCT CAC GCA GCC GAC CAA TCC TAT AGT GAG TCG TAT TAA ATT	Kon3A3
T7-Kon3-A4-do	GGA GCC AGC GGC TCC TCC CCT CAC GCA GCC GCC TAT AGT GAG TCG TAT TAA ATT	Kon3A4
T7-Kon3-A5-do	GGA GCC AGC GGC TCC TCC CCT CAC GCA GCC GAC CCC TAT AGT GAG TCG TAT TAA ATT	Kon3A5
T7-Kon3-A6-do	CCA GCG GCT CCT CCC CTC ACG CAG CCG ACC AAT CCT ATA GTG AGT CGT ATT AAA TT	Kon3A6
T7-Kon3-A7-do	CTC GGC GGC CGG AGC CAG CGG CTC CCA GCC GAC CAA TCC TAT AGT GAG TCG TAT TAA ATT	Kon3A7
T7-Kon3-D1-do	TCC TCC CCT CAC GCA GCC GAC CAA TGG ACG CCT ATA GTG AGT CGT ATT AAA TT	Kon3D1

Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung auf einem Polyacrylamidgel unter nicht-denaturierenden Bedingungen in 0,5X TBE-Puffer (siehe 2.2.2) bei 200 V und 8 °C. Vor der Elektrophorese wurde das Gel bei 200 V und 8 °C mit 0,5X TBE-Puffer äquilibriert. Für RNA-Elektrophoresen wurden grundsätzlich DEPC-behandeltes Wasser (0,05%; v/v) verwendet.

Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Protein-DNA-Komplexe mittels Kontaktblotting auf eine Nylonmembran (Tropilon Plus; Tropix, Bedford, MA, USA) übertragen. Die noch feuchte Membran wurde darauf 3 Minuten auf einem Transilluminator bei 312 nm inkubiert, um die RNA mit der Membran zu vernetzen.

Die Detektion erfolgte mit Hilfe einer Streptavidin-gekoppelten alkalischen Phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim), welche spezifisch Biotin bindet. Nach dem Trocknen der Membran für 10 Minuten inkubierte die Membran in Waschpuffer für 5 Minuten, in 1X Blockierungspuffer für 30 Minuten und in Streptavidinpuffer für 30 Minuten. Daran schloss sich zweimaliges Waschen in Waschpuffer für je 15 Minuten und anschließende Inkubation in Detektionspuffer für 5 Minuten an. Schließlich erfolgte die Detektion der Chemilumineszenzsignale durch Zugabe einer CSPD-Arbeitslösung, Inkubation bei 37 °C für 10 Minuten und Exposition auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL; Amersham Biosciences, Freiburg).

Für *kompetitive RNA-Gelshift-Assays* erfolgte die Vorinkubation der Gelshift-Reaktionen in Gegenwart eines 40-fachen molaren Überschusses an unmarkierter RNA für 20 Minuten bei 30 °C. Vor der Zugabe der unmarkierten Kompetitor-RNA wurde diese für 3 Minuten bei 80 °C denaturiert und in einem Eisbad abgekühlt. Kompetitive RNA-Gelshift-Assays dienen dem Nachweis spezifischer Protein-RNA-Interaktionen. Die Zugabe eines molaren Überschusses an spezifischer RNA verhindert im kompetitiven Experiment die Bildung eines Protein-RNA-Komplexes. Eine nicht verwandte RNA sollte nicht in der Lage sein, spezifische Protein-RNA-Komplexe zu beeinträchtigen.

Die im RNA-Gelshift-Assay verwendeten RNA-Sonden wurden durch *in vitro Transkription* synthetisiert. Für die *in vitro* Synthese der RNA war es zunächst notwendig, geeignete DNA-Matrizen zu schaffen. Die DNA-Matrize der primären Sonde Kon3 wurde durch PCR mit dem Advantage2-Polymerasemix (Clontech, Palo Alto, USA) entsprechend der Herstelleranweisungen mit den Primern T7-Kon3-up und Kon3-do hergestellt. Der stromaufwärts gelegene PCR-Primer enthielt an seinem 5'-Ende eine Sequenz mit dem T7-Promotor. Als PCR-Matrize diente gereinigte Plasmid-DNA des subklonierten pHGPx-Gens. Das resultierende PCR-Produkt von 179 bp wurde in einem 1%igen Agarose /

1X TAE-Gel (siehe 2.2.3) aufgetrennt und dem QiaQuick Gelextraktionskit (Qiagen, Hilden) gereinigt. Alle weiteren DNA-Matrizen wurden nach der Methode von Milligan *et al.* hergestellt (Milligan *et al.*, 1987). Hierfür wurden zunächst zwei komplementäre DNA-Oligonukleotide in TEN-Puffer durch Kochen für 10 Minuten in einem Wasserbad und anschließendes langsames Abkühlen auf Raumtemperatur doppelsträngig gemacht. Ein einzelsträngiges DNA-Oligonukleotid kodierte für den T7-Promotor und das zweite einzelsträngige DNA-Oligonukleotid für die jeweilige Sequenz der 5'-untranslatierten Region der mitochondrialen phGPx-Isoform in revers komplementärer Orientierung sowie an seinem 3'-Ende für den T7-Promotor ebenfalls in revers komplementärer Orientierung.

Die eigentliche *in vitro* Transkription erfolgte mit dem T7 MEGAscript Kit (ambion, Huntingdon, UK) entsprechend der Herstellerangaben. Als Matrize dienten doppelsträngige DNA-Oligonukleotide mit einem T7-Promotor am 5'-Ende (siehe oben). Für Biotin-markierte Sonden wurde eine geringe Menge Biotin-UTP (Roche Diagnostics, Mannheim) in die Transkriptionsreaktion beigemischt (Verhältnis UTP:Biotin-UTP = 15:1), wodurch Biotin-markiertes UTP in das Transkript eingebaut wurde. Die resultierenden RNAs wurden mit dem MEGAClear Kit (ambion, Huntingdon, UK) entsprechen der Herstellerangaben gereinigt. Die RNA-Gelshift-Reaktionen wurden jeweils mit RNA-Sonden von mindestens zwei unabhängigen *in vitro* Transkriptionen wiederholt.

Die Integrität der *in vitro* transkribierten RNAs wurde durch Elektrophorese in einem denaturierenden Polyacrylamidgel überprüft. Die Elektrophorese erfolgte in einem äquilibrierten Harnstoff-Polyacrylamidgel (8x9 cm) in einem 1X TBE-Puffer (siehe 2.2.3) bei 200 V und Raumtemperatur. Anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe) angefärbt und die RNA an einem Gel-Imager sichtbar gemacht. Als RNA-Molekulargewichtsstandard wurde der RNA-Century Marker (ambion, Huntingdon, UK) verwendet. Vor der elektrophoretischen Auftrennung wurden die RNAs in Gel Loading Solution (ambion, Huntingdon, UK) für 3 Minuten bei 80 °C denaturiert.

### **2.2.5 RNA-Präparation und Reverse Transkription**

Für den *Gewebescreen* der Expression der phGPx- und GRSF1-Isoformen wurden drei männliche Mäuse (*Mus musculus*) des Stammes C57BL6J in einem Alter zwischen 10 und 15 Wochen mittels Ether-Inhalation getötet. Ausgewählte Organe wurden entnommen, in DPBS (PAA, PASCHING) gespült und auf flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die RNA-Präparation erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) und einem DNase-Verdau mit dem RNase-free DNase Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend der Herstellervorschriften.

Das Umschreiben der gewonnenen RNA in die cDNA mit Hilfe der Reversen Transkription (RT) erfolgte mit der M-MLV (Moloney murines Leukämie-Virus) Reversen Transkriptase, RNase H Minus, Punktmutante (Promega, Mannheim). Nach Denaturieren der RNA für 5 Minuten bei 70 °C und sofortigen Abkühlen im Eisbad wurde die RT-Reaktion angesetzt. Die Reverse Transkriptase Reaktion setzte sich wie folgt zusammen: 3 µg Gesamt-RNA; 50 mM Tris-HCl, pH 8,2; 8 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 100 µg/ml BSA; 30 u RNasin (Promega, Mannheim); 0,166 mM dNTPs; 150 mM Oligo-dT<sub>15</sub>-Primer und 50 u M-MLV-Reverse Transkriptase. Die Reaktion inkubierte 90 Minuten bei 37 °C und wurde abschließend bei 70 °C für 15 Minuten inaktiviert.

Zur Analyse der Expression der phGPx- und GRSF1-Isoformen während der **Embryonalentwicklung** der Maus (*Mus musculus*) wurden weiblichen, schwangeren Mäusen vom Trächtigkeitstag 6,5 (E6,5) bis 5 Tage nach der Geburt Embryonen entnommen und in DPBS seziiert. Embryonales Gehirn wurde von Tag E10,5 und Lunge von Tag E12,5 an entnommen. Die embryonalen Gewebe wurden von mindestens drei unabhängigen Muttertieren präpariert, in RNAlater (Qiagen, Hilden) über Nacht inkubiert, bei -80°C gelagert und für die RT vereinigt. Die RNA-Präparation erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) und die Reverse Transkription mit Oligo-dT<sub>15</sub>-Primer und der SuperScript III Reversen Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe) entsprechend der Herstellerangaben.

### 2.2.6 Real-Time-PCR

- Primerkombinationen zur Quantifizierung von Transkriptmengen

Ziel-Gen	Sequenz 5'... 3'	Fragmentgröße
GAPDH		
GAPDH-up	CCA TCA CCA TCT TCC AGG AGC GA	520 bp
GAPDH-do	GGA TGA CCT TGC CCA CAG CCT TG	
m-phGPx		
m-phGPx-up	GAG ATG AGC TGG GGC CGT CTG A	530 bp
m+z-phGPx-do	ACG CAG CCG TTC TTA TCA ATG AGA A	
m+z-phGPx		
z-phGPx-up	CGC CTG GTC TGG CAG GCA CCA	466 bp
m+z-phGPx-do	ACG CAG CCG TTC TTA TCA ATG AGA A	
GRSF1		
GRSF1/2-up	GAA TCC AAA ACT ACC TAC CTG GAA G	426 bp
GRSF1/4-do	CAG CTG TAA GGA AGT CCT CTC AG	
K6-GRSF1		
GRSF1/1b-up	ATT GGG CAC GGG AAC AAG GGA C	506 bp
GRSF1/4-do	CAG CTG TAA GGA AGT CCT CTC AG	

Die Real-Time-PCR ist eine Methode zur Quantifizierung von DNA-Molekülen. Durch kontinuierliches Messen der Fluoreszenzintensität eines in doppelsträngiger DNA interkalierenden Farbstoffes (SybrGreen) während der Amplifizierungsreaktion kann die Kinetik der Amplifizierung verfolgt werden.

Die Quantifizierung der DNA erfolgte an dem Real-Time PCR-Gerät Rotor-Gene 3000 (LTF, Wasserburg) mit dem Quantitect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend der Herstelleranweisungen. Die PCR-Ansätze enthielten 1X QuantiTect-Mix (inklusive SybrGreen, Reaktionspuffer, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, HotStar-Taq-Polymerase), 0,3 µM Primer-Mix (Vorwärts (up) und Rückwärts (do) -Primer) und DNA-Matrize. Als PCR-Kontrolle diente ein Ansatz ohne Zugabe von DNA-Matrize. Die DNA wurde nach folgendem Programm amplifiziert:

Vordenaturierung:	95 °C	15 min
PCR-Zyklen	94 °C	1 min
	65 °C	1 min
	72 °C	1 min und Fluoreszenzmessung
	wiederholen des PCR-Zyklus 45-fach	
Schmelzkurve:	60 °C	1 min
	60 – 99 °C in 1 °C-Schritten	
	je Schritt 5 Sekunden warten und Fluoreszenzmessung	

Die **Schmelzkurve** dient der Kontrolle der Homogenität der PCR-Amplifikate. Ein einheitliches PCR-Produkt schmilzt bei einer definierten Temperatur. Die erste Ableitung der Fluoreszenzsignale nach der Temperatur sollte bei einheitlichem PCR-Produkt nur ein dominantes Maximum besitzen.

Die **Auswertung** der Real-Time PCR-Daten erfolgte mit der Rotor-Gene 3000 Software (Version 4.6.94). Zur Quantifizierung der relativen Transkriptmengen wurden so genannte Standard-Verdünnungen der zu amplifizierenden Genabschnitte hergestellt.

Die Gen-spezifischen externen **Standards**, die für die exakte Quantifizierung des Amplifizierungsprozesses benötigt werden, wurden wie folgt hergestellt. Mit den jeweiligen Primer-Kombinationen wurden die gewünschten PCR-Fragmente mit dem Advantage2-Polymerasemix (Clontech, Palo Alto, USA) entsprechend der Herstelleranweisungen amplifiziert. Die Amplifikate wurden auf einem 1%igen Agarose / 1X TAE-Gel (siehe 2.2.3) elektrophoretisch aufgetrennt, die entsprechenden DNA-Banden aus dem Gel ausgeschnitten, mit dem QiaQuick Gelextraktionskit (Qiagen, Hilden) gereinigt und als Matrizen zur Reamplifikation mit der Advantage2-Polymerasemix eingesetzt. Die resultierenden PCR-Produkte wurden mit dem PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt und die DNA-

Konzentration mit der Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, Karlsruhe) ermittelt. Daraus ließen sich die DNA-Molekülmengen wie folgt berechnen:

$$\frac{c(DNA[g / \mu l])}{Fragmentlänge[bp] \cdot M_r} \cdot N_A = \text{Moleküle} / \mu l$$

NA... 6,022•10<sup>23</sup> Moleküle / mol (Avogadro-Konstante)  
Mr... 660 g / mol • bp (Molgewicht doppelsträngiger DNA)

Anhand dieser Berechnung ließen sich geeignete Standardverdünnungen anfertigen, mit Hilfe derer die Molekülzahlen in den Gewebeproben berechnet werden konnten. Des Weiteren wurden die PCR-Fragmente mit dem TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe) entsprechend der Herstellerangaben in den Vektor pCR2.1 kloniert und ihre Sequenz verifiziert.

Die entsprechenden Standardverdünnungen wurden als DNA-Matrizen für die Real-Time-PCR eingesetzt. Erreicht die Menge an doppelsträngiger DNA einen bestimmten Schwellenwert ( $C_t$ ), an dem das Fluoreszenzsignal das Hintergrundsignal signifikant übersteigt, errechnet die Rotor-Gene Software die absoluten Transkriptmengen in Abhängigkeit von der vordefinierten Standardverdünnungsreihe.

Zur **Quantifizierung relativer Transkriptmengen** in Geweben und Zellen wurde die RNA präpariert (siehe 2.2.5), die RNA in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.5) und die einzelsträngige cDNA als PCR-Matrize für die Real-Time-PCR eingesetzt. Die erhaltenen Transkriptmengen wurden stets auf die parallel ermittelten Transkriptmengen des Haushaltgens Glyzerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) bezogen. Die Analyse der Gewebeexpression der phGPx- und GRSF1-Isoformen erfolgte unabhängig für drei männliche Mäuse (siehe 2.2.5). Aus den relativen Transkriptmengen wurde der Mittelwert bestimmt. Für die Studie des Expressionsverlaufs von m-phGPx und GRSF1 während der Embryogenese wurden Doppeltbestimmungen der vereinigten cDNAs (siehe 2.2.5) durchgeführt und der Mittelwert bestimmt.

### 2.2.7 Rechner-gestützte Sequenzanalyse

Zu DNA-, RNA- oder Protein-Sequenzanalysen, für PCR-Primer-Design, Sequenzvergleiche, Restriktionskarten und weiteres wurde das Programm „DNAssist“ (Version 2.2) verwendet. Mit Hilfe des Programms „MatInspector“ (<http://genomatix.gsf.de>, 05.02.2002) wurden DNA-Sequenzen auf potentielle Bindestellen DNA-bindender Faktoren untersucht. Das Programm vergleicht die so genannten Kernbindesequenzen bekannter Transkriptionsfaktoren mit einer eingegebenen Sequenz, um eine relative Kernsequenz-Homologie auszugeben. Zur

Bestimmung von RNA-Sekundärstrukturen wurde das Programm RNADraw (Version 1.1) beziehungsweise das Programm „mfold“ (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna/>, 1.10.2005) verwendet.

### 2.3 Proteinchemische Methoden

#### 2.3.1 Klonierung der cDNAs der GRSF1-Isoformen

Oligonukleotide (synthetisiert von Biotex, Berlin):

Oligonukleotid	Sequenz 5'... 3'
BamHI-K6-GRSF1-up	CCC CGG ATC CAT TGG GCA CGG GAA CAA GGG AC
NotI-GRSF1-do	CCC CGC GGC CGC TTA TTT TCC TTT AGG ACA TGA ATT TAG G
GRSF1-440-do	CTT CCA GGT AGG TAG TTT TGG ATT C
GRSF1-E1-up	ATG GCC GGG ACG CGC TGG GT
GRSF1-440-up	GAA TCC AAA ACT ACC TAC CTG GAA G
BamHI-GRSF1-up	GGA TCC GGG ACG CGC TGG GTG CTA G

Für die rekombinante Expression der GRSF1-Isoformen in *E. coli* und eine einfache Reinigung der rekombinanten Proteine wurden diese als Fusionsproteine mit einem Glutathion-S-Transferase-Anteil (GST) im N-terminalen Bereich exprimiert. Die kodierende Sequenz der Isoform K6-GRSF1 wurde mit Gen-spezifischen Primern (BamHI-K6-GRSF1-up/ NotI-GRSF1-do), welche am 5'-Terminus die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen BamHI beziehungsweise NotI enthielten, in der PCR mit dem Advantage2 Polymerase Kit (Clontech, Palo Alto, USA) vervielfältigt und mit Standardmethoden in den Vektor pGEX-4T-3 (Amersham Biosciences, Freiburg) kloniert. Als PCR-Matrize diente die subklonierte cDNA von K6-GRSF1 im Vektor pACT2 (Clontech, Palo Alto, USA). Von dem Vektor pGEX-4T-3 kann ein GST-Fusionsprotein gebildet werden, wobei sich der N-terminale GST-Anteil aufgrund einer Thrombin-Schnittstelle mit Thrombin enzymatisch abspalten lässt.

Um die Isoform mGRSF1 zu klonieren, wurde eine 5'-RACE zur Amplifikation von 5'-mRNA-Enden mit dem GeneRacer Kit (Invitrogen, Karlsruhe) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Ausgangsmaterial war eine RNA-Präparation eines murinen Testis (Stamm C57BL6J; zwischen 10 und 15 Wochen alt). Mit Hilfe dieser Methode, dem Advantage GC cDNA PCR Kit (Clontech, Palo Alto, USA) und den Gen-spezifischen Primern GRSF1-440-do und GRSF1-E1-up ist es gelungen, die Sequenz von +62 bp – +440 bp der bekannten GRSF1-cDNA (Nm\_178700) zu amplifizieren. Das Startkodon der mGRSF1-Isoform liegt bei +62 bp. Das PCR-Fragment wurde mit dem TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe) entsprechend der Herstellerangaben in den Vektor pCR4-TOPO kloniert und durch Sequenzieren analysiert. Dieses Fragment wurde mit einem Gen-

spezifischen Primer, welcher über dem Startkodon von mGRSF1 liegt und am 5'-Ende die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease Bam HI (BamHI-GRSF1-up) enthielt, dem Primer GRSF1-440-do und dem Advantage GC cDNA PCR Kit (Clontech, Palo Alto, USA) amplifiziert und das resultierende PCR-Fragment („N“) gereinigt. Für den C-terminalen Bereich wurde ähnlich verfahren. An der subklonierten cDNA von K6-GRSF1 wurde mit den Primer GRSF1-440-up und NotI-GRSF1-do das entsprechende Fragment („C“) mit dem Advantage2 PCR Kit (Clontech, Palo Alto, USA) entsprechend der Herstellerangaben vervielfältigt und gereinigt. Die Primer GRSF1-440-up und GRSF1-440-do verhalten sich revers komplementär zu einander und enthalten die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease PspGI. Mit Standardmethoden wurden die Fragmente „N“ und „C“ in den Vektor pGEX-4T-3 kloniert, um ein vollständiges mGRSF1-Protein zu erhalten, welches als Fusionsprotein mit GST exprimiert werden kann.

### 2.3.2 Expression und Reinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine

2X YTA-Medium: 16 g Trypton; 10 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; pH 7,0; 100 µg/ml Ampicillin

Waschpuffer: 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,3

Elutionspuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 9,5; 10 mM Glutathion

Die Expression der GST-Fusionsproteine erfolgte im *E. coli* Stamm BL21 (Amersham Biosciences, Freiburg). Chemisch kompetente *E. coli* BL21-Zellen wurden nach folgender Methode erzeugt. Exponentiell wachsende BL21-Zellen wurden 15 Minuten bei 2500 g und 4 °C pelletiert, in steriler 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert, 30 Minuten auf Eis inkubiert und erneut 15 Minuten bei 2500 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 mM CaCl<sub>2</sub>/15% (w/v) Glycerol-Lösung resuspendiert und Aliquots bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert. Nach der Transformation in diese Bakterien wurde ein Klon gepickt und die rekombinanten Proteine mit dem GST Gene Fusion System (Amersham Biosciences, Freiburg) entsprechend der Herstellerangaben gereinigt. Kurz zusammengefasst wurde nach folgendem Protokoll gearbeitet. Die BL21-Zellen in 2X YTA-Medium wurden bei exponentiellem Wachstum mit 0,5 mM IPTG für eine Stunde stimuliert, durch Zentrifugation (15 Minuten bei 3622 g und 8 °C) geerntet und Ultraschallbehandlung (6X 10 Sekunden 50W auf Eis) lysiert. Die geklärten (Zentrifugation für 5 Minuten bei 10.000 g und 4 °C) Lysate inkubierten 2 Stunden bei 8 °C mit 100 µl Glutathion-Agarose (Sigma, Deisenhofen) pro 100 ml Kulturmedium. Der Überstand mit den ungebundenen Proteinen wurde durch Zentrifugation (5 Minuten bei 500 g und 4 °C) von der Glutathion-Agarose und der an diese gebundenen Proteine getrennt. Die Glutathion-Agarose wurde dann entsprechend der Herstellerangaben mit Waschpuffer gewaschen und mit Elutionspuffer erfolgte die Elution

der Proteine in mehreren Schritten. Aliquote der Reinigungsschritte wurden mit der SDS-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung (siehe 2.3.3) analysiert und die Elutionsfraktionen mit der besten Proteinausbeute für die Dialyse mit dem Mini Dialysis Kit (Amersham Biosciences, Freiburg) gegen Dialysepuffer (siehe 2.4.3) über Nacht bei 8 °C eingesetzt.

Gegebenenfalls wurde der GST-Anteil enzymatisch mit Thrombin abgespalten. Die Reaktion erfolgte mit 10 u Thrombin (Amersham Biosciences, Freiburg) pro 1 mg dialysiertem Protein für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Der Ansatz inkubierte darauf 2 Stunden bei 8 °C mit einer entsprechenden Menge (etwa 100 µg Glutathion-Agarose pro 50 µg Protein) an vorbereiteter Glutathion-Agarose (Sigma, Deisenhofen). Durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 500 g und 4 °C erfolgte die Abtrennung der freien Proteine von der Glutathion-Agarose, an welche der abgespaltene GST-Anteil gebunden war. Die freien Proteine wurden dann mit dem Amicon Ultra-0.5 System (Millipore, Bedford, USA) konzentriert und die Proteinkonzentration mit dem Roti-Quant Kit (Roth, Karlsruhe) entsprechend der Herstellerangaben und einer Eichkurve von 1 – 10 µg/µl BSA bestimmt.

### 2.3.3 SDS-Gelelektrophorese und Westernblot

- 4%iges Sammelgel: 1,35 ml Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1) (Roth, Karlsruhe); 3 ml Sammelgelpuffer; 4 ml Wasser; 20 µl TEMED; 100 µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat
- 10%iges Trenngel: 4 ml Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis Lösung 30% (29:1) (Roth, Karlsruhe); 3 ml Trenngelpuffer; 5 ml Wasser; 20 µl TEMED; 120 µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat
- Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris; 0,4% (w/v) SDS; pH 6,7
- Trenngelpuffer: 1,5 M Tris; 0,6% (w/v) SDS; pH 8,8
- 5X Elektrophoresepuffer: 125 mM Tris; 100 mM Glycin; 17 mM SDS
- Coomassie-Lösung: 0,2 % (w/v) Coomassiebrilliantblau; 10% (v/v) Methanol; 20% (v/v) Essigsäure
- Entfärbelösung: 40% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure
- 5X PBS (Endvolumen 1 Liter): 7,8g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O; 0,815 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 43,83 g NaCl; pH 7,4
- PBS/Tween20: 1X PBS; 0,1% (v/v) Tween 20
- Anodenpuffer I: 0,3 M Tris, pH 10,4; 20% (v/v) Methanol
- Anodenpuffer II: 0,025 M Tris, pH 10,4; 20% (v/v) Methanol
- Kathodenpuffer: 0,025 M Tris, pH 9,4; 40 mM ε-Aminocapronsäure
- Antikörper:

Antikörper (AK)	Antigen	Bezogen von	Arbeitsverdünnung
anti-GRSF1-AK (gezogen in Kaninchen)	Guanin-reiche Sequenz bindender Faktor 1	AnaSpec, San Jose, USA	1:1000
anti-GST-AK (Peroxidase-Konjugat)	Glutathion-S-Transferase (GST)	Sigma, Deisenhofen	1:20.000
anti-Kaninchen IgG (Peroxidase-Konjugat)	Kaninchen IgG	Sigma, Deisenhofen	1:10.000

Für eine SDS-Gelelektrophorese wurden Proteinextrakte in 1-fachem Ladungspuffer (4X Roti-Load 1; Roth, Karlsruhe) 10 Minuten bei 95 °C denaturiert. Als Molekulargewichtsstandard wurden parallel 6 µl Rainbow Marker RPN800 (Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in einem Acrylamid-Gel (4%iges Sammelgel; 10%iges Trenngel) und 1X Elektrophoresepuffer unter Wasserkühlung in der Elektrophoreseeinheit Hoefer Mighty Small Mini-Vertical Unit (Amersham Biosciences, Freiburg). Nach Beenden der Elektrophorese erfolgte entweder eine Färbung mit Coomassie-Lösung und anschließender Entfernung der Hintergrundfärbung mit Entfärbelösung oder ein Westernblot.

Für einen Westernblot wurden die Proteine bei 10 V für eine Stunde mittels der „semi-dry“-Methode auf eine Nitrozellulose-Membran nach folgendem Aufbau übertragen:

	<i>Kathode</i>	
2x Gelblotting-Papier (Roth, Karlsruhe)		getränkt in Kathodenlösung
SDS-Acrylamidgel		
Nitrozellulosemembran (Schleicher&Schuell, Dassel)		getränkt in Anodenlösung II
1x Gelblotting-Papier		getränkt in Anodenlösung II
1x Gelblotting-Papier		getränkt in Anodenlösung I
	<i>Anode</i>	

Die Blot-Membran wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 8 °C in 5% (w/v) Magermilch in PBS/Tween20 geblockt und nach intensivem Waschen mit PBS/Tween20 eine Stunde mit dem primären Antikörper in PBS/Tween20 inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS/Tween20 inkubierte der Blot gegebenenfalls mit dem sekundären Antikörper in PBS/Tween20. Nach intensiven Waschen in PBS/Tween20 und Inkubieren für 5 Minuten bei Raumtemperatur in 1X PBS erfolgte die Detektion der Chemilumineszenzsignale mit dem Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences, Boston, USA) entsprechend der Herstellerangaben durch Exposition auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL; Amersham Biosciences, Freiburg).

## 2.4 Zellmethoden

### 2.4.1 Kultur von HEK293-Zellen

- Kulturmedium: DMEM (31885-023; Invitrogen, Karlsruhe); 10% (v/v) fötales Kälberserum (Charge 456X, Biochrom KG, Berlin); 2 mM L-Glutamin (PAA, Pasching); 1X Penicillin/Streptomycin (aus 100X-Lösung; PAA, Pasching)
- Einfriermedium: 70% (v/v) Kulturmedium; 20% (v/v) fötales Kälberserum (Charge 456X, Biochrom KG, Berlin); 10% (v/v) DMSO

Humane embryonale Nierenzellen (HEK293) wurden in Kulturmedium bei 37 °C unter 5% Kohlendioxid, 95% Luft und Wasserdampfsättigung kultiviert. Zur Passage wurden präkonfluente Zellen abgeklopft, 5 Minuten bei 1000 rpm abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:10 ausgesät. Zellzählungen erfolgten mit Hilfe des Neubauer-Hämozytometers. Für die Kryokonservierung wurden Aliquote von 3 Millionen Zellen in Einfriermedium langsam bei -80°C eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

### 2.4.2 Transfektion mit FuGene 6

- Transfektionsmedium: DMEM (31885-023; Invitrogen, Karlsruhe); 10% (v/v) fötales Kälberserum (Charge 456X, Biochrom KG, Berlin); 2 mM L-Glutamin (PAA, Pasching)

Die *Transfektion* von HEK293-Zellen erfolgte mit dem Lipofektionskit FuGene 6 entsprechend der Herstellerangaben. Kurz zusammengefasst wurde folgendem Protokoll gefolgt. In 6-Well Kulturschalen wurden 250.000 Zellen pro Well in Transfektionsmedium ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Transfektion. In einem sterilen Reaktionsgefäß wurden 94 µl OptiMEM I (Invitrogen, Karlsruhe) vorgelegt und 6 µl FuGene 6-Reagens zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und inkubierte bei Raumtemperatur 5 Minuten. Darauf wurden 1 µg Luziferase-Kontrollvektor (pGL3 Control; Promega, Mannheim) für die Messung der Transfektionseffizienz und 1 µg β-Galaktosidase Reporter-gen-Vektor mit den entsprechenden Promotorfragmenten des phGPx-Gens zugegeben. Der Ansatz wurde sanft gemixt und inkubierte 30 Minuten bei Raumtemperatur, bevor er auf die 24 Stunden zuvor eingesäten Zellen pipettiert wurde.

Die *Zellernte* erfolgte 72 Stunden nach der Transfektion. Zellen wurden zweimal mit DPBS (PAA, PASCHING) gewaschen, in 1 ml DPBS abgespült und 5 Minuten bei 1300 rpm bei Raumtemperatur pelletiert. Das Zellpellet wurde erneut in 500 µl DPBS resuspendiert und 5 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur *Zellyse* wurde das Pellet in 50 µl Reporter-Lysis-Puffer (Promega, Mannheim) resuspendiert und entsprechend der Herstellervorgaben lysiert (Luciferase-Assay-Kit; Promega, Mannheim).

Die Erfassung der *β-Galaktosidase- und Luziferase-Aktivitäten* erfolgte mit dem β-Gal Kit (Invitrogen, Karlsruhe) beziehungsweise mit dem Luciferase-Assay-Kit (Promega, Mannheim) gemäß den Herstellerangaben. Die Werte der β-Galaktosidase- und Luziferase-Aktivität wurden jeweils auf Proteinmengen bezogen. Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Roti-Quant Kit (Roth, Karlsruhe) entsprechend der Herstellerangaben und einer Eichkurve von 1 – 10 µg/µ BSA. Gegen die Luziferase-Aktivitäten wurden die

$\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten über die jeweilige Transfektionseffizienz normalisiert. Transfektionen wurden in Doppelversuchen durchgeführt und die Mittelwerte der relativen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten ergeben sich aus mindestens drei unabhängigen Wiederholungen.

### 2.4.3 Präparation nukleärer Extrakte

- Extraktionspuffer A1: 10 mM HEPES, pH 7,9; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM KCl; 1 mM DTT; Complete Mini Protease Inhibitoren (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Extraktionspuffer A2: Extraktionspuffer A1; 0,4% (v/v) Nonidet P 40 (ICN, Eschwege)
- Extraktionspuffer B: 20 mM HEPES, pH 7,9; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 420 mM NaCl; 1 mM DTT; 0,2 mM EDTA; 20% (v/v) Glycerol; Complete Mini Protease Inhibitoren (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Dialysepuffer: 20 mM HEPES, pH 7,9; 100 mM NaCl; 0,2 mM EDTA; 20% (v/v) Glycerol

Der erste Schritt zur Identifizierung von Protein-DNA-Interaktionen ist die Präparation von Proteinextrakten aus Zellkernen (nukleären Extrakten). Diese Extrakte enthalten regulatorische Proteine, die mit DNA interagieren und direkt für funktionelle Studien verwendet werden können. Nukleäre Extrakte wurden aus humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) nach der modifizierten Miniextraktionsmethode (Schreiber *et al.*, 1989) präpariert:

Präkonfluente Zellen wurden mit eiskaltem DPBS (PAA, PASCHING) gewaschen, mit DPBS abgespült und 5 Minuten bei 750 g und 4 °C zentrifugiert. Um Rückstände aus dem Kulturmedium zu entfernen, wurde das Zellpellet zweimal in DPBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Schließlich wurde das Zellpellet in 4-fachem Pelletvolumen eines hypotonen Extraktionspuffer A1 resuspendiert und 5 Minuten bei 750 g und 4 °C zentrifugiert. Dadurch quollen die Zellen auf, platzten und gaben die Zellkerne frei. Das Pellet wurde in 4-fachem Pelletvolumen Extraktionspuffer A2 resuspendiert, inkubierte 10 Minuten auf Eis und zentrifugierte 5 Minuten bei 750 g und 4 °C. Das in Puffer A2 enthaltende Detergens Nonidet P-40 unterstützte das Aufbrechen der Zellen. In einem doppelten Pelletvolumen Extraktionspuffer B inkubierten die Zellkerne unter Rühren für 60 Minuten auf Eis. Zellfragmente wurden dann durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 7.500 g und 4°C von den nukleären Extrakten getrennt. Der Überstand (nukleären Extrakte) wurde über Nacht bei 8 °C gegen ein 400-faches Volumen an Dialysepuffer dialysiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Eine Proteinbestimmung erfolgte mit dem Roti-Quant Kit (Roth, Karlsruhe) entsprechend der Herstellerangaben und einer Eichkurve von 1 – 10 µg/µ BSA.

### 2.5 Hefemethoden

#### 2.5.1 Kultur von Hefezellen

- YPAD (auf 400 ml Endvolumen): 4 g Hefeextrakt; 8 g Pepton; 40 mg Adenin; 2% (w/v) Glukose; (8 g Agar für Agarplatten)
- YC (auf 400 ml Endvolumen: 0,48 g Yeast nitrogen base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat (Invitrogen, Karlsruhe); 2 g Ammoniumsulfat; 4 g Succinsäure; 4 ml 100X „drop out“ Aminosäuremix; 2% (w/v) Glukose; (8 g Agar für Agarplatten); pH 7,0
- 100X „drop out“ Aminosäuremix (500 ml Endvolumen): 5 g <sub>L</sub>-Arginin, 5 g <sub>L</sub>-Cystein; 5 g <sub>L</sub>-Lysin; 2,5 g <sub>L</sub>-Isoleucin; 2,5 g <sub>L</sub>-Methionin; 2,5 g <sub>L</sub>-Phenylalanin; 2,5 g <sub>L</sub>-Prolin; 2,5 g <sub>L</sub>-Serin; 2,5 g <sub>L</sub>-Tyrosin; 2,5 g <sub>L</sub>-Valin in mit HCl angesäuertem MilliQ-Wasser; Autoklavieren
- Selektionsmarker / Hitze-labile Aminosäuren:
  - 25X Adenin (A): 2,5 mg/ml Adenin
  - 20X Uracil (U): 2 mg/ml Uracil
  - 100X Leucin (L): 10 mg/ml <sub>L</sub>-Leucin
  - 200X Histidin (H): 10 mg/ml <sub>L</sub>-Histidin
  - 100X Tryptophan (W): 10 mg/ml <sub>L</sub>-Tryptophan
  - 200X Threonin (T): 20 mg/ml <sub>L</sub>-Threonin
  - 50X Aspartat (D): 2,5 mg/ml <sub>L</sub>-Aspartat

Die Kultur von Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) erfolgte in Vollmedium (YPAD) oder Minimalmedium (YC) bei 30 °C. Die Medien wurden mit MilliQ-Wasser angesetzt und nach dem Autoklavieren Glukose (sterile 20% (w/v) Glukose-Lösung) auf eine Endkonzentration von 2% (w/v) zugesetzt. YC-Medium wurde mit 100X „drop out“ Aminosäuremix angesetzt. Selektionsmarker sowie Hitze-labile Aminosäuren wurden auf die jeweilige 1X Endkonzentration zusammen mit der Glukose nach dem Autoklavieren nach Bedarf hinzugefügt. Für die Kultur auf Agarplatten wurde vor dem Autoklavieren Agar auf 2% (w/v) zugesetzt.

#### 2.5.2 Hefe-Transformation

10X TE-Puffer: 100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA

1 X Lithiumazetat: 1 M Lithiumazetat, pH 7,5

50% (w/v) Polyethylenglykol

Lachs-Testis DNA: 10 ng/μl (Sigma, Deisenhofen)

50 ml für eine kleine Transformation beziehungsweise 600 ml für eine große Transformation einer logarithmisch wachsenden Hefekultur wurden 5 Minuten bei 3000 g pelletiert und in 1X TE-Puffer resuspendiert. Nach erneutem Abzentrifugieren für 5 Minuten bei 1000 g wurde das Pellet in 1X TE-Puffer / 1X Lithiumazetat resuspendiert und inkubierte 15 min bei Raumtemperatur unter sanftem Schütteln. Auf eine Endkonzentration von 33% (w/v) wurde Polyethylenglykol (Sigma, Deisenhofen) zugesetzt. Zusammen mit Lachs-Testes DNA (100 – 170 ng/μl Endkonzentration) wurden 100 ng (kleine Transformation) beziehungsweise 6 mg (große Transformation) Plasmid-DNA in 1X TE-Puffer auf die Hefezellen gegeben, sanft

gemischt, 30 Minuten bei 30°C, dann 15 Minuten beziehungsweise 45 Minuten (für kleine beziehungsweise große Transformation) bei 42°C im Wasserbad und schließlich 5 Minuten im Eisbad inkubiert. Die Hefezellen wurden dann durch kurze Zentrifugation (5 Sekunden) pelletiert, in MilliQ-Wasser resuspendiert und auf geeignetem Selektionsmedium ausplattiert.

### 2.5.3 Plasmid-Präparation aus *S. cerevisiae*

- Lysepuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl; 50 mM EDTA; 5% (v/v) Triton X-100; 8% (w/v) Saccharose

Zur Analyse von Plasmid-DNA aus Hefezellen wurde die DNA zunächst aus Hefen präpariert, diese nach Standardprotokollen in chemisch kompetente *E. coli* XL1Blue Zellen (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) transformiert, aus diesen mit dem QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Hilden) schließlich für weitere Analysen nochmals die Plasmid-DNA präpariert.

Die Präparation der DNA aus Hefezellen erfolgte nach folgendem Protokoll: 1,5 ml Hefekultur in Selektionsmedium wurden 3 Minuten bei 1000 g pelletiert, in 100 µl Lysepuffer resuspendiert und mit 200 mg Säure-gewaschenen Glasperlen (Sigma, Deisenhofen) 5 Minuten kräftig gemischt. Nach Zugabe von weiteren 100 µl Lysepuffer wurden die Zellen 3 Minuten bei 100 °C gekocht, kurz abgekühlt, 10 Minuten bei 20.800 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 50 µl 7,5 M Ammoniumazetat, Inkubation bei -20 °C für 1 Stunde, Zentrifugation für 10 Minuten bei 20.800 g und 4 °C und Überführen des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß erfolgte die Fällung der Plasmid-DNA durch Zugabe von 200 µl eiskaltem Ethanol (96%ig) und erneuter Zentrifugation für 10 Minuten bei 20.800 g und 4 °C. Das Pellet wurde darauf mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen, nach Abzug des Überstandes an der Luft getrocknet und in 20 µl Wasser resuspendiert. Die gesamte DNA-Lösung wurde für die Transformation in *E. coli* XL1Blue eingesetzt.

### 2.5.4 RNA-Präparation aus *S. cerevisiae*

- Y1-Puffer: 1M Sorbitol; 0,1 mM EDTA; pH 7,4; 0,1 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 100 u Lyticase (Sigma, Deisenhofen)

Zur Analyse von RNA-Expression in Hefezellen wurde RNA mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach einem modifizierten Protokoll gereinigt. Etwa 50 Millionen Hefezellen wurden 5 Minuten bei 1000 g und 4 °C pelletiert in 50 mL Y1-Puffer resuspendiert und etwa 60 Minuten bei 37°C inkubiert um Sphäroblasten zu generieren. Diese wurden durch fünfminütigen Zentrifugation bei 300 g und Raumtemperatur pelletiert und entsprechend der

Herstellerangaben mit dem RNeasy Mini Kit und DNase-Verdau (Qiagen, Hilden) die RNA präpariert.

### 2.5.5 Hefe-Paarungsassay

Haploide Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* können in zwei unterschiedlichen Paarungstypen (a und alpha) auftreten und durch einfaches Mischen leicht zu a/alpha-Diploiden paaren. Für den Paarungsassay wurden Hefezellen der gegensätzlichen Paarungstypen zunächst mit den gewünschten, unterschiedlichen Plasmiden transformiert und auf geeignetem Selektionsmedium ausplattiert. Die Paarung erfolgte durch mit einander Verreiben der Paarungstypen und Inkubation auf Vollmedium-Agarplatten (YPAD) über Nacht bei 30 °C. Zur Selektion der Diploiden, welche beide Plasmide enthielten, wurden die gepaarten Hefen auf entsprechendes Selektionsmedium überführt und mit der Kolonie-Lift Filter-Methode auf  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität getestet

### 2.5.6 $\beta$ -Galaktosidase-Assay

- X-gal Stammlösung: 20 mg X-gal pro Milliliter Dimethylformamid
- Z-Puffer: 10,679 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 5,520 g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0,746 g/l KCl; 0,246 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; pH 7,0; 0,27% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol; 334  $\mu\text{g/ml}$  X-gal

Die Analyse der Aktivität des Reportergens der  $\beta$ -Galaktosidase erfolgte entweder als Test auf der Platte oder mit Hilfe des „Colony Lift Filter Assays“. Für den Test auf der Platte wurden Hefe-Transformanten auf entsprechendem Selektionsmedium mit 80  $\mu\text{g/ml}$  X-gal ausplattiert und 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert.

Für den „Colony Lift Filter Assay“ wurden Hefekolonien mit Hilfe der Stempelmethode auf Agarplatten mit Selektionsmedium plattiert, 2-4 Tage bei 30 °C inkubiert und auf Filterpapier überführt. Das Filterpapier mit den Hefeklonen wurde 10 Sekunden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend mit Z-Puffer angefeuchtet und bis zur Blaufärbung bis zu 8 Stunden bei 30 °C inkubiert.

### 2.5.7 Semi-solide Bibliotheksamplifikation

- 2X LB (auf 1 Liter Endvolumen): 20 g Trypton; 10 g Hefeextrakt; 10 g NaCl
- 2X LB-Amp/Agarose: 1,35 g SeaPrep-Agarose (BioWhittaker, Rockland, USA); 450 ml 2X LB; 450  $\mu\text{l}$  Ampicillin (100  $\mu\text{g/ml}$ )
- 2X LB-Glyzerol: 175 ml 2X LB; 25 ml Glyzerol (100%)

Um genügend DNA für den Hefe Drei-Hybrid Screen zu erhalten wurden  $10^7$  cfu der zu untersuchenden Plasmid cDNA-Expressionsbibliothek einmal mit Hilfe der Methode der semi-soliden Amplifikation reamplifiziert. Ungefähr 500.000 cfu Plasmid-Bibliothek in *E.*

*coli* BNN132 wurden unter Rühren in 2X LB-Amp/Agarose angeimpft, auf Eis abgekühlt und 40 – 45 Stunden bei 30 °C inkubiert. Abschließend wurden die Bakterien in einem GSA-Rotor 20 Minuten bei 8000 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 ml 2X LB-Glyzerol resuspendiert und bei -80 °C gelagert. Aus den Pellets wurde mit dem Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend der Herstellerangaben die DNA präpariert.

### 2.5.8 Hefe Drei-Hybrid Screen

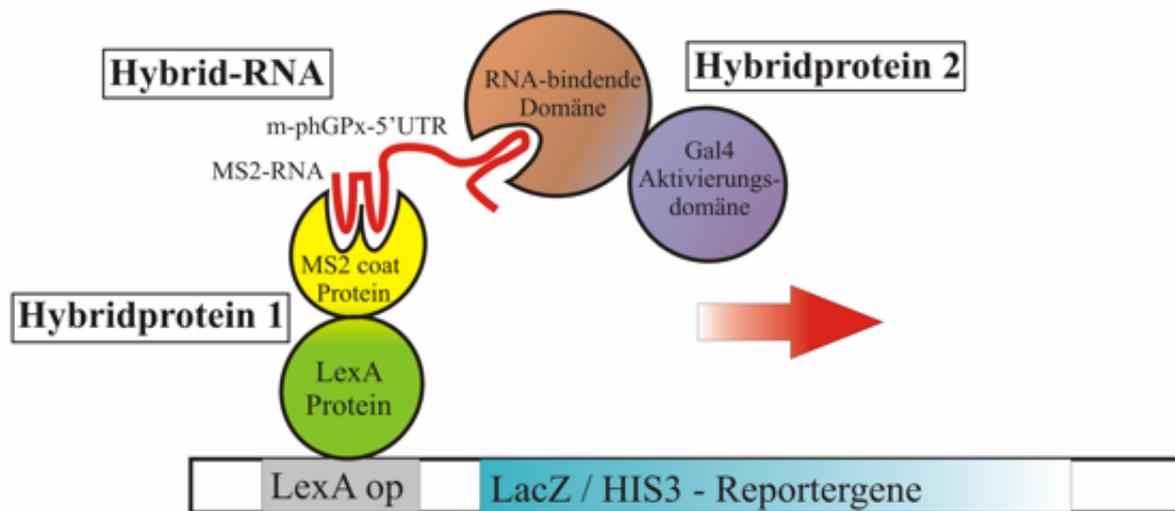
Oligonukleotide (synthetisiert von Biotex, Berlin):

Oligonukleotid	Sequenz 5'... 3'
Kon3-up	CAG GGG CCT CGC GTC TTA GCG
Kon3-do	CAT CTC GGC GGC CGG AGC CA
MS2-up	CAT GCC TGC AGG TCG ACT CTA
RTI-up	GGC CTC GTG GCG CAC ATG GTA C
RTII-up	AAG CTG GAG CTC CAC CGC GGT G

Das Hefe Drei-Hybrid System ist eine Methode zur Analyse von Protein-RNA-Interaktionen. **Das Prinzip des Hefe Drei-Hybrid Systems** ist in Abbildung 5 dargestellt und von Bernstein *et al.*, zusammengefasst (Bernstein *et al.*, 2002). Vor Reportergenen (HIS3 und LacZ) auf dem Hefechromosom befinden sich mehrere Kopien der cis-regulatorischen DNA-Bindestellen für das *E. coli* DNA-bindende Protein LexA. Das Hybridprotein 1 des Hefe Drei-Hybrid Systems setzt sich aus der DNA-bindenden Domäne des LexA-Proteins und einer RNA-bindenden Domäne zusammen. Bei der RNA-bindenden Domäne handelt es sich um die des Bakteriophagen MS2-coat Proteins. Das MS2-coat Protein bindet als Dimer die MS2-Sequenz einer bifunktionellen RNA - der „Hybrid“-RNA. Die Hybrid-RNA besitzt zwei Bindemotive für das MS2-coat Protein (Tandem-MS2) und die RNA-Sequenz, die untersucht werden soll. Dieser zweite Teil der Hybrid-RNA wird wiederum von einem zweiten Hybridprotein, einem RNA-bindenden Protein gebunden, welches mit der GAL4-Aktivator-domäne des Hefe-Transkriptionsfaktors Gal4 fusioniert ist. Baut sich dieser ternäre Komplex bestehend aus Hybridprotein 1, Hybrid-RNA und Hybridprotein 2 am Promotor der Reportergene auf, kommt es zur Aktivierung derselben. Die Reportergenaktivierung lässt sich durch den Phänotyp und einfache biochemische Analysen nachweisen.

Die Reportergene HIS3 und LacZ mit den LexA-Bindestellen im Promotor und das Hybridprotein 1 sind im Genom des Hefestammes YBZ-1 kodiert. Die Hybrid-RNA wird von einem Plasmid synthetisiert, welches in die Hefezellen transformiert wird. Dort wird die entsprechende RNA von einem Promotor der RNA-Polymerase III transkribiert. Das Hybridprotein 2 entstammt einer cDNA-Expressionsbibliothek. Diese zeichnet sich dadurch aus, dass in Hefezellen Hybridproteine gebildet werden können, die im N-terminalen Bereich

die Gal4-Domäne und im C-terminalen Bereich die Peptidsequenz enthalten, für welche die entsprechende cDNA kodiert.



**Abb. 5: Das Hefe Drei-Hybrid System.**

Die Reportergene **LacZ** und **HIS3** sind im Hefestamm **YBZ-1** und **R40coat** unter dem Einfluss von **LexA-Operatoren** (**LexA op**) vorhanden. **LexA-Operatoren** liegen in mehreren Kopien vor (vier im **HIS3-Promotor** und acht am **LacZ Promotor**). Weiter Beschreibungen finden sich im Text.

Das PCR-amplifizierte Fragment der gesamten 5'-untranslatierten Region der mRNA der mitochondrialen **phGPx-Isoform** (+1 bp - +145 bp; Nm\_008126) wurde mittels Standardmethoden in den Vektor **pIIIA/MS2-1** kloniert (Primer **Kon3-up/Kon3-do**). Als PCR-Matrize diente das subklonierte murine **phGPx-Gen**. Das Plasmid **pIIIA-MS2-1** vermittelt dem für Adenin und Uracil auxotrophen Hefestamm **YBZ-1** Autotrophie für diese Selektionsmarker.

Da die meisten Hybrid RNAs in der Lage sind, die Reportergene in geringem Maße zu aktivieren, wurde vor dem eigentlichen Hefe Drei-Hybrid Screen eine so genannte **3-Aminotriazol-Titration** durchgeführt. Durch diese Titration wurde die Stringenz des Systems erhöht. **3-Aminotriazol (3-AT)** ist ein kompetitiver Inhibitor des **HIS3-Genproduktes His3p**. Je höher die Konzentration an **His3p** ist, desto höher ist die benötigte Konzentration an **3-AT**. Aus diesem Grund wurden Hefezellen, in welche das Plasmid für die Hybrid-RNA transformiert worden ist (siehe 2.5.2), auf Minimalmedium ohne Adenin, Uracil und Histidin sowie unterschiedlichen Konzentrationen **3-AT (1 – 10 mM)** ausplattiert. Für den Hefe Drei-Hybrid Screen wurde jene **3-AT-Konzentration** gewählt, auf welcher nach 7 Tagen Inkubation bei 30 °C keine signifikante Anzahl an Klonen wachsen konnte.

Um zu kontrollieren, ob die gewünschte Hybrid-RNA in den Hefezellen auch exprimiert wird, wurde aus entsprechenden Hefe-Transformanten RNA isoliert, diese mittels Reverser

Transkription in cDNA umgeschrieben und das Transkript der Hybrid-RNA durch PCR mit Gen-spezifischen Primern (Kon3-do, Kon3-up, MS2-up, RTI-up, RTII-up) nachgewiesen. Nachdem die 3-AT-Konzentration gewählt und die Expression der Hybrid-RNA verifiziert worden ist, wurde das Hybridprotein 2 mittels großer Transformation (siehe 2.5.2) in die Hefezellen, welche die Hybrid-RNA exprimierten, eingeführt. Das Hybridprotein 2 entstammt einer kommerziell erhältlichen testikulären cDNA-Expressionsbibliothek. Die initiale große **Transformation der Plasmid-cDNA-Bibliothek** erfolgte in Gegenwart der ermittelten 3-AT-Konzentration auf Minimalmedium, welches nur für den Selektionsmarker Leucin des Bibliotheksplasmids pACT2 und das Reportergen HIS3 selektierte. Dadurch kann ein Teil jener resultierenden Hefeklone ausselektiert werden, welche für die Reportergenaktivierung die Expression der Hybrid-RNA nicht benötigten. Solche Klone werden, da kein Selektionsdruck besteht, das Plasmid pIIIA-MS2-1 mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit verlieren. Durch Verlust dieses Plasmides werden diese Hybrid-RNA-unabhängigen Hefe-Klone jedoch wieder auxotroph für Adenin. Sie versuchen, wenn die Adenin-Konzentration im Medium absinkt, Adenin *de novo* zu synthetisieren, häufen dabei ein rosa-farbenes Zwischenprodukt der Adenin-Biosynthese an und lassen sich durch Rosa-Färbung der Hefe-Kolonie identifizieren. RNA-abhängige Klone behalten dahingegen das Plasmid pIIIA-MS2-1 und bleiben weiß. Jene Klone, die weiß sind und auf Histidin- und Leucin-Mangelmedium wachsen, werden mit Hilfe der Methode des Kolonie-Lift Filter-Assays auf die Aktivierung des zweiten Reportergens der  $\beta$ -Galaktosidase hin untersucht.

Da die primäre Auslese nach RNA-unabhängigen Klonen nicht perfekt ist, wurde die **URA3-Gegenselektion** durchgeführt. Hierfür wurden Klone, welche die ersten Tests bestanden hatten, mit Hilfe der Stempelmethode auf Minimalmedium ohne Leucin, welches nur auf das Vorhandensein des Bibliotheksplasmids pACT2 selektiert, ausplatiert. Auf diesem Medium verlieren mit bestimmter Wahrscheinlichkeit einige Hefezellen das Plasmid pIIIA-MS2-1. Anschließend werden die Hefeklone auf Minimalmedium ohne Leucin in Gegenwart von 0,1% 5-Fluoroorotsäure (Clariant/Lancaster, Frankfurt/Main) ausplatiert. In Gegenwart des URA3-Genproduktes, welches im Hefestamm YBZ-1 nur vom Plasmid pIIIA-MS2-1 gebildet werden kann, wird 5-Fluoroorotsäure (5-FOA) in das toxische 5-Fluorouracil umgewandelt. Zellen, denen das URA3-Genprodukt fehlt, da sie das Plasmid pIIIA-MS2-1 verloren haben, können jedoch auf Medium mit 5-FOA wachsen. Diese Prozedur wurde einmal wiederholt und schließlich das Hefe-Wachstum auf Minimalmedium ohne Uracil überprüft und mit der Kolonie-Lift Filter-Methode auf  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität getestet.

Schließlich war es notwendig die **Sequenz-Spezifität** der Protein-RNA-Interaktionen zu überprüfen. Dafür wurden die vom Plasmid pIII<sub>A</sub>-MS2-1 befreiten Hefeklone des Hefestamms YBZ-1 (Paarungstyp  $\alpha$ ), die jedoch noch die jeweiligen Hybridproteine 2 besaßen, mit Hefezellen des Stammes R40coat (YBZ-1-Derivat vom Paarungstyp  $\alpha$ ) im Paarungsassay analysiert, da der Paarungsassay einen hohen Probendurchsatz erlaubt. R40coat wurde zuvor mit unterschiedlichen Kontroll-RNA-Sonden im Plasmid pIII<sub>A</sub>-MS2-1 transformiert. Da die Kontrolle durch den Paarungsassay nicht perfekt ist, wurden zuletzt die vom Plasmid pIII<sub>A</sub>-MS2-1 befreiten Hefeklone mit den Kontroll-RNA-Sonden transformiert, auf YC-AUL selektiert und durch Test der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität auf der Agarplatte auf Reportergenaktivierung geprüft (siehe 2.5.6.)

Aus dem Klon, welcher alle Tests des Hefe Drei-Hybrid Systems bestanden hatte, wurde die Plasmid-DNA isoliert, diese in *E. coli* XL1Blue (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) transformiert, aus diesen wieder die DNA isoliert und schließlich durch Sequenzieren analysiert.

### 3 Zielstellung und experimentelle Strategie

Hauptaufgabe meiner Untersuchungen war es, die Regulationsmechanismen zu untersuchen, welchen die Expression der Phospholipid-Hydroperoxid Glutathion-Peroxidase unterliegt. Die Kontrolle der Genexpression lässt sich in zwei Bereiche gliedern: i) die transkriptionelle Regulation und ii) post-transkriptionelle Ereignisse. Diese Gliederung spiegelt sich in der experimentellen Strategie der Arbeit wieder. In diesem Zusammenhang sollten folgende konkrete Fragestellungen untersucht werden:

1. Welche Faktoren sind in welchem Umfang an der basalen Transkriptionsregulation der phGPx beteiligt?
2. Lassen sich auf der Ebene der Transkriptionsregulation Elemente identifizieren, die Rückschlüsse auf die Testis-spezifische Hochexpression der mitochondrialen phGPx zulassen?
3. Ist es möglich, Faktoren zu identifizieren, welche die Expression der phGPx auf post-transkriptioneller Ebene regulieren, indem sie die 5'-untranslatierte Region der mitochondrialen phGPx-mRNA binden?
4. Zeigen die phGPx und die Elemente, welche ihre Expression regulieren ähnliche räumliche und zeitliche Expressionsmuster?

Im ersten Teil der Arbeit werden Protein-DNA-Interaktionen charakterisiert, welche maßgeblich für die Regulation der Transkription verantwortlich zeichnen. Dabei kommen sowohl *in vitro* Methoden, wie Gelshift- und Supershift-Experimente als auch *in vivo* Methoden wie die Chromatin-Immunopräzipitation zum Einsatz. In meiner Diplomarbeit konnte ich bereits im basalen Promotorbereich (von -100 Basenpaaren bis +228 Basenpaaren relativ zum Transkriptionsstart der mitochondrialen Isoform der phGPx) fünf DNA-Motive identifizieren, die spezifisch mit Proteinen nukleärer Extrakte aus humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) interagierten. Hierbei handelte es sich um die DNA-Motive der CCAAT- und der GC-Box, die jeweils mit einer Vielzahl von Proteinen interagieren können. Da die Identität der bindenden Proteine jedoch noch im Dunkeln lag, sollten diese hier mit spezifischen Antikörpern gegen bekannte Transkriptionsfaktoren in Supershift-Experimenten identifiziert werden. Daran schließen sich funktionelle Untersuchungen zur relativen Bedeutung der identifizierten Transkriptionsfaktoren in Form von *in vitro* Promotorstudien an. Die Promotoraktivität ist ein Maß für die transkriptionelle Aktivierung eines Gens. Zu diesem Zweck der Quantifizierung werden die DNA-Motive, die für eine Protein-DNA-Interaktion notwendig sind, in Reportergen-Konstrukten so verändert, dass die trans-

regulatorischen Faktoren nicht mehr in der Lage sind an die DNA zu binden. Der relative Einfluss der einzelnen Transkriptionsfaktoren lässt sich so aus der Aktivität des dem Promotor nachgeschalteten Reportergens herleiten. Neben den CCAAT- und GC-Boxen waren in den vorangegangenen Untersuchungen weitere spezifische Protein-DNA-Interaktionen gefunden worden. Darüber hinaus trägt der translatierte Bereich des Exons 1 entscheidend zur Promotoraktivität bei. Diese beiden Aspekte sollen zunächst in grundlegenden Gelshift-Untersuchungen hinsichtlich entsprechender cis-regulatorischer Sequenzen aufgeklärt werden.

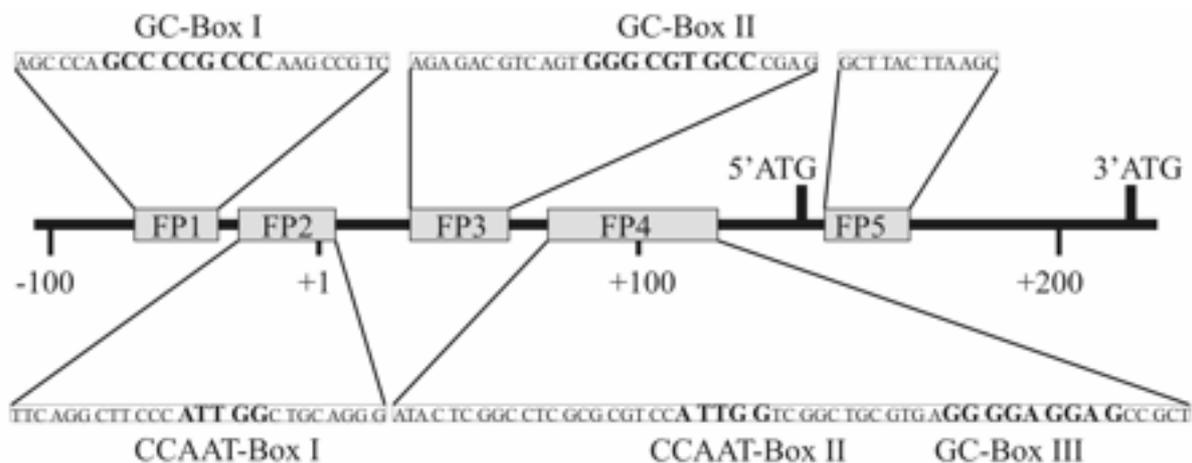
An die Analyse der transkriptionellen Kontrolle der basalen phGPx-Expression schließen sich im Weiteren Untersuchungen zur Regulation der post-transkriptionellen Regulationsmechanismen an. Sowohl der post-transkriptionellen als auch der transkriptionellen Regulation der Genexpression liegen zumeist Protein-Nukleinsäure-Interaktionen zu Grunde. In dieser Arbeit sollen Protein-RNA-Interaktionen in der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) der mitochondrialen phGPx zunächst mit Hilfe des *in vivo* Ansatzes des Hefe-Drei-Hybrid-Systems identifiziert werden. Die auf diese Weise identifizierten RNA-bindenden Proteine sollen daraufhin mittels *in vitro* Methoden wie dem RNA-Gelshiftassay näher hinsichtlich ihrer Bindungsspezifität charakterisiert werden. Abschließend sollen anhand der Expressionsmuster der RNA-bindenden Proteine und der phGPx erste Untersuchungen zur Funktionalität der Protein-RNA-Interaktion durchgeführt werden. Dazu werden mittels Real-Time-PCR die relativen Transkriptmengen dieser Proteine in ihrer zeitlichen und gewebespezifischen Verteilung bestimmt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Protein-DNA-Interaktionen am basalen Promotor der phGPx

#### 4.1.1 Vorarbeiten

Der basale Promotor der phGPx war in meiner Diplomarbeit als der Bereich definiert worden, der sich zwischen -100 bp und +228 bp vom Transkriptionsstart der mitochondrialen phGPx-Isoform befindet. Dieser Sequenzbereich im phGPx-Gen wurde mithilfe von Reporterergen-Assays in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293-Zellen) ermittelt. Als basaler Promotor wurde der minimale Sequenzbereich definiert, der für sich allein eine maximale Reporterergenaktivität vermittelte. Durch weitere Verlängerungen stromaufwärts gab es keine wesentliche Zunahme an Reporterergenaktivität. Aufgrund der gemessenen Reporterergenaktivierung hatte sich das Modell der humanen, embryonalen Nierenzelllinie HEK293 als geeignet erwiesen. Die Charakterisierung hinsichtlich von Protein-DNA-Interaktionen am Promotor der phGPx erfolgte zunächst mittels DNase-I-Footprint-Assays. Diese Methode offenbarte jene Sequenzen die *in vitro* mit Proteinen aus nukleären Extrakten interagieren. Dabei wurden fünf Protein-DNA-Kontaktpunkte, so genannte Footprints identifiziert: FP1 (-49bp / -7bp), FP2 (-21bp / +6bp), FP3 (+41bp / +65bp), FP4 (+78bp / +128bp) und FP5 (+167bp / +178bp) (Abb. 6).



**Abb. 6: Cis-regulatorische Sequenzen in der 5'-flankierenden Region des phGPx-Gens.** Im DNase-I-Footprint Assay und darauf folgenden Gelshift-Analysen wurden fünf Protein-DNA-Kontaktpunkte (FP1 bis FP5) identifiziert. Die Kernbindesequenzen der GC- und CCAAT-Boxen sind fett gedruckt. Im Footprint-Signal FP5 zwischen den beiden alternativen Translationsstarts (5'ATG, 3'ATG) der phGPx wurde keine Kernbindesequenz für einen bekannten Transkriptionsfaktor gefunden.

In Gelshift-Experimenten wurde die Spezifität und Identität der entsprechenden Protein-DNA-Interaktionen an der 5'-flankierenden Region der phGPx untersucht. Für die Gelshift-Assays wurden komplementäre Oligonukleotide, welche die Protein-Kontaktpunkte FP1 bis FP5 repräsentierten, dimerisiert und anschließend mit Digoxigenin markiert. Nach Inkubation mit nukleären Extrakten aus HEK293-Zellen und elektrophoretischer Auftrennung in einem

nativen Gel erfolgte die Detektion. Da die Footprintregion FP4 mit 49 bp für die Gelshift-Assays wenig praktikabel war, wurde sie für nachfolgende Experimente in zwei überlappende Regionen untergliedert: FP4A und FP4B (siehe auch Abb. 15 A). Protein-DNA-Interaktionen sind aufgrund des vergrößerten Molekulargewichts durch ein zur freien DNA-Sonde in der Laufstrecke verzögertes Signal (Shift-Signal) ersichtlich. In kompetitiven Gelshift-Experimenten, in denen versucht wird, mit einem molaren Überschuss an unmarkierten DNA-Sonden die Protein-DNA-Komplexe zu kompetieren, war es möglich die Spezifität der im DNase-I-Footprint identifizierten Protein-DNA-Interaktionen zu bestätigen. Darüber hinaus konnten diese mit Consensus-Oligonukleotiden, die Bindesequenzen für bekannte Transkriptionsfaktoren enthielten, näher charakterisiert werden. Während sich die dominanten Protein-DNA-Komplexe der Footprintregionen FP2 und FP4A mit Consensus-Oligonukleotiden der CCAAT-Box kompetieren ließen, war dies für die Footprintregionen FP1, FP3 und FP4B ausschließlich mit Consensus-Oligonukleotiden der GC-Box möglich. Die Ergebnisse stehen in Einklang mit der Identifikation einer CCAAT-Box im humanen phGPx-Promotor. Für FP5 hatte sich im Gelshift-Assay unter den gewählten Reaktionsbedingungen keine spezifische Protein-DNA-Interaktion nachweisen lassen. Weitergehende Untersuchungen zur näheren Charakterisierung dieser Protein-DNA-Komplexe am basalen Promotor der phGPx waren bisher nicht erfolgt.

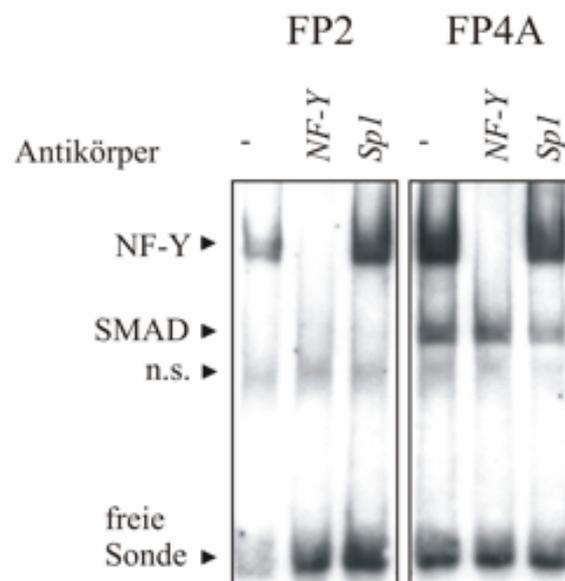
### **4.1.2 Identifizierung trans-regulatorischer Faktoren am basalen Promotor der phGPx**

Sowohl bei der CCAAT-Box als auch bei der GC-Box handelt es sich um DNA-Motive, die einer Reihe von Transkriptionsfaktoren als Erkennungs- und Bindesequenz dienen. Eine Möglichkeit, die Identität der Proteine zu klären, die an den Protein-DNA-Komplexen im Gelshift beteiligt sind, ist der Supershift-Assay. Hierfür kommen spezifische Antikörper gegen bekannte DNA-bindende Proteine zur Anwendung. Diese werden vor der eigentlichen Gelshift-Reaktion mit nukleären Extrakten vorinkubiert. Im Falle einer Antikörper-Reaktion mit dem DNA-bindenden Protein, welches an die entsprechende DNA-Sonde bindet, kommt es nach Zugabe der markierten DNA-Sonde und anschließender elektrophoretischer Auftrennung entweder in den meisten Fällen zu einer Aufhebung des Shift-Signals oder zu einem durch das nun weiter erhöhte Molekulargewicht vermittelten so genannten Supershift. Als zelluläres System dienten humanen, embryonale Nierenzellen. Reporteragen-Assays hatten gezeigt, dass in dieser Zelllinie jene Faktoren vorliegen müssen, welche für die Promotoraktivierung des phGPx-Gens notwendig sind. Darüber hinaus spricht der Nachweis

der phGPx-mRNA (nicht abgebildet) für ein transkriptionell aktives phGPx-Gen in diesen Zellen.

### Die Footprintregionen FP2 und FP4A binden *in vitro* den Transkriptionsfaktor NF-Y

Die im DNase-I-Footprint Assay ermittelte Region FP2 erstreckt sich von -21 bp bis +6 bp vom Transkriptionsstart der mitochondrialen phGPx. Sie beinhaltet damit auch den Transkriptionsstart bei +1 bp, wie er für die mRNA-Expression im Testis beschrieben wurde (Nam et al., 1997). Das Consensus-Motiv der CCAAT-Box liegt in inverser Orientierung bei -8 bp und entspricht in Lage und Orientierung des im Promotor des humanen phGPx-Gens gefundenen Bindemotivs (Huang et al., 1999). Die Footprintregion FP4 erstreckt sich von +78 bp bis +128 bp. Das hier ebenfalls in inverser Orientierung vorliegende CCAAT-Motiv befindet sich bei +98 bp. Die *in silico* Analyse der Sequenzen mithilfe des Programms MatInspector (Quandt et al., 1995) ergab für beide CCAAT-Motive eine Kernsequenzähnlichkeit für den Nukleärer Faktor Y (NF-Y) von 100%.



**Abb. 7: Supershift-Assays an den Gelshift-Sonden FP2 und FP4A.**

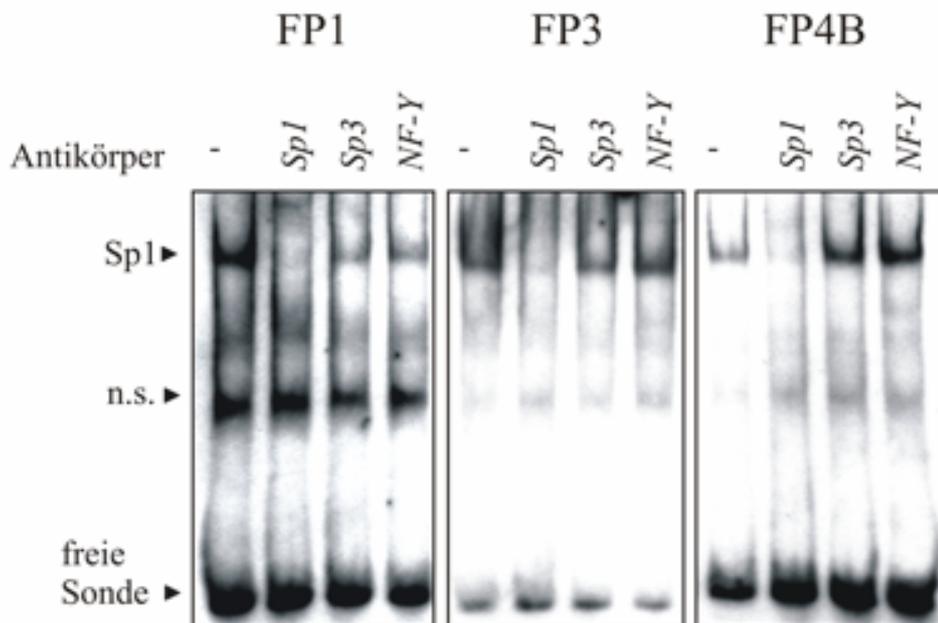
Bei Inkubation nukleärer Extrakte aus HEK293-Zellen mit der markierten Sonde FP2 zeigt sich nach elektrophoretischer Auftrennung ein zur freien Sonde verschobener Gelshift-Komplex mit dem Faktor NF-Y. Dieser Komplex lässt sich nur durch einen spezifischen Antikörper gegen NF-Y nicht aber gegen Sp1 aufheben. Dieselbe Situation findet sich an der Sonde FP4A. Wobei sich der Gelshift-Komplex „Smad“ an dieser Sonde nicht durch spezifische Antikörper gegen NF-Y oder Sp1 beeinflussen lässt. n.s., nicht spezifisch.

Um die Identität der trans-regulatorischen Faktoren an FP2 und FP4A aufzuklären, die mit dem CCAAT-Motiv interagieren (Mantovani, 1999), wurde der Supershift-Assay eingesetzt. Wie in Abbildung 7 ersichtlich, verhindert die Zugabe eines spezifischen Antikörpers gegen den Nukleären Faktor Y (NF-Y) die Herausbildung des CCAAT-spezifischen Gelshift-Komplexes sowohl an Sonde FP2 als auch an Sonde FP4A. Daraus lässt sich schließen, dass der Antikörper gegen NF-Y mit eben diesem Transkriptionsfaktor im Reaktionsmix interagiert hat und damit die Protein-DNA-Interaktion gestört ist. Kontrollexperimente mit einem spezifischen Antikörper gegen das Protein Sp1 zeigten keinen Einfluss dieses Antikörpers auf das Herausbilden des Protein-DNA-Komplexes (Abb. 7). Darüber hinaus konnte deutlich gezeigt werden, dass die schneller wandernde Bande an FP4A (Smad) sich durch keinen der Antikörper beeinflussen ließ und somit unabhängig von NF-Y und Sp1 war. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Protein-DNA-Komplexe, die sich an den beiden inversen CCAAT-Boxen im Promotor der pHGPx bilden, durch eine spezifische Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor NF-Y zu Stande kommen.

### **Die Footprintregionen FP1, FP3 und FP4B binden *in vitro* den Transkriptionsfaktor Sp1**

Neben den beiden inversen CCAAT-Boxen in den Footprints FP2 und FP4A waren in den Footprints FP1, FP3 und FP4B Sequenzen identifiziert worden, welche Proteine der Transkriptionsfaktorfamilie Sp1/Sp3 (Stimulierendes Protein 1 bzw. 3) binden (Courey und Tjian, 1988). Eine *in silico* Analyse mit dem Programm MatInspector (Quandt et al., 1995) hatte nur für den Footprint FP1 und FP3 eine Kernsequenzhomologie von 100% für eine Interaktion mit Sp1/Sp3 ergeben. Für die Regionen FP4B wurde *in silico* lediglich das Kernbindemotiv für den Transkriptionsfaktor MZF1 (myeloides Zinkfingerprotein 1) mit hoher Kernsequenzhomologie vorausgesagt. Das ebenfalls identifizierte Kernbindemotiv von Sp1/Sp3 wies in FP4B lediglich die verhältnismäßig geringe Ähnlichkeit mit dem Kernbindemotiv von 87,6% auf. Kompetitive Gelshift-Studien in vorausgegangenen Arbeiten hatten jedoch gezeigt, dass entgegen den Ergebnissen der *in silico* Analyse an allen drei Regionen derselbe Faktor bindet. Dabei handelt es sich, wie spezifisch gezeigt werden konnte, um die Familie von Transkriptionsfaktoren Sp1/Sp3. Die Kernbindesequenzen für die Faktoren Sp1/Sp3 liegen bei -47 bp, +54 bp beziehungsweise +117 bp. Zur Klärung der Identität der mit FP1, FP3 und FP4B interagierenden Proteine wurden für die vorliegende Arbeit ebenfalls Supershift-Experimente mit spezifischen Antikörpern durchgeführt. Bei der Inkubation nukleärer Extrakte mit einem spezifischen Antikörper gegen Sp1 wurden nach

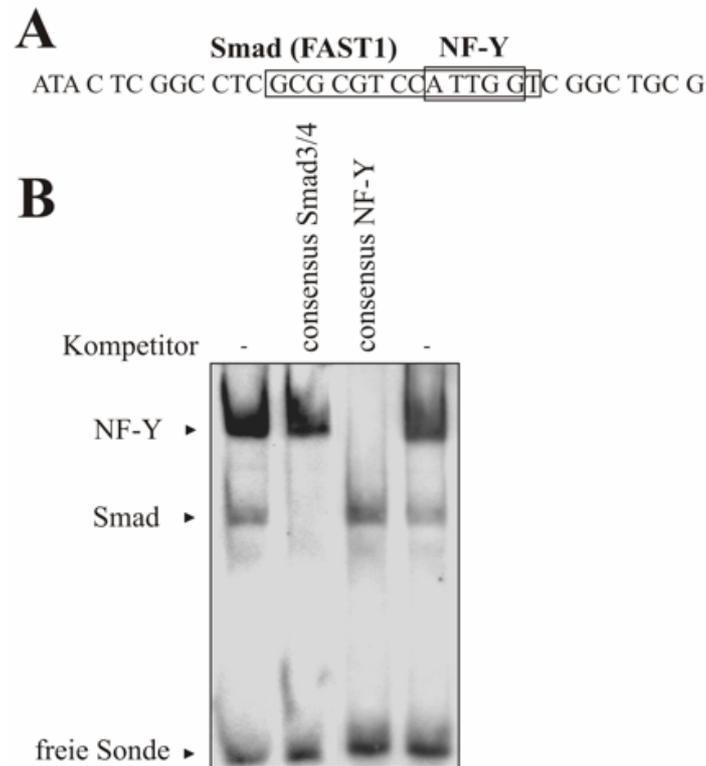
anschließender Zugabe der markierten Sonden für FP1, FP3 beziehungsweise FP4B und nativer Elektrophorese die Protein-DNA-Komplexe vollkommen unterdrückt (Abb. 8). Daraus lässt sich schließen, dass an alle drei Sonden der Faktor Sp1 bindet. Supershift-Experimente mit spezifischen Antikörpern gegen Sp3 oder NF-Y waren nicht in der Lage die Protein-DNA-Interaktionen zu beeinflussen (Abb. 8). Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass drei GC-Boxen im proximalen Promotorbereich der phGPx spezifisch mit dem Transkriptionsfaktor Sp1 interagieren.



**Abb. 8: Supershift-Assays an den Gelshift-Sonden FP1, FP3 und FP4B.** Nach Inkubation nukleärer Extrakte aus HEK293-Zellen und anschließender elektrophoretischer Auftrennung bilden sich mit den Sonden FP1, FP3 und FP4B zu den freien Sonden verschobene Gelshift-Komplexe mit dem Faktor Sp1 heraus. Dieser Sp1-spezifische Komplex lässt sich nur durch Vorinkubation der Gelshift-Reaktion mit einem spezifischen Antikörper gegen Sp1 nicht aber gegen Sp3 oder NF-Y aufheben. n.s., nicht spezifisch.

#### 4.1.3 Mitglieder der Smad3/4-Familie von Transkriptionsfaktoren interagieren in vitro mit Sequenzen im Promotor der phGPx

Neben den dominanten Protein-DNA-Komplexen der Faktoren NF-Y bzw. Sp1 mit den phGPx-Promotorsequenzen waren spezifische Protein-DNA-Komplexe gefunden worden, die bisher nicht charakterisiert worden waren. Darüber hinaus wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der untranslatierte Bereich der zytosolischen Isoform der phGPx auf Protein-DNA-Interaktionen untersucht. Diese Untersuchungen schienen vor allem deshalb interessant zu sein, da in Reporteragen-Assays dieser Sequenz ein erheblicher Anteil an der Reporteragenaktivität und damit der Promotoraktivität (etwa 50 %) zugewiesen werden konnte. In den folgenden beiden Abschnitten sollen diesbezüglich weitere Ergebnisse aus grundlegenden Gelshift-Experimenten dargestellt werden.



**Abb. 9: Protein-DNA-Interaktionen an der Sonde FP4A im Gelshift-Assay.**

Die Gelshift-Sonde FP4A zeichnet sich dadurch aus, dass sie bei Inkubation mit nukleären Extrakten aus HEK293-Zellen im Gelshift-Assay zwei Protein-DNA-Komplexe herausbildet. Diese lassen sich durch Zugabe eines 200fachen molaren Überschusses unmarkierter Konsensus-Oligonukleotide spezifisch kompetieren. Während sich das obere Shift-Signal nur mit dem Konsensus-Motiv für NF-Y kompetieren lässt, bleibt das untere Signal unbeeinflusst. Entgegengesetzt dazu verhält sich der Kompetitionsversuch mit dem Konsensus-Oligonukleotid für Smad3/4. Hier wird ausschließlich die untere Shift-Bande kompetiert.

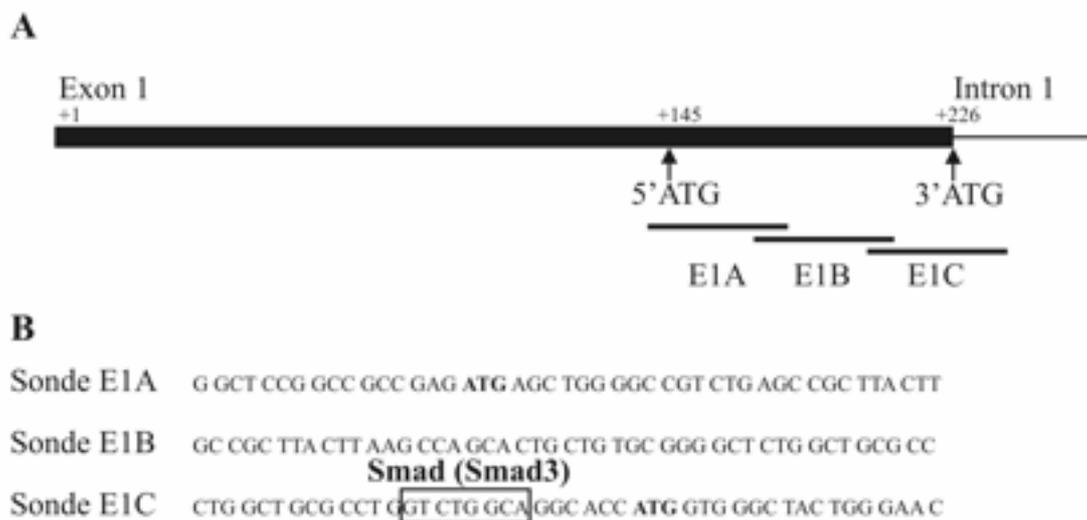
### Protein-DNA-Interaktionen an der Footprintregion FP4A

Das Gelshift-Muster der Sonde FP4A zeichnete sich im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Sonden dadurch aus, dass sich an ihr zwei spezifische, von einander unabhängige Protein-DNA-Komplexe bildeten (Abb. 9, 7). Die Identität des Komplexes mit dem größeren Molekulargewicht konnte hier bereits mit dem Transkriptionsfaktor NF-Y geklärt werden. Dahingegen entzog sich die zweite Bande bisher der Aufklärung. Die Zugabe eines molaren Überschusses der Sonde mit der consensus-Bindesequenz für NF-Y (Abb. 9) und der Sonde FP2 (nicht abgebildet), die ebenfalls NF-Y bindet, verhinderte nicht das Herausbilden dieses zweiten Protein-DNA-Komplexes. Wohingegen der NF-Y/FP2-Komplex sehr wohl kompetiert wurde. Auch die Zugabe spezifischer Antikörper gegen NF-Y oder SP1 veränderten dieses Shiftsignal nicht (Abb. 7). Schließlich war es jedoch möglich, durch die Zugabe einer unmarkierten Sonde mit der Consensus-Sequenz für Smad3/4 diesen Protein-DNA-Komplex zu kompetieren. Die *in silico* Analyse der Kernbindemotive an FP4A ergab eine 85%ige Übereinstimmung für die Familie der Smad-Proteine. Supershift-Experimente

mit spezifischen Antikörpern gegen die Faktoren Smad3, Smad4 und Smad1,2,3 waren jedoch unter den vorliegenden Bedingungen nicht in der Lage, den Protein-DNA-Komplex zu einem Supershift zu bringen oder aufzuheben (Abb. 13). Ursachen für die fehlgeschlagenen Supershift-Experimente könnten darin zu suchen sein, dass die Reaktionsbedingungen für eine Antikörper-Antigen-Reaktion nicht optimal waren oder andere Mitglieder der Smad-Familie an der Bildung dieses Protein-DNA-Komplexes beteiligt sind. Weiterhin ist eine Abschirmung der Antigen-determinanten durch andere Proteine des Protein-DNA-Komplexes möglich.

### Protein-DNA-Interaktionen im translatierten Bereich des Exons 1

Da wie eingangs erwähnt, der Anteil der translatierten Region zwischen den beiden Start-Codons in Exon 1 maßgeblich zur Reporter-genaktivität mit beiträgt, lag die Vermutung nahe, dass sich hier DNA-Elemente befinden, die für die Transkriptionsregulation wichtig sind. Aus diesem Grunde wurden auch hier Gelshift-Experimente durchgeführt. Die Region zwischen den ATGs ist mit 82 Basenpaaren zu groß für eine einzige Gelshift-Sonde. Daher wurde sie in drei überlappende Sonden untergliedert (Abb. 10) und diese in Gelshift-Assays hinsichtlich

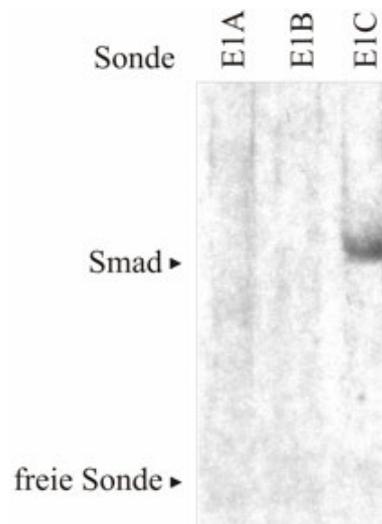


**Abb. 10: Der translatierte Bereich des Exons 1 der phGPx.**

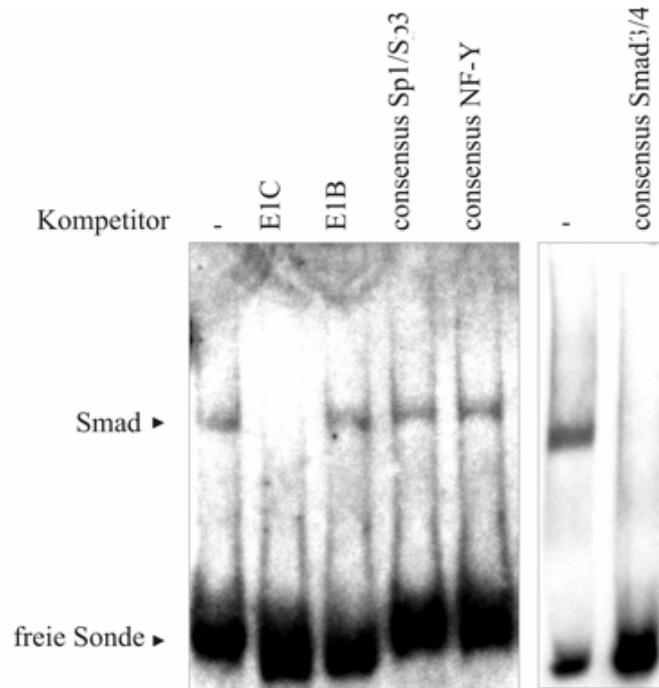
**A.** Der translatierte Bereich zwischen den beiden alternativen Translationsstarts 5'ATG und 3'ATG trägt bedeutend zur Gesamtpromotoraktivität der phGPx bei. Zur Analyse von Protein-DNA-Interaktionen wurde die Sequenz auf drei überlappende Gelshift-Sonden aufgeteilt. **B.** Die Sonden haben jeweils eine Größe von 46 Basenpaaren. Die beiden Translationsstarts in Sonde E1A bzw. E1C sind fett gedruckt.

ihrer Eigenschaft Protein-DNA-Komplexe herauszubilden untersucht (Abb. 11). Lediglich die Sonde E1C war befähigt einen solchen Komplex zu bilden (Abb. 11). Auffällig war hier die ähnliche Laufstrecke zum Smad3/4-Komplex an der Sonde FP4A. Um diese Ähnlichkeit näher zu charakterisieren, wurden zunächst kompetitive Gelshift-Experimente durchgeführt.

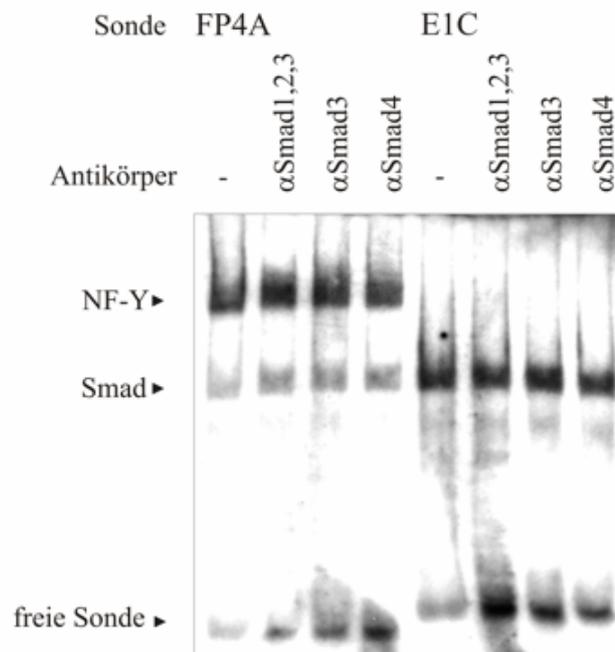
Durch Zugabe eines molaren Überschusses an unmarkierter Sonde E1C ließ sich der Protein-DNA-Komplex aufheben, wohingegen kompetitive Oligonukleotide der Sonde E1B, beziehungsweise Consensus-Oligonukleotide für Sp1/Sp3 oder NF-Y keinen Einfluss auf das Shift-Signal hatten (Abb. 12). Erst die Consensus-Sonde Smad3/4 konnte den Shift an E1C kompetieren (Abb. 12). Die Ähnlichkeit mit dem Smad3/4-Komplex an Sonde FP4A konnte ebenfalls durch kompetitive Gelshift-Assays bestätigt werden. Ein Überschuss an unmarkierter Sonde E1C verhinderte die Bildung des Smad3/4-Komplexes an FP4A während der NF-Y-Komplex unbeeinflusst blieb (nicht abgebildet). Die *in silico* Analyse bestätigte diesen Befund, da bei +212 bp mit einer Kernsequenzhomologie von 100% die Bindungssequenz für die Smad3/4-Familie gefunden wurde. In Supershift-Experimenten mit spezifischen Antikörpern gegen Smad3, Smad4 und Smad1,2,3 wurde auch hier keine Veränderung des Bandenmusters nachgewiesen (Abb. 13). Mögliche Ursachen für die negativen Ergebnisse wurden bereits diskutiert. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl in der 5'-untranslatierten Region der pHGPx als auch im translatierten Bereich zwischen den alternativen Translationsstarts Proteine der Familie von Transkriptionsfaktoren Smad binden.



**Abb. 11: Protein-DNA-Interaktionen im translatierten Bereich von Exon 1.**  
Bei Inkubation mit nukleären Extrakten aus HEK293-Zellen war nur die Sonde E1C imstande im Gelshift-Assay einen Shift-Komplex (Smad) zu erzeugen.



**Abb. 12: Protein-DNA-Interaktionen im translatierten Bereich von Exon 1.**  
 In kompetitiven Gelshift-Versuchen in Gegenwart eines 200fachen molaren Überschusses an unmarkiertem Oligonukleotid waren die Sonde E1B und Konsensus-Oligonukleotide für Sp1/Sp3 und NF-Y nicht in der Lage den Shift-Komplex (Smad) aufzulösen. Nur die Zugabe der Sonde E1C oder eines Konsensus-Oligonukleotides für Smad3/4 als unmarkierte Kompetitoren konnte den Protein-DNA-Komplex an E1C aufheben.



**Abb. 13: Supershift-Experimente an den Sonden FP4A und E1C.**  
 Für Supershift-Experimente wurden vor der Gelshift-Reaktion nukleäre Extrakte aus HEK293-Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen Smad1,2,3, Smad3 oder Smad4 vorinkubiert. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen konnte mit keinem der gewählten Antikörper der Smad-Komplex an den Sonde FP4A oder E1C beeinflusst werden. Ebenso blieb der NF-Y-Komplex an Sonde FP4A in Gegenwart der Antikörper erhalten.

### **4.1.4 NF-Y und Sp1 binden in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) *in vivo* am Promotor der phGPx**

Die Gelshift- und Supershift-Experimente hatten gezeigt, dass in nukleären Extrakten von HEK293-Zellen die Faktoren NF-Y und Sp1 vorhanden sind und spezifisch mit Sequenzen am Promotor der phGPx interagieren. Um zu untersuchen, ob die Faktoren NF-Y und Sp1 auch unter *in vivo* Bedingungen binden, kam die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) zum Einsatz. Hierfür werden DNA-bindende Proteine mittels Formaldehyd kovalent mit DNA kreuzvernetzt, durch Ultraschall geschert und schließlich die Protein-DNA-Komplexe mit spezifischen Antikörpern gegen Transkriptionsfaktoren immunopräzipitiert. Anschließend wird die kovalente Protein-DNA-Vernetzung aufgehoben und die resultierenden DNA-Fragmente durch PCR mit genspezifischen Primern vervielfältigt (Abb. 14 A). Sowohl mit einem spezifischen Antikörper gegen NF-Y als auch gegen Sp1 wurden PCR-Signale erhalten (Abb. 14 B). Entsprechende Kontrollen ohne Antikörper oder mit einem nicht verwandten spezifischen Antikörper gegen die Kaninchen-Retikulozyten 15-Lipoxygenase ergaben kein Signal (Abb. 14 C). Damit konnte gezeigt werden, dass NF-Y und Sp1 *in vivo* in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) den Promotor phGPx binden.

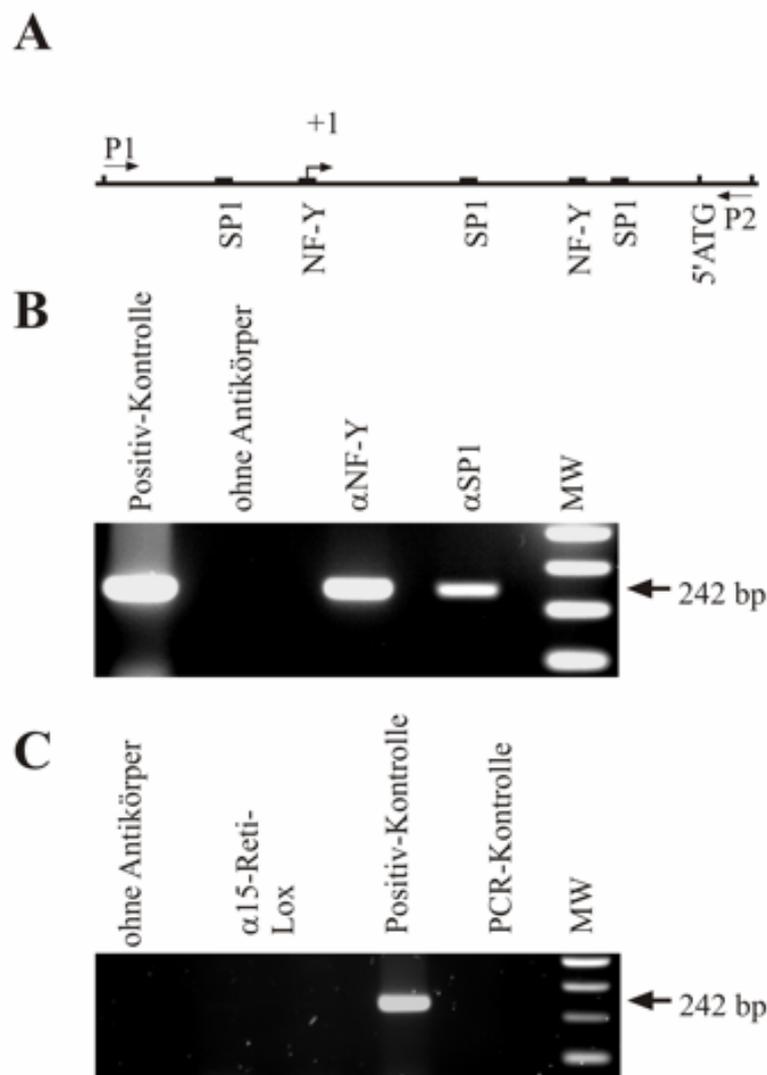


Abb. 14: Chromatin-Immunopräzipitation am phGPx-Promotor.

A. Die Gen-spezifischen Primer P1 und P2 schließen die 5'-flankierende Region (242 bp) der phGPx inklusive der Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren Sp1 und NF-Y ein. B. Gescherte Protein-DNA-Komplexe wurden mit spezifischen Antikörpern gegen Sp1 und NF-Y präzipitiert und die genomische DNA mit den Primern P1 und P2 amplifiziert. Die Positiv-Kontrolle ist die PCR-Amplifikation der genomischen DNA vor der Immunopräzipitation. C. Mit einem nicht verwandten Antikörper gegen 15-Retikulozyten Lipoxygenase (15-Retikulozyten-Lipoxygenase) oder ohne Antikörper konnte mit den phGPx-spezifischen Primern P1 und P2 keine gefällte genomische DNA nachgewiesen werden. Die PCR-Kontrolle ist eine PCR-Reaktion ohne DNA-Matrize.

#### 4.1.5 Funktionelle in vitro Promotorstudien

Zur Analyse des relativen Anteils der identifizierten Transkriptionsfaktoren an der Promotoraktivität wurden funktionelle Promotorstudien mit Reportergenkonstrukten des murinen Gens durchgeführt, in denen die cis-regulatorischen DNA-Sequenzen so mutiert wurden, dass die entsprechenden Faktoren nicht mehr binden konnten. Der Einfluss der eingeführten Punktmutationen wurde zunächst in kompetitiven Gelshift-Assays überprüft. Für die Promotorstudien wurden nur jene Mutationen verwendet, die im Gelshift-Assays die entsprechenden Faktoren nicht mehr banden. Verwendet wurden hier jene Reporter-gen-

Konstrukte, welche in vorangegangenen Untersuchungen die höchste Promotoraktivität gezeigt hatten. Dabei handelt es sich um die Konstrukte B1 (-100 bp/+132 bp) und C1 (-100 bp/+228 bp) (Abb. 16). Konstrukt B1 enthält den Transkriptionsstart der mitochondrialen phGPx-Isoform und ausschließlich untranslatierte Sequenzen. Wohingegen sich für Konstrukt C1 die translatierte Region zwischen den beiden Startkodons und damit die mitochondrialen Insertionssequenz der mitochondrialen phGPx anschließt. Das Konstrukt C1 enthält darüber hinaus einen alternativen Transkriptionsstart bei +192 bp für die zytosolische Isoform der phGPx (Abb. 16).

### **Mutagenese der Bindungsmotive für NF-Y und Sp1**

Um den Einfluss der Punktmutationen im Reportergen-Assay untersuchen zu können, musste zunächst im Gelshift-Assay bestätigt werden, dass keine Protein-DNA-Interaktionen mit den entsprechenden Faktoren aufgebaut werden konnten. Die Mutationen wurden zunächst so gestaltet, dass durch *in silico* Analysen mit dem Programm MatInspector (Quandt et al., 1995) die entsprechenden Kernbindesequenzen nicht mehr gefunden wurden. Anschließend wurden doppelsträngige DNA-Oligonukleotide hergestellt, welche die Mutationen trugen. Diese wurden in kompetitiven Gelshift-Assays eingesetzt. Sollten die Mutationen die Protein-DNA-Interaktion am mutierten DNA-Oligonukleotid verhindern, ist dieses nicht mehr in der Lage, im Gelshift den Protein-DNA-Komplex mit der markierten, unmutierten Sonde zu beeinflussen. Das entsprechende Gelshift-Signal muss nach Zugabe eines molaren Überschusses an unmarkierter, mutierter Sonde unbeeinflusst bleiben. Dies gestaltete sich für jede Protein-DNA-Kontaktstelle unterschiedlich kompliziert. Während bei einigen DNA-Motiven eine einzelne Basensubstitution erfolgreich die Protein-Interaktion verhinderte, mussten bei anderen Sonden zahlreiche Mutationen eingeführt werden, um zum Erfolg zu gelangen. So wurden bei Sonde FP1 fünf Basen, bei FP2 vier Basen, bei Sonde FP3 zwei Basen und bei den Sonden FP4A und FP4B jeweils eine Base substituiert werden (Abb. 15 A). Keine der im Gelshift getesteten Sonden war imstande, die entsprechenden Gelshift-Signale zu beeinträchtigen, was ihre Eignung für weitere Untersuchungen bestätigte (Abb. 15 B, C). Zur Sonde FP4A, die sowohl NF-Y als auch Proteine der Smad3/4-Familie bindet, muss bemerkt werden, dass die eingeführte Mutation ausschließlich das Binden von NF-Y verhindert. Die Zugabe eines molaren Überschusses mutierter Sonde mFP4A beeinträchtigte nicht das NF-Y-Signal wohl aber das Smad3/4-Signal (Abb. 15 C). Die Mutagenese des CCAAT-Motivs stört demnach nicht die Interaktion der Smad-Proteine.

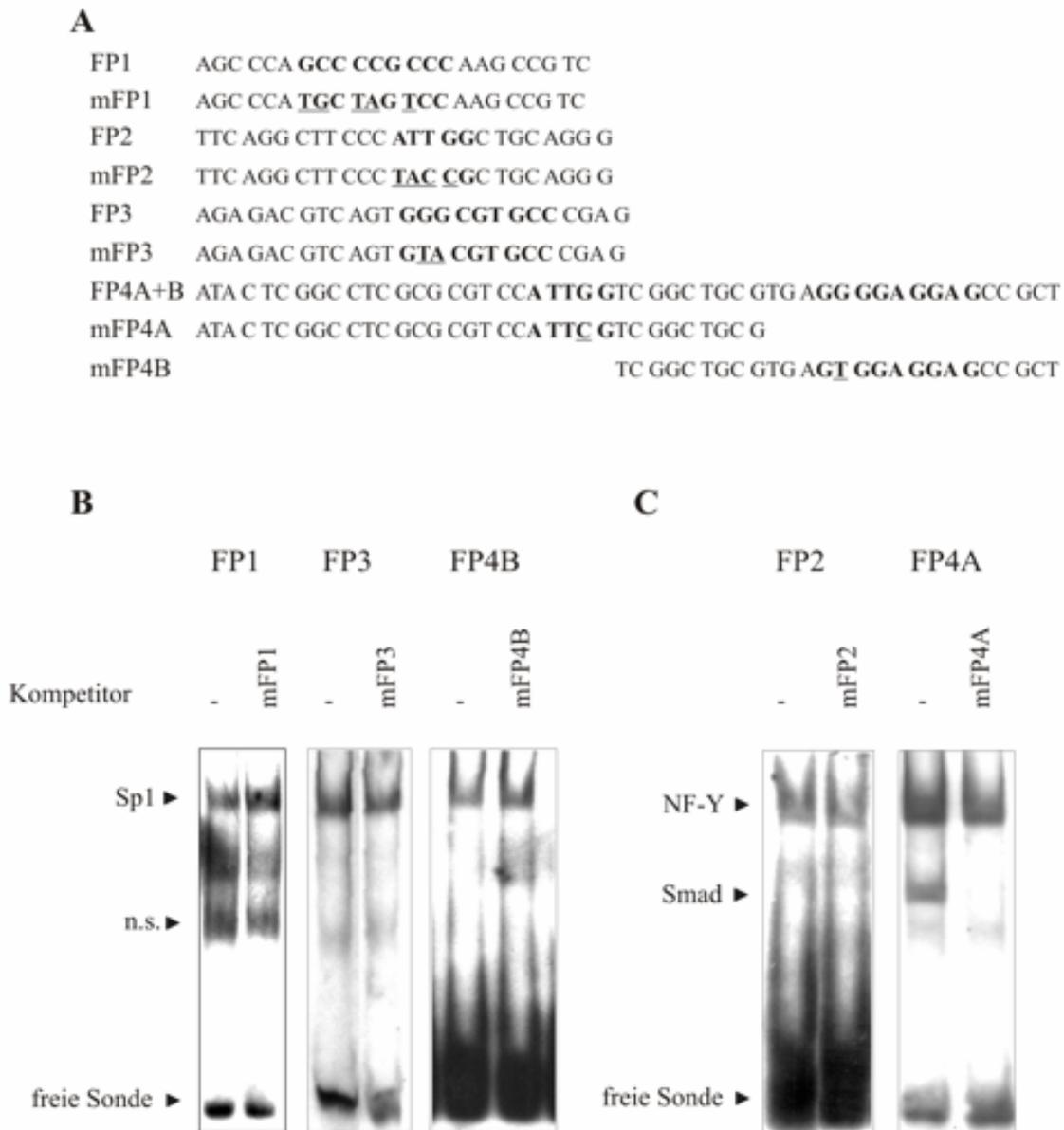


Abb. 15: Kompetitive Gelshift-Experimente mit mutierten Sonden.

Mithilfe des Programms MatInspectors (Quandt et al., 1995) wurden die Kernbindemotive der identifizierten Transkriptionsfaktoren SP1 und NF-Y so mutiert, dass die entsprechenden Proteine nicht mehr gebunden werden konnten. A. Die Sequenzen der Gelshift-Oligonukleotide FP1 bis FP4B sind im Vergleich zu ihren Mutanten mFP1 bis mFP4B dargestellt. Die Kernbindemotive sind fett und die mutierten Basen unterstrichen hervorgehoben. B und C. Die Zugabe eines 200fachen molaren Überschusses an mutierten Sonden vermochte in Gegenwart von nukleären Extrakten aus HEK293-Zellen nicht die Protein-Komplexe mit Sp1 bzw. NF-Y aufzulösen. n.s., nicht spezifisch.

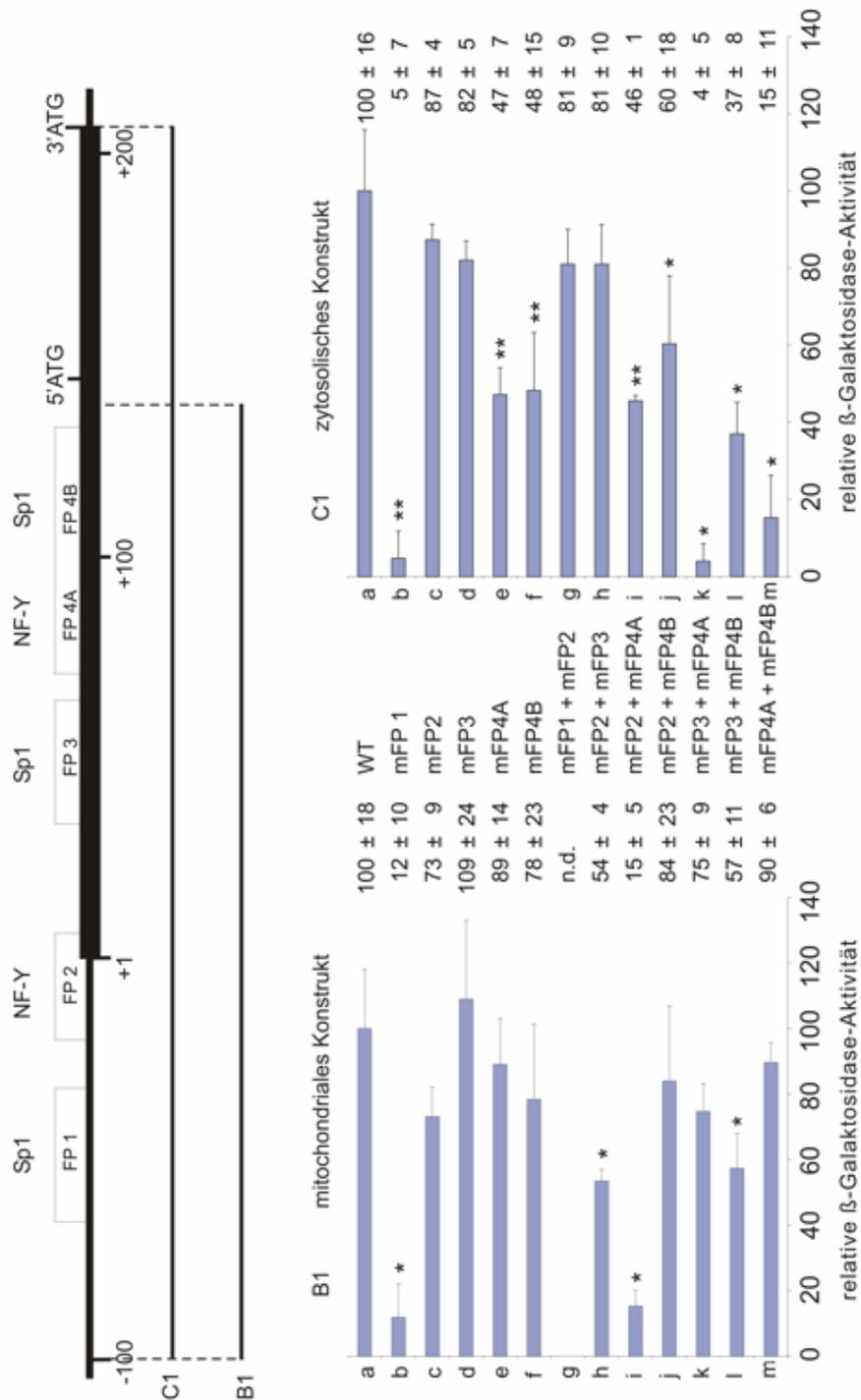
### Funktionelle Promotorstudien mit mutierten Promotorkonstrukten

Die Mutationen, welche die Faktoren NF-Y und Sp1 nicht mehr banden, wurden mittels ortsgerechter Mutagenese in die Promotorkonstrukte B1 und C1 eingeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Abbildung 16 zusammenfassend dargestellt und werden im Folgenden näher beschrieben. Zunächst wurde der Einfluss der Transkriptionsfaktoren in

Einzelmutationen untersucht. Die Mutagenese der Sp1-Bindestelle im Footprint FP1 führte in beiden Konstrukten zu einem massiven Verlust an Promotoraktivität. Die Interaktion von Sp1 im Bereich FP1 scheint daher sowohl für die Expression der mitochondrialen als auch der zytosolischen pHGPx-Isoform von größter Bedeutung zu sein.

In einer Untersuchung von Huang *et al.* war gezeigt worden, dass die Mutation der CCAAT-Box in FP2 am humanen Gen zu einem Verlust an Promotoraktivität von etwa 40% führt (Huang et al., 1999). Hier konnte für ähnliche Mutationen am murinen Gen ebenfalls ein Verlust an Reportergenaktivität verzeichnet werden, der jedoch statistisch nicht signifikant war. Die Mutagenese der Protein-Bindestellen in FP3, FP4A und FP4B hatte ebenfalls einen geringen aber statistischen nicht signifikanten Einfluss auf die Reportergenaktivität von Konstrukt B1. Für die Einzelmutationen der am meisten stromabwärts gelegenen Motive der Bereiche FP4A und FP4B wurde jedoch ein signifikanter Verlust von etwa 50% an Reportergenaktivität des Konstruktes C1 gemessen.

Um die funktionellen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Faktoren zu untersuchen, wurden nachfolgend Doppelmutationen eingeführt. Hier zeigten sich ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den beiden Promotorkonstrukten B1 und C1. Wurden die cis-regulatorischen Motive in FP1 und FP2 simultan mutiert, war bei Konstrukt B1 keine Reportergen-Aktivität mehr messbar. Im Gegensatz dazu hatte diese Doppelmutation nur einen geringen Einfluss auf die Promotor-Aktivität von Konstrukt C1. Wird das CCAAT-Motiv in FP2 im Konstrukt B1 zusätzlich zum GC-Motiv in FP1 mutiert, wird der Verlust an Reportergen-Aktivität durch mFP1 allein also durch mFP2 noch verstärkt. Im Gegensatz dazu wird im Konstrukt C1 der inhibierende Einfluss von mFP1 durch mFP2 nahezu aufgehoben. Beide Promotorkonstrukte unterscheiden sich durch die Sequenz zwischen den beiden Translationsstarts (5'ATG und 3'ATG). Das legt die Vermutung nahe, dass dieses gegensätzliche Verhalten auf den regulatorischen Eigenschaften dieser Sequenz beruht. Es ist möglich, dass das unterschiedliche Verhalten der beiden Konstrukte für die Doppelmutanten mFP1 + mFP2 daher rührt, dass die Faktoren NF-Y und/oder Sp1 direkt oder indirekt mit Sequenzen im translatierten Bereich interagieren und ihr regulatorischer Einfluss dadurch verändert wird. Um dieses funktionelle Wechselspiel von NF-Y, Sp1 und den Sequenzen zwischen den ATGs zu klären, sind weitere Untersuchungen notwendig.



**Abb. 16: Funktionelle *in vitro* Promotorstudien mit mutierten Reporter-Konstrukten.**  $\beta$ -Galaktosidase-Promotorkonstrukte wurden mit einem Luziferase-Kontroll-Plasmid gemischt und mit FuGene6 in HEK293-Zellen kotransfiziert. Die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase wurde gegen die Luziferase-Aktivität normalisiert. Die Zahlen sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen und angegeben als relativer Wert zum unmutierten Wildtyp (WT). Im oberen Teil der Abbildung sind die Lage der Konstrukte B1 und C1 sowie der Footprints FP1 bis FP4 in der 5'-flankierenden Region des phGPx-Gens angegeben. Außerdem sind die alternativen Translations- (5'ATG und 3'ATG) und Transkriptionsstarts (Pfeile; +1 bp, +83 bp, +192 bp) eingezeichnet. Der mitochondriale Transkriptionsstart ist mit +1 bp markiert. Die untere Abbildung zeigt die relativen Promotoraktivitäten im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  verglichen mit dem Wildtyp.

Die gleichzeitige Mutation von FP2 und FP3 führte im Konstrukt B1 verglichen mit den Einzelmutationen zu einem unwesentlich stärkeren und signifikanten Verlust an Promotoraktivität. Im Konstrukt C1 blieb der Einfluss dieser Doppelmutation ohne additiven Effekt zu den Einzelmutationen. Zu einem deutlichen, statistisch signifikanten Verlust an Promotor-Aktivität führte die Doppelmutation der beiden CCAAT-Boxen von FP2 und FP4A im Konstrukt B1, während beide Einzelmutationen nur einen geringen inhibierenden Einfluss ergeben hatten. Dahingegen ergibt sich für die Doppelmutation mFP2/mFP4A im Konstrukt C1 kein additiver Effekt im Vergleich zur Einzelmutation mFP4A. Die Reporter-gen-Aktivität bei der Doppelmutation mFP2/mFP4B im Konstrukt B1 verhält sich ähnlich wie die Einzelmutationen und ist statistisch nicht signifikant. Dieselbe Doppelmutation im Konstrukt C1 führt zu einem signifikanten Verlust an Reporter-gen-Aktivität, bleibt aber ohne additive Effekte verglichen mit der Einzelmutante mFP4B. Damit verhält sich am Konstrukt C1 die Doppelmutante mFP2/mFP4B ähnlich der Doppelmutante mFP2/mFP4A. Der Verlust an Reporter-gen-Aktivität bei der Doppelmutation mFP3/mFP4B im Konstrukt B1 ist zwar prononcierter als die Einzelmutationen aber nicht statistisch signifikant. Im Konstrukt C1 führt die simultane Mutation von FP3 und FP4A dahingegen zu einer starken, signifikanten Inhibierung an Reporter-gen-Aktivität, der auch deutlicher ausfällt als bei den Einzelmutationen. Zu einem signifikanten Verlust an Reporter-gen-Aktivität von Konstrukt B1 kommt es bei der Doppelmutante mFP3/mFP4B. Im Vergleich mit den Einzelmutationen ist hier der Effekt ebenfalls deutlicher. Ebenfalls signifikant ist der inhibierende Einfluss dieser Doppelmutation in Konstrukt C1, wobei der additive Effekt zu den Einzelmutationen gering ausfällt. Die gleichzeitige Mutation der beiden am meisten stromabwärts gelegenen Bereiche FP4A und FP4B führt in Konstrukt B1 wie die Einzelmutanten zu einer geringen aber statistisch nicht signifikanten Inhibierung der Reporter-gen-Aktivität. Im Gegensatz dazu führt diese Doppelmutante am Konstrukt C1 zu einem signifikanten Verlust an Reporter-genaktivität, der auch deutlicher ausfällt als die Mutation von FP4A und FP4B allein. Zusammenfassend lässt sich anhand dieser Ergebnisse Folgendes schlussfolgern:

1. Das Binden von Sp1 an FP1 ist das wichtigste regulatorische Element im basalen Promotor der phGPx.
2. Sp1 gebunden an FP1 und NF-Y gebunden an FP2 stehen mit einander und mit Sequenzen in der mitochondrialen Insertionssequenz zwischen den beiden ATGs in funktioneller Wechselwirkung.
3. Die simultane Mutation der distalen Bereiche FP1 und FP2 entwickeln ihre Wirkung deutlicher im Konstrukt für die mitochondriale phGPx-Isoform (B1).

4. Die gleichzeitige Mutation der proximalen Sequenzen FP3, FP4A und FP4B hingegen hemmt vor allem die Promotor-Aktivität des Konstrukts C1, das den Transkriptionsstart der zytosolischen phGPx-Isoform enthält.

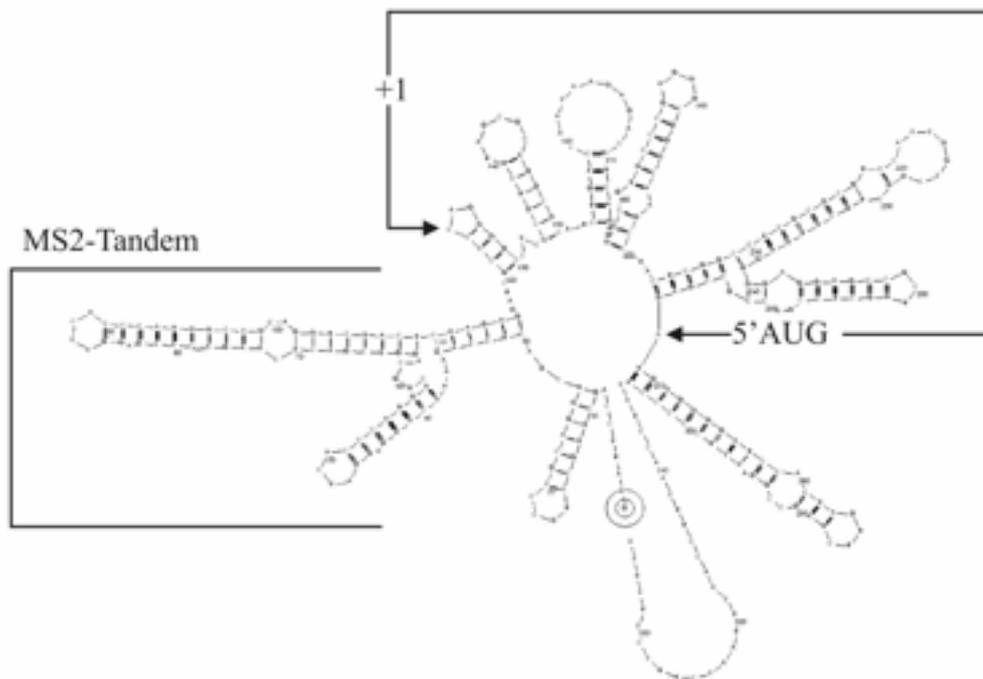
#### **4.2 Protein-RNA-Interaktion an der 5'-untranslatierten Region der mitochondrialen phGPx**

Nach der Untersuchung von Protein-DNA-Interaktionen an der 5'-flankierenden Region des phGPx-Gens im ersten Teil der Arbeit, soll im zweiten Teil begonnen werden, Protein-RNA-Interaktionen in der 5'-untranslatierten Region der phGPx-mRNA zu identifizieren. Damit wird die Analyse der Expressionsregulation der phGPx von der Ebene der Transkription auf die der post-transkriptionellen Ereignisse getragen.

##### **4.2.1 Der Guanin-reiche Sequenz-bindende Faktor 1 interagiert mit der 5'-untranslatierten Region der phGPx-mRNA**

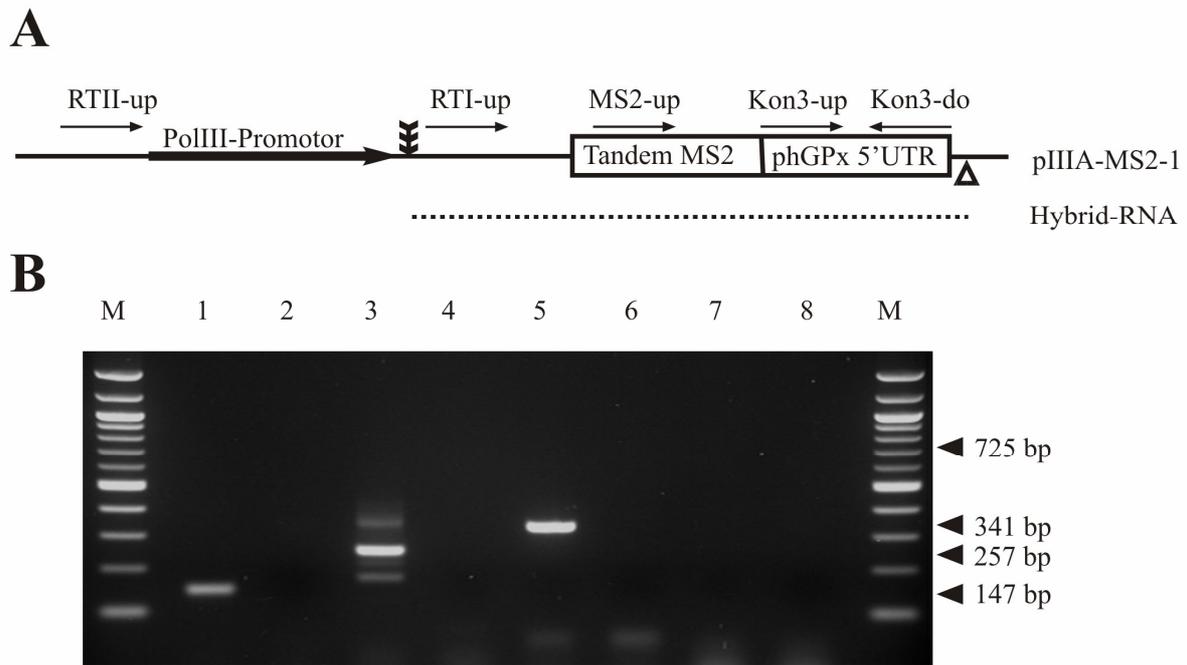
Zur Analyse von Protein-RNA-Interaktionen steht eine Anzahl von Methoden zur Verfügung. Ein Nachteil der meisten Methoden ist, dass sie Protein-RNA-Interaktionen *in vitro* untersuchen (Phagendisplay) und es mit ihnen nicht möglich ist, den Protein-Partner direkt zu identifizieren (UV-Crosslink). Dem gegenüber zeichnet sich das Hefe-Drei-Hybrid-System dadurch aus, dass es Protein-RNA-Interaktionen *in vivo* untersucht und der Protein-Partner durch Sequenzieren der entsprechenden cDNA einfach zu identifizieren ist. Ein Nachteil des Hefe-Drei-Hybrid-Systems ist das niedrige Verhältnis von Signal zu Hintergrund, welches umfangreiche Strategien zur Verifizierung der Protein-RNA-Interaktion nötig macht. Um ein Protein zu klonieren, welches spezifisch mit der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) der phGPx-mRNA interagiert und damit auf post-transkriptioneller Ebene die Expression der mitochondrialen phGPx beeinflusst, kam daher der *in vivo* Ansatz des Hefe-Drei-Hybrid Systems zur Anwendung. Bei dem Hefe-Drei-Hybrid System handelt es sich um eine erweiterte Version der Hefe-Zwei-Hybrid Systems zu Analyse von Protein-Protein-Interaktionen. Am Promotor eines Reportergens baut sich ein Hybrid-Protein auf, welches sich aus einer DNA- und einer RNA-bindenden Domäne zusammensetzt (LexA-Protein/MS2-Hüllprotein; Hybrid 1). Des Weiteren ist eine Hybrid-RNA (Hybrid 2) assoziiert, die aus einer bekannten spezifisch mit Hybrid 1 interagierenden RNA-Sequenz (MS2) und der RNA-Sequenz des „Köders“ besteht. Schließlich kommt ein weiteres Hybrid-Protein (Hybrid 3) dazu, welches sich aus einer RNA-bindenden Domäne („Beute“) und einer die Transkription des Hefe-Reportergens aktivierenden Aktivator-domäne zusammensetzt. Formiert sich dieser ternäre Komplex am Promotor des Reportergens, kommt es zu einer Reporter-genaktivierung, die sich mittels einfacher enzymatischer bzw. kolorimetrischer Methoden nachweisen lässt.

Dazu wurde als „Köder“ eine Hybrid-RNA konstruiert, welche neben dem MS2-Tandemmotiv die 5'-UTR der im Testis hoch exprimierten, mitochondrialen phGPx enthielt [vom Transkriptionsstart (+1 bp) (Nam et al., 1997) bis zum 5'ATG (+145 bp)] (Abb. 17). Als „Beute“ diente eine cDNA-Expressionsbibliothek aus Maus-Testes. Im Hefestamm YBZ-1, welcher auxotroph für Adenin, Uracil, Leucin, Histidin und Tryptophan ist sowie das Proteinhybrid 1 (*E. coli* LexA-Protein/MS2-Bakteriophagen Hüllprotein N55K) exprimiert, wurden die beiden Reportergene HIS3 und LacZ verwendet. Die Promotoren der Reportergene enthalten multiple LexA-Operatoren, an welche das Proteinhybrid 1 bindet.



**Abb. 17: Darstellung der Hybrid-RNA aus MS2-Tandem-Sequenz und der 5'-untranslatierten Region der phGPx-mRNA. +1, Transkriptionsstart der phGPx (Nam et al., 1997), 5'AUG, Translationsstart der mitochondrialen phGPx.**

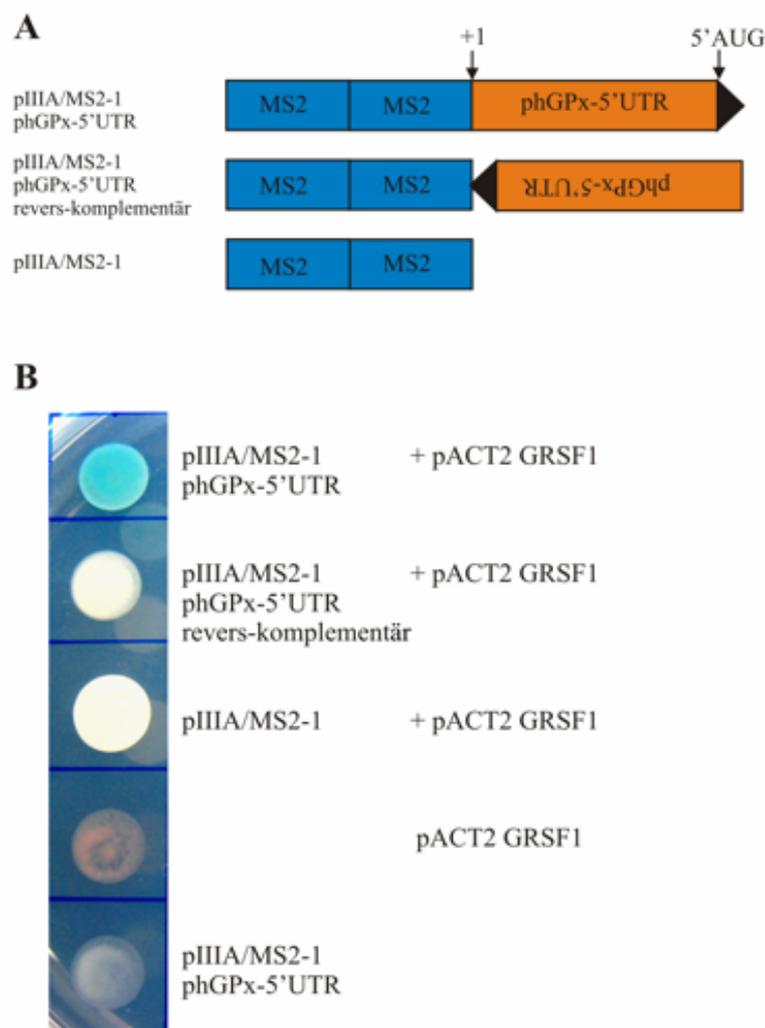
Manche Hybrid-RNAs sind in der Lage allein das Reportergen HIS3 im Hefestamm YBZ-1 zu aktivieren. Um diese schwache Aktivierung zu unterdrücken, die in falsch-positiven Klonen resultiert, wurde eine 3-Aminotriazol-Titration durchgeführt. 3-Aminotriazol (3-AT) ist ein kompetitiver Inhibitor des HIS3-Genproduktes (His3p). Zellen mit stärkerer Reportergenaktivierung also mehr His3p überleben demnach höhere 3-AT-Konzentrationen. Die 3-AT-Konzentration, bei der mit dem Plasmid pIIIA/MS2-1 transformierte Hefen nicht mehr wuchsen, das Reportergen HIS3 also nicht aktivierten, war 2,5 mM im Nährmedium. Die Expression der Hybrid-RNA wurde nach RNA-Extraktion aus dem transfizierten Hefestamm und anschließender RT-PCR mit genspezifischen Primern bestätigt (Abb. 18).



**Abb. 18:** Die Hybrid-RNA bestehend aus MS2-Tandem-Wiederholung und phGPx-5'-untranslatierter Region wird in mit pIII-MS2-1+phGPx-5'-UTR transfizierten Hefezellen exprimiert. **A.** Dargestellt sind die Lage der PCR-Primer RTII-up, RTI-up, MS2-up, Kon3-up und Kon3-do sowie der Polymerase III-Promotor (PolIII) auf dem RNA-Expressionsplasmid pIII-MS2-1. Der Transkriptionsstart ist durch einen gefiederten Pfeil und der Transkriptionsstopp durch ein Dreieck gekennzeichnet. Die resultierende Hybrid-RNA ist durch eine gestrichelte Linie kenntlich gemacht. **B.** Aus transformierten Hefezellen wurde RNA präpariert, cDNA geschrieben und diese mittels Gen-spezifischer Primer amplifiziert (Siehe Material und Methoden). PCR-Kontrollen waren Reaktionen ohne DNA-Matrize (Spur 2, 4, 6 und 8). Die Primer-Kombinationen Kon3-up (Spur 1), MS2-up (Spur 3) und RTI-up (Spur 5) mit Kon3-do bestätigen die Expression der Hybrid-RNA. Mit der Primer-Kombination RTII-up/Kon3-do (Spur 7) wurde auf das Vorhandensein von Plasmid-DNA als Verunreinigung der RNA-Präparation getestet. Es liegt kein signifikanter Anteil Plasmid-DNA vor.

Nach der Transformation des Plasmides pIII/MS2-1, welches für das RNA-Hybrid kodiert, in den Hefestamm YBZ-1 wurde eine testikuläre Maus cDNA-Expressionsbibliothek transformiert. Die cDNAs wurden so in den Expressionsvektor pACT2 kloniert, dass sie N-terminal mit der GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert waren. Um genügend DNA-Material für eine Hefetransformation zu erhalten, wurde die Expressionsbibliothek nach Bestimmung des Titers in *E. coli* BNN132 mit der Semisolid-Methode einmal reamplifiziert. Die initiale Bibliothekstransformation wurde nur auf das Reportergen HIS3 und auf den Marker LEU2 des Vektors pACT2 selektiert, nicht aber auf die Erhaltung des RNA-Plasmides pIII/MS2-1. Ist die Reportergenaktivierung RNA-unabhängig, verliert der Hefeklon das RNA-Plasmid und kann wie in Material und Methoden beschrieben selektiert werden. Von  $\sim 10^7$  Transformanten wurden etwa 1300 3-AT-resistente und zunächst RNA-abhängige Klone gepickt, die das Reportergen HIS3 aktivierten und auf Histidin-Mangelmedium in Gegenwart von 2,5 mM 3-Aminotriazol wachsen konnten. Anschließend wurden diese Klone mittels des Colony-Lift LacZ-Filter-Assays auf die Aktivierung des

zweiten Reportergens LacZ getestet. Ungefähr 95% dieser Klone aktivierten auch das zweite Reportergen. Diese Hefe-Klone wurden dann durch zwei Runden URA3-Gegenselektion auf ihre Abhängigkeit von der Hybrid-RNA getestet. Diese Methode erlaubt das gezielte Entfernen des Plasmides pIII/MS2-1 aus Hefezellen und Testen derselben auf LacZ-Aktivierung. Lediglich zwei Prozent der Hefe-Klone erwiesen sich darauf als tatsächlich abhängig vom RNA-Plasmid pIII/MS2-1. Anschließend wurden die verbliebenen Klone unter Verwendung des Paarungsassays und der Kotransformation auf ihre Bindungsspezifität getestet (Abb. 19).



**Abb. 19: Untersuchungen zur Bindungsspezifität von Hefe-Klon 6 mittels Kotransformation.**

**A.** Die verwendeten RNA-Konstrukte sind schematisch dargestellt. **B.** Der Hefestamm YBZ-1 wurde mit den angegebenen Plasmiden kotransfiziert und auf Selektionsmedium ohne Adenin, Uracil und Leucin in Gegenwart des  $\beta$ -Galaktosidase-Substrats X-gal ausplattiert (YC-AUL + X-gal). Eine Reportergenaktivierung findet sich nur bei Kotransformation von pIII/MS2-1 und pACT2. Erläuterungen finden sich im Text.

Als Kontrollen dienten hier ein RNA-„Köder“ ohne phGPx-Sequenzen, der also nur für die MS2-RNA kodiert, und ein RNA-Hybrid, in welchem die phGPx 5'-UTR in revers-komplementärer Orientierung vorlag. Mit keinem der beiden RNA-„Köder“ sollte eine

Aktivierung der Reportergene stattfinden. Schließlich konnte ein Hefeklon (Klon 6) identifiziert werden, der eine cDNA exprimiert, die für ein testikuläres Protein kodiert, welches spezifisch mit der 5'-UTR der phGPx-mRNA jedoch nicht mit den beiden Kontroll-RNAs interagiert. In Abbildung 19 sind diese Untersuchungen zur Spezifität dargestellt. Etabliert sich am Reporter gen der  $\beta$ -Galaktosidase (LacZ) der Drei-Hybrid-Komplex wird dieses Gen exprimiert und das im Nährmedium enthaltene Substrat X-gal zu einem blauen Farbstoff umgewandelt. Damit färbt sich der entsprechende Hefeklon blau. Fehlt eines der beiden Plasmide ist kein Hefe-Wachstum auf Selektionsmedium ohne Adenin, Uracil und Leucin (YC-AUL) zu beobachten. Wird das Plasmid pACT2 allein transformiert, kommt es zu einer Rot-Färbung der Hefezellen. Das Plasmid pIII/MS2-1 kodiert neben dem MS2-RNA-Hybrid für ein Enzym der Adenin-Biosynthese ADE2, welches dem Hefestamm YBZ-1 fehlt. Ist das Plasmid pIII/MS2-1 nicht vorhanden, kommt es zu einer Akkumulation eines rötlichen Zwischenproduktes der Adenin-Biosynthese in den Hefezellen.

Von diesem Hefe-Klon 6 wurde die Plasmid-DNA für pACT2 isoliert und die Sequenz der enthaltenen cDNA analysiert. Eine BLAST-Suche (<http://www.ebi.ac.uk/blastall/>, 1.12.2005) der aus Hefe-Klon 6 erhaltenen cDNA-Sequenz gegen die EMBL Datenbank (Kanz et al., 2005) lieferte eine nahezu 100%-ige Übereinstimmung mit dem C-terminalen Ende [75% der kodierenden Sequenz mit der Maus (*Mus musculus*)] der cDNA für den Guanin-reiche Sequenz-bindenden Faktor 1 (GRSF1; Nm\_178700). Die N-terminalen 25% der identifizierten Sequenz sind durch Sequenzen einer alternativen Spleißform von GRSF1 ersetzt. Diese Spleißform ist bisher noch in keiner zugänglichen Datenbank eingetragen und wird im Folgenden als Klon 6-GRSF1 (K6-GRSF1) bezeichnet. In der gefundenen cDNA sind alle drei RNA-Erkennungsmotive (RRM, RNA recognition motive) vorhanden, die in der bekannten Spleißvariante des murinen GRSF1, im folgenden als mGRSF1 bezeichnet, für Protein-RNA-Interaktionen beschrieben sind (Abb. 20). Auf DNA-Ebene beträgt die Übereinstimmung über die gesamte cDNA-Sequenz 85 %. Die 1086 bp umfassende C-terminale Region sowie die gesamte 3'-untranslatierte Region (~530 bp) sind bis auf eine Basensubstitution identisch. Diese eine Mutation schlägt sich auf Aminosäureebene an Position 254 nieder. Dabei wird ein Threonin zu einem Arginin. Ein Sequenzierartefakt kann hierbei aufgrund wiederholter Sequenzierung ausgeschlossen werden. Da die Expressionsbibliothek so konstruiert war, dass sie bevorzugt mRNAs mit vollständige 3'-Enden nicht jedoch kompletter 5'-terminaler Sequenz enthielt, besitzt die cDNA von K6-GRSF1 kein Startkodon (ATG), welches dem Translationsstart der in der Datenbank eingetragenen Isoform von GRSF1 entspräche. Ein potentiell erstes Startkodon befindet sich

an Position 108 der Aminosäuresequenz des GRSF1-Anteils des Hybrid-Proteins aus N-terminaler Aktivator-domäne und C-terminalem GRSF1 (Abb. 20). Da die Aminosäuren 1 bis 107 von K6-GRSF1 im Hybrid des Hefe Drei-Hybrid Systems vorhanden sind und in diesem Bereich Teile des ersten RNA-Erkennungsmotivs liegen, haben wir für die folgenden Versuche angenommen, dass das eigentliche Startkodon weiter stromaufwärts gelegen ist.

Alanin-reiche Domäne		
mGRSF1	MAGTRWVLGALLRGGYGCNCSSCRRTGAACLPFYSAAGTFPSGVSGRRRLLLLLGAAAAAA	60
K6-GRSF1	-----	17
alternative Aminosäuresequenz		
mGRSF1	SQTRGLQLGPAAAGRLAGPIPARPSAAAAAATSYSALRAPLFPRLSLAAAAGPARGYSQES	120
K6-GRSF1	-----IGHGNKGRSHGPGSSCFVPSESGRLGSES	29
RNA-Erkennungsmotiv 1		
mGRSF1	KTTYLEDLPPLPEYELSPSKLGDEVDDVYLIRAQGLPWSCTVEDVLNFFSDCRIRNSEN	180
K6-GRSF1	KTTYLEDLPPLPEYELSPSKLGDEVDDVYLIRAQGLPWSCTVEDVLNFFSDCRIRNSEN	89
*****		
mGRSF1	IHFLLNRDGGKRRGDALIEMESEQDVQKALEKHRMYMGQRYVEVYEINNEDVDA	240
K6-GRSF1	IHFLLNRDGGKRRGDALIEMESEQDVQKALEKHRMYMGQRYVEVYEINNEDVDALMKSLQV	149
*****		
RNA-Erkennungsmotiv 2		
mGRSF1	KPSPVLSDGVVRLTGLPYSCNEKDIDVDFAGLNIVDITFVMDYRGRRKTEGAYVQFEEPE	300
K6-GRSF1	KPSPVLSDGVVRLRGLPYSCNEKDIDVDFAGLNIVDITFVMDYRGRRKTEGAYVQFEEPE	209
*****		
mGRSF1	MANQALLKHREEIGNRYIEIFPSRRNEVRTHVGSHKGGKMTSSPPTKYITEPEVVFEEME	360
K6-GRSF1	MANQALLKHREEIGNRYIEIFPSRRNEVRTHVGSHKGGKMTSSPPTKYITEPEVVFEEME	269
*****		
saure Domäne		
mGRSF1	VNEDIRPMTAFESDKIEI LPKEMSEKLP EAVDFGTLPSLHFVHMRGLPFQANAQDIINFF	420
K6-GRSF1	VNEDIRPMTAFESDKIEI LPKEMSEKLP EAVDFGTLPSLHFVHMRGLPFQANAQDIINFF	329
*****		
RNA-Erkennungsmotiv 3		
mGRSF1	APLKPVRITMEYSSSGKATGEADVHFDTHEDAVAAMLKDRSHVQHRYIELFLNSCPKGG	479
K6-GRSF1	APLKPVRITMEYSSSGKATGEADVHFDTHEDAVAAMLKDRSHVQHRYIELFLNSCPKGG	388
*****		

Abb. 20: Aminosäuren-Alignment der beiden Isoformen von GRSF1.

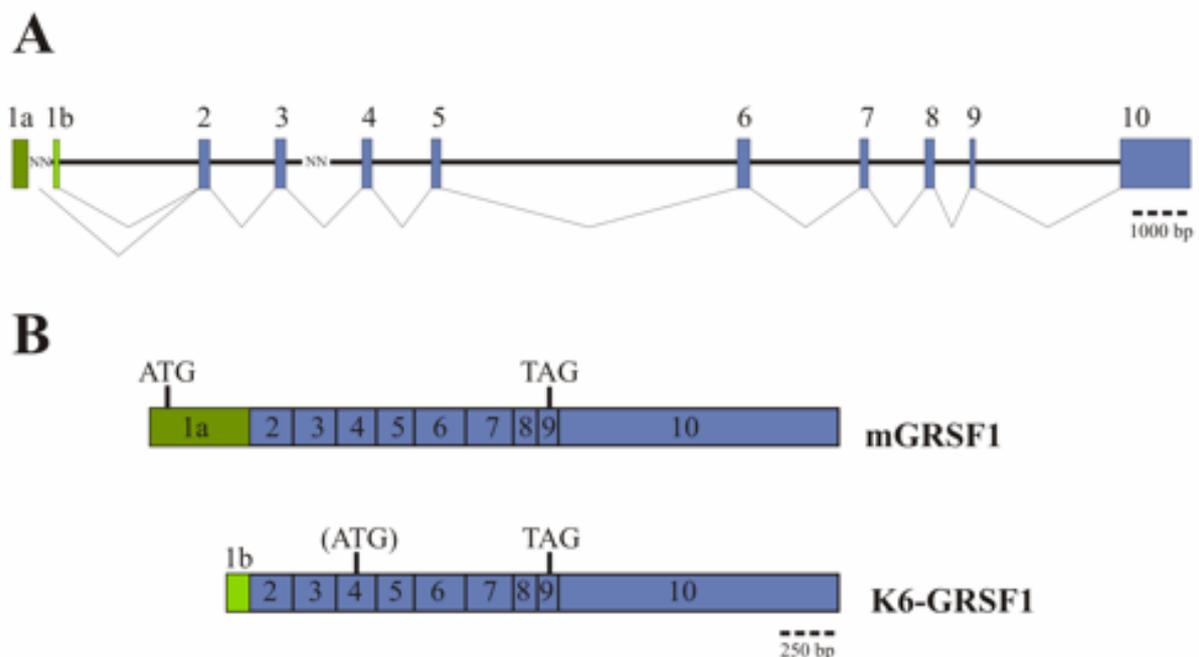
Dargestellt sind die aus den cDNAs resultierenden Aminosäuresequenzen der im Hefe Drei-Hybrid System identifizierten Isoform (K6-GRSF1) und der bekannten Form (mGRSF1; Nm\_178700). Im Vergleich der Aminosäuresequenz der beiden Isoformen des GRSF1 zeigt sich die nahezu 100%ige Übereinstimmung der GRSF1-Isoform K6 (K6-GRSF1) mit den C-terminalen 75% der bekannten murinen GRSF1-Sequenz. Die einzelnen Protein-Domänen, Alanin-reiche Domäne, RNA-Erkennungsmotive 1 bis 3 und die saure Domäne sind farblich hervorgehoben. Mit gelb unterlegt sind die 27 Aminosäuren, durch die sich K6-GRSF1 vom murinen GRSF1 unterscheidet. Sternchen (\*) kennzeichnen übereinstimmende Aminosäuren. Das erste Methionin der Protein-Sequenz von K6-GRSF1 ist fett dargestellt.

#### 4.2.2 Expression und Reinigung des rekombinanten GRSF1

##### Klonierung der kodierenden Sequenz der GRSF1-Isoformen

Zur weiteren Analyse der Interaktionen von GRSF1 mit der 5'-untranslatierten Region der phGPx-mRNA war es notwendig, die kodierende Sequenz der GRSF1-cDNA in ein geeignetes bakterielles Expressionsplasmid zu klonieren, zu exprimieren und mittels geeigneter Reinigungstechniken anzureichern. Da der im Hefe-Screen identifizierte

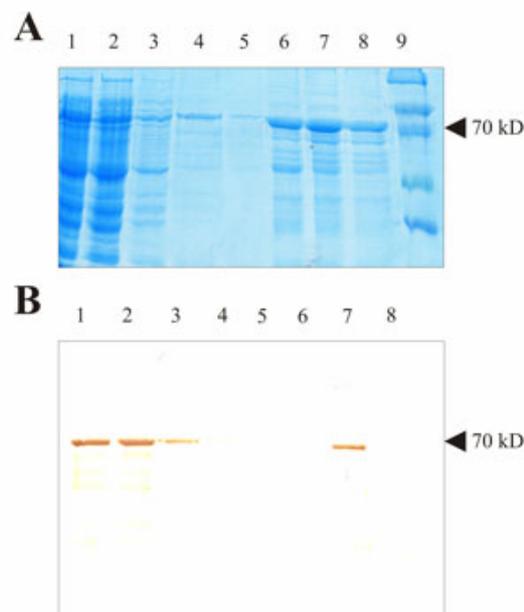
alternativen Spleißform das eigene Startkodon (ATG) fehlt, sollte zunächst mithilfe der Methode der 5'RACE an der RNA aus Maus-Testes der Transkriptionsstart der alternativen GRSF1-cDNA ermittelt werden. Diese Methode ermöglicht die Amplifikation intakter 5'-Enden von mRNAs. Obwohl sich die alternative Spleißform, soweit sie bisher sequenziert war, PCR-technisch im Maus-Testes nachweisen ließ (siehe auch Kapitel 4.2.4.), war es unmöglich PCR-Produkte zu erhalten, die darüber hinausgingen. Dies mag unter anderem an dem ausgesprochen hohen GC-Gehalt dieser Bereiche der cDNA liegen. Mit zahlreichen Abschnitten (>10 Basenpaare), die ausschließlich Guanin und Cytosin enthielten, beträgt der durchschnittliche GC-Anteil hier 77%. Eine Analyse der entsprechenden genomischen Sequenzen des Maus-Chromosoms 5 (Accession ID: NC\_000071) ergab, dass im Exon 1a und im Intron 1 bis Exon 1b von vermutlich 493 Basenpaaren nur 349 Basenpaare bekannt sind (Abb. 21). Damit sind auch die 3'-terminalen Spleißübergänge von Exon 1a unbekannt. Aufgrund dieser experimentellen Schwierigkeiten wurde die alternative Spleißform unverändert und ohne eigenes ATG für die bakterielle Expression eingesetzt. Daneben wurde die bereits bekannte cDNA des murinen GRSF1 (mGRSF1), die sich nur mithilfe eines speziellen PCR-Systems für GC-reiche Sequenzen vollständig fassen ließ, ebenfalls kloniert und exprimiert. Auch hier zeichnen sich die 5'-terminalen 400 Basen des Transkripts durch einen GC-Anteil von nahezu 80% aus.



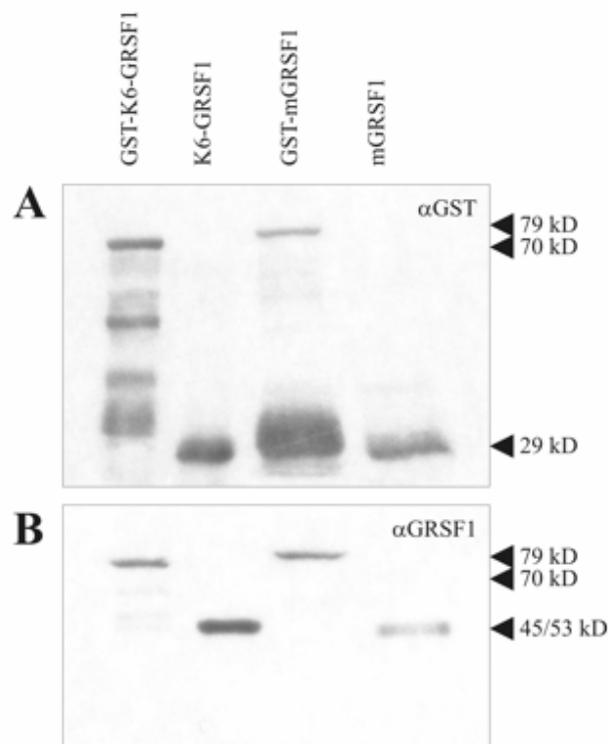
**Abb. 21:** Darstellung der Exon/Intron-Struktur des murinen GRSF1 Gens und der resultierenden cDNAs. A. Das murine Gen enthält 10 Exons, welche von 9 Introns unterbrochen werden. In den Introns 1 und 3 befinden sich durch „NN“ gekennzeichnete bisher nicht sequenzierte Regionen. Des Weiteren befindet sich im Intron 1 ein alternatives Exon 1b. B. Zwei der vom GRSF1-Gen exprimierte Isoformen sind in dieser Studie untersucht worden: mGRSF1 (Nm\_178700) und K6-GRSF1. Die cDNAs unterscheiden sich durch die alternativen Exons 1a bzw. 1b. Die Start- (ATG) und Stoppkodons (TAG) sind kenntlich gemacht. Die im Hefe-Drei-Hybrid-System identifizierte cDNA von K6-GRSF1 enthält kein Startkodon.

## Proteinexpression und -reinigung mithilfe des Glutathion-S-Transferase Systems

Die kodierenden cDNAs der beiden GRSF1-Isoformen wurden als Glutathion-S-Transferase (GST)-Addukte im *E. coli* Stamm BL21 exprimiert. Mittels der N-terminalen GST-Domäne konnten die Fusionsproteine über Glutathion-(GSH)-Agarose angereichert werden (Abb. 22). Aus 50 ml Bakterienkultur konnten etwa 100 µg angereichertes GST-K6-GRSF1 bzw. GST-mGRSF1 gewonnen werden. Um eine unspezifische durch den GST-Anteil vermittelten Protein-RNA-Interaktion in den *in vitro* Bindungsstudien auszuschließen und da die Protein-Präparationen immer einen Anteil freier Glutathion-S-Transferase enthielten (Abb. 22, 23), wurde für Kontrollexperimente auch Glutathion-S-Transferase ohne GRSF1-Anteil gereinigt (nicht abgebildet). Um die Interaktionen von GRSF1 darüber hinaus auch ohne den GST-Anteil zu untersuchen, wurde die GST-Domäne mit Thrombin vollständig abgespalten, über nochmaliges Binden an Glutathion-Agarose vom freien GRSF1 getrennt und anschließend konzentriert (Abb. 23). Im Westernblot mit anti-GST-Antikörper ist zu sehen, dass kein GST-Fusionsprotein sondern ausschließlich freier GRSF1 nach Thrombin-Verdau vorliegt. Der Reinigungseffekt konnte dabei nochmals erhöht und der Anteil freier Glutathion-S-Transferase weiter gesenkt werden. Die Westernblot-Analyse mit polyklonalem Antikörper gegen GRSF1 zeigte in den gereinigten Fraktionen nur eine immunreaktive Bande (Abb. 23).



**Abb. 22: Reinigung des GST-GRSF1 Fusionsproteins aus *E. coli* Lysat über Glutathion-Agarose.**  
**A.** Um die Reinigung zu Verfolgen wurden auf einem Coomassie-gefärbten SDS-Gel Aliquots der Reinigungsfractionen wie folgt aufgetragen: 1, Lysat, 2, Glutathion (GSH)-Agarose Überstand, 3-5, GSH-Agarose Waschfraktionen, 6-8 GSH-Agarose Eluat, 9, Marker. **B.** Im Westernblot einer Minipräparation mit einem anti-GST-Antikörper zeigt sich nur ein immunreaktives Protein mit dem zu erwartenden Molekulargewichtes von 70kD: 1,2, Lysat, 2, GSH-Agarose Überstand, 4-6, GSH-Agarose Waschfraktionen, 7, GSH-Agarose Eluat, 8 Marker.



**Abb. 23: Westernblot der gereinigten GRSF1-Proteine mit und ohne Thrombin-Verdau.** Die über Glutathion (GSH)-Agarose angereicherten Glutathion-S-Transferase (GST)-gekoppelten Proteine wurden durch einen Thrombin-Verdau von der GST-Fraktion befreit. Anschließend wurde das freie GST-Peptid durch nochmaliges Inkubieren mit GSH-Agarose an diese gebunden. Der Überstand wurde konzentriert, mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Westernblot mit anti-GST-Antikörper (A) oder einem anti-GRSF1-Antikörper (B) nachgewiesen. Aufgetragen wurden jeweils 3 µg Protein. Das Molekulargewicht der GST-markierten Proteine K6-GRSF1 und mGRSF1 belief sich auf 70 kDa bzw. 79 kDa, das der Proteine ohne GST auf 45 kDa bzw. 53 kDa. Freie Glutathion-S-Transferase hat ein Molekulargewicht von etwa 29 kDa.

#### 4.2.3 Analyse von Protein-RNA-Interaktion in RNA-Gelshift-Experimenten

RNA-Gelshift-Experimente dienen wie DNA-Gelshift-Experimente der *in vitro* Analyse von Protein-Nukleinsäure-Interaktion. Der Unterschied besteht lediglich darin, dass hier markierte RNA als Sonde dient. Wie beim DNA-Gelshift-Assay sollte hier eine nicht-radioaktive Methode zum Einsatz kommen. Im Gegensatz zum Gelshift-Assay mit DNA-Sonden existierte für den RNA-Gelshift kaum ein geeignetes System mit nicht-radioaktiv markierten Sonden. Aus diesem Grunde habe ich versucht, im Rahmen dieser Arbeit eine Methode zu etablieren, die es gestattet, spezifisch Protein-RNA-Interaktionen mit nicht-radioaktiven RNA-Sonden zu analysieren. Nach *in vitro* Transkription der Sonden in Gegenwart einer geringen Menge an Biotin-UTP, Reinigung der RNA-Produkte und Überprüfen der RNA-Integrität in einem denaturierenden Harnstoff-Gel wurden die nun mit Biotin-markierten RNA-Sonden im Gelshift-Assay eingesetzt. Der Nachweis der Protein-RNA-Komplexe erfolgte nach elektrophoretischer Trennung und Blotten auf eine Membran mittels einer Streptavidin-gekoppelten Peroxidase.

### **Überprüfen der Spezifität der Protein-RNA-Interaktionen**

Um die Interaktionen von GRSF1 mit der 5'-UTR der phGPx-mRNA zu analysieren, wurden RNA-Gelshift-Assays durchgeführt. Für diese Experimente wurde zunächst gereinigtes, rekombinantes GST-K6-GRSF1 eingesetzt. Im RNA-Gelshift war dieses GRSF1-Fusionsprotein in der Lage einen Protein-RNA-Komplex mit der phGPx 5'-UTR herauszubilden, wohingegen gereinigte GST oder BSA dazu nicht befähigt waren (Abb. 24). Zur Analyse der Spezifität dieses Protein-RNA-Komplexes wurde eine nicht-verwandte Sonde (18S-RNA) mit unterschiedlichen Mengen an GST-K6-GRSF1 inkubiert. Die markierte 18S-RNA war nicht in der Lage, einen Komplex mit GRSF1 zu bilden (Abb. 24). Darüber hinaus war ein 40-facher molarer Überschuss an unmarkierter 18S-RNA im kompetitiven RNA-Gelshift nicht in der Lage, den Protein-RNA-Komplex von GRSF1 mit der markierten Sonde für die phGPx-5'-UTR aufzulösen. Im Gegensatz dazu verhinderte die Zugabe der unmarkierten Sonde der phGPx-5'-UTR das Herausbilden des Protein-RNA-Komplexes (Abb. 24).

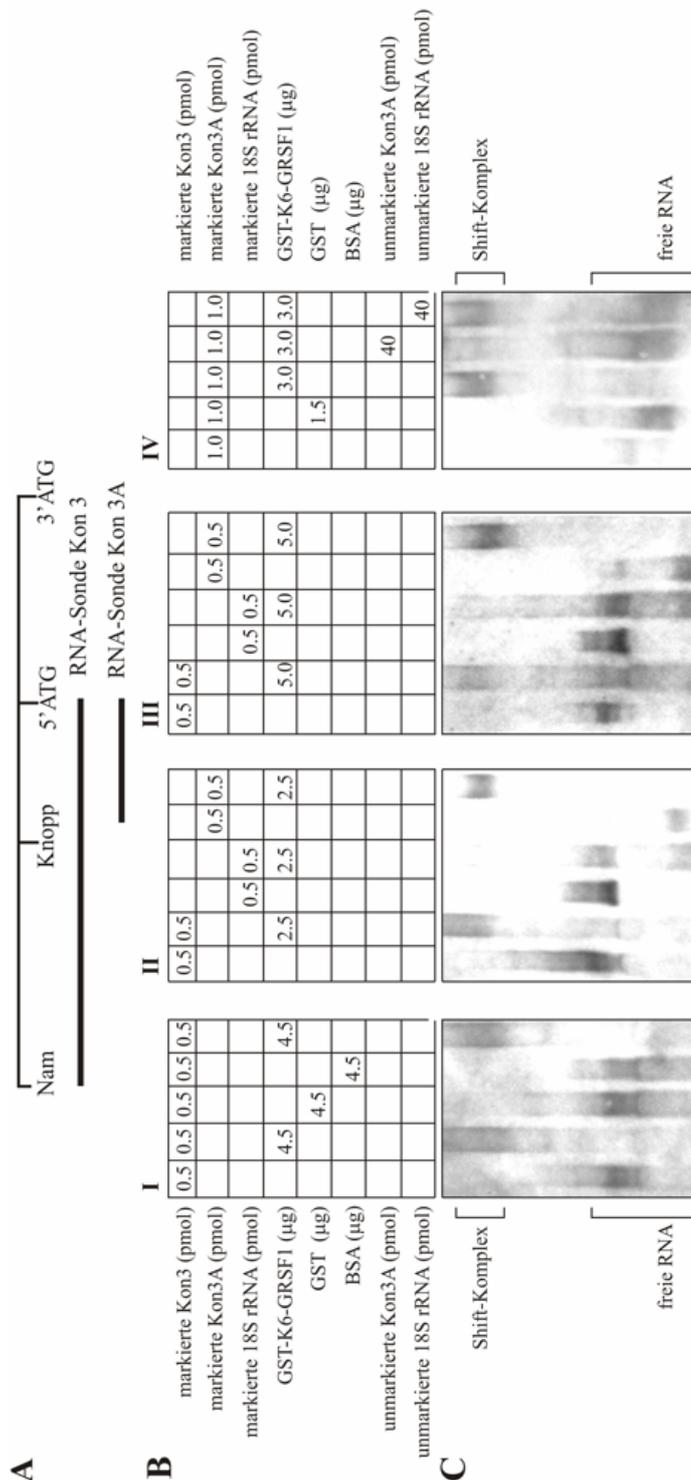


Abb. 24: RNA-Gelshift-Assays mit Sequenzen der 5'-untranslatierten Region der phGPx.

A. Dargestellt sind die Lage der Sonden Kon3 und Kon3A in der 5'-flankierenden Region des phGPx-Gens. Daneben sind zwei Transkriptionsstarts (Knopp et al., 1999; Nam et al., 1997) der mitochondrialen phGPx eingezeichnet. B. Zusammensetzung der Gelshift-Reaktionen. C. Chemilumineszenzsignale. B I / C I. Die Biotin-markierten Sonden wurden mit den angegebenen Mengen GST-K6-GRSF1, GST oder BSA inkubiert. Nur mit GST-K6-GRSF1 bildet sich an der Sonde Kon3 ein zur freien Sonde verschobener Shift-Komplex. B II / C II und B III / C III. Die Sonde Kon3, Kon3A und die nicht verwandte Sonde der 18S rRNA wurden mit unterschiedlichen Mengen an GST-K6-GRSF1 inkubiert. Nur mit den Sonden Kon3 und Kon3A bildet sich ein Shift-Komplex. B IV und C IV. Kompetitive RNA-Gelshifts an der Sonde Kon3A in Gegenwart von molaren Überschüssen der unmarkierten Sonden Kon3A und 18S rRNA zeigten, dass nur ein molarer Überschuss der spezifischen Sonde Kon3A den Shift kompetieren kann nicht aber der unspezifischen Sonde 18S rRNA.

### **Charakterisierung derjenigen RNA-Sequenz, welche die Protein-RNA-Interaktion vermittelt**

Nachdem die Spezifität der Protein-RNA-Interaktion zwischen GRSF1 und der 5'-UTR der phGPx *in vitro* bestätigt werden konnte, sollte darauf aufbauend untersucht werden, welche Sequenzen innerhalb der phGPx-5'-UTR mit GRSF1 interagieren. Zu diesem Zweck wurden trunkierte Sonden der phGPx-5'-UTR entworfen (Abb. 25).

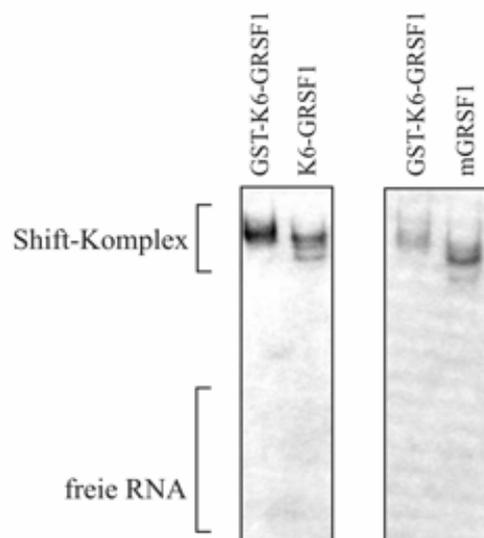
Die stromaufwärts gelegenen Sonden Kon3C und Kon3B interagierten nicht mit GST-K6-GRSF1 (Abb. 26). Nur die Sequenz unmittelbar vor dem 5'ATG (Sonde Kon3A) war in der Lage ein deutliches Shift-Signal zu erzeugen. Daraufhin wurden sukzessiv verkürzte Sonden (Kon3A1, A3, D1 und A4-A6) sowie Sonden mit internen Deletionen (Kon3A2 und Kon3A7) synthetisiert und auf ihre Bindungseigenschaften mit GST-K6-GRSF1 untersucht (Abb. 26 B-D). Schließlich war es mit der Sonde Kon3A3 möglich, die RNA-Sequenz, die für die Interaktion mit GRSF1 notwendig ist, auf eine Region von 37 Nukleotiden einzugrenzen. Keine der kürzeren Sonden konnte das Herausbilden eines Protein-RNA-Komplexes vermitteln. Die kurzen RNA-Sonden wurden so synthetisiert, dass während der *in vitro* Transkription ein bis zwei Biotin-Markierungen pro RNA-Molekül eingefügt wurden. Diese Biotin-Markierungen führen möglicherweise dazu, dass unter anderem das Herausbilden von RNA-Sekundärstrukturen gestört wird, die für eine Erkennung durch GRSF1 erforderlich sind.

Bei verkürzten Sonden, die sich der minimalen cis-regulatorischen Sequenz annähern, kommt daher der störende Einfluss dieser Markierung stärker zum tragen. Sollte es notwendig werden, die cis-regulatorische RNA-Sequenz auf weniger als 37 Nukleotide einzugrenzen, könnte es vonnöten sein, die Methode der Sonden-Markierung so zu ändern oder zu modifizieren, dass ihr Einfluss auf die Protein-RNA-Interaktion auf ein zu vernachlässigendes Niveau minimiert wird. Zusammenfassend lassen sich die Daten dahingehend interpretieren, dass das GST-Fusionsprotein K6-GRSF1 spezifisch mit einem RNA-Motiv innerhalb einer 37-Nukleotidsequenz in der 5'-untranslatierten Region der phGPx-mRNA interagiert.



### Beide GRSF1-Isoformen interagieren mit der 5'-UTR der phGPx-mRNA

Zur weiteren Analyse der Interaktion von GRSF1 an der 5'-UTR der phGPx stellte sich die Frage, ob die gezeigte Protein-RNA-Interaktion spezifisch für die im Hefe-Drei-Hybrid System identifizierte GRSF1-Isoform K6-GRSF1 ist, oder ob die Isoform mGRSF1 ebenfalls in der Lage ist, an die phGPx-mRNA zu binden. Das gereinigte rekombinante Protein der Isoform mGRSF1 bildete wie die in dieser Arbeit identifizierte alternative Spleißform (K6-GRSF1) im Gelshift einen Komplex mit der Sonde Kon3A (Abb. 27). Darüber hinaus war auch das Protein K6-GRSF1 in der Lage, ohne die GST-Markierung mit der RNA-Sonde Kon3A zu interagieren (Abb. 27). Die eingangs gestellte Frage lässt sich also damit beantworten, dass beide GRSF1-Isoformen mit der phGPx-5'-UTR unabhängig vom GST-Anteil interagieren können. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Tatsache, dass beide GRSF1-Isoformen sehr mit einander verwandt sind. Beide Isoformen sind hinsichtlich der Aminosäuresequenz ihrer RNA-Erkennungsmotive abgesehen von der Mutation von Threonin zu Arginin an Position 254 in RNA-Erkennungsmotiv 2 identisch (Abb. 20). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Spezifität der Protein-RNA-Interaktion mit der phGPx-mRNA unabhängig von der in beiden GRSF1-Isoformen unterschiedlichen N-terminalen Aminosäuresequenz ist.



**Abb. 27:** RNA-Gelshift-Assays an der Sonde Kon3A.

Das rekombinante Protein K6-GRSF1 bindet wie das Glutathion-S-Transferase-Addukt GST-K6-GRSF1 an die Sonde Kon3A. Ebenso vermittelt rekombinanter mGRSF1 ein Gelshift-Signal mit der Sonde Kon3A.

#### **4.2.4 Quantifizierung der Gewebeverteilung von GRSF1- und phGPx-Isoformen mittels Real-Time-PCR**

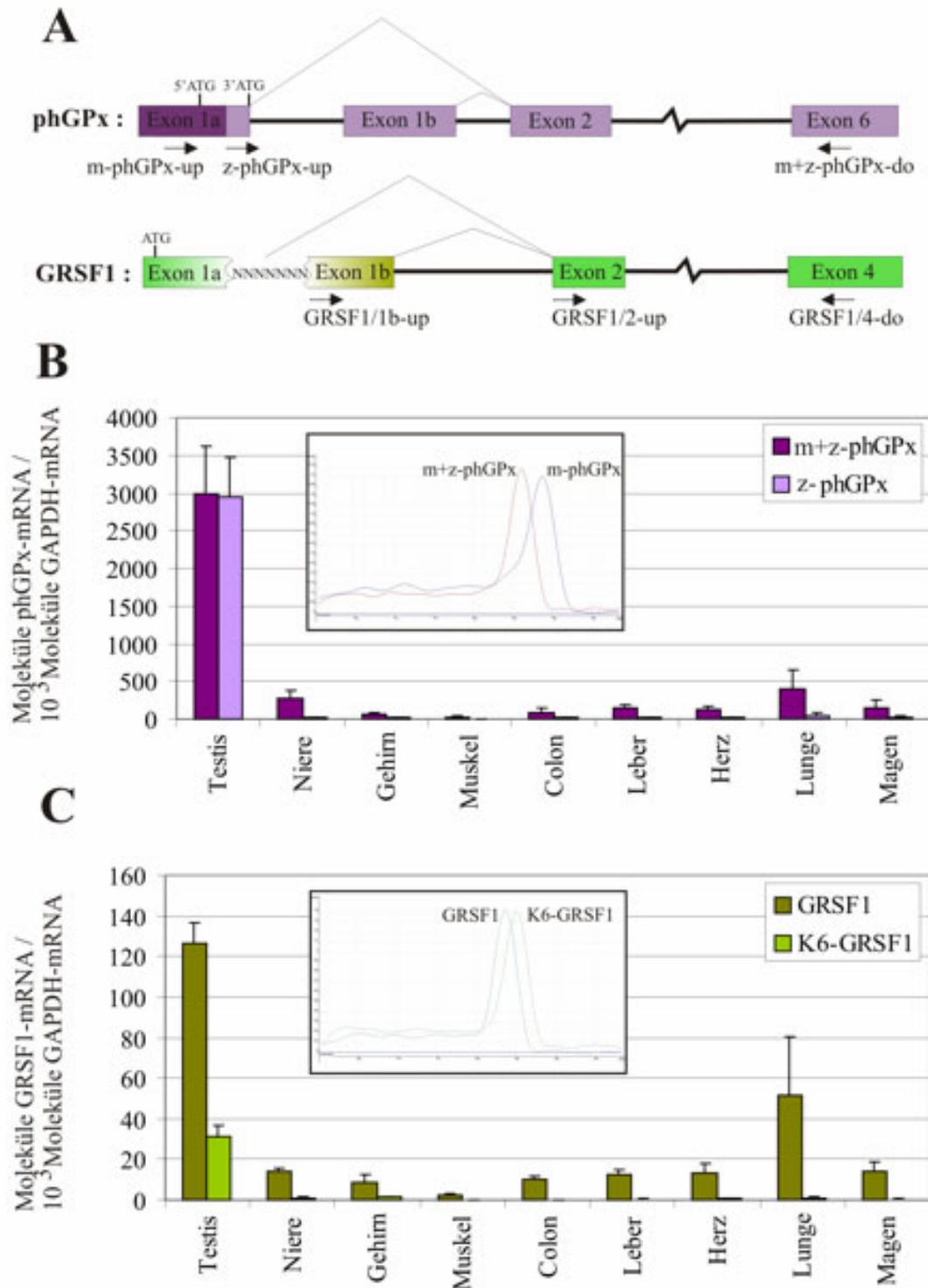
Die Gewebeverteilung des Guanin-reiche Sequenz bindenden Faktors 1 ist bisher in keiner Arbeit weder auf Transkript- noch auf Proteinebene untersucht worden. Im Gegensatz dazu sind zahlreiche Untersuchungen zur Gewebeverteilung der verschiedenen Transkripte der phGPx durchgeführt worden. Vom Gen der phGPx werden nach derzeitigem Kenntnisstand drei Protein-Isoformen gebildet. Diese zeigen sowohl hinsichtlich ihrer zeitlichen als auch räumlichen Gewebeverteilung unterschiedliche Expressionsmuster. Während die zytosolische Isoform eine ubiquitäre Verteilung zeigt, wurde für die mitochondrialen Isoform zunächst anhand von Northern-Blot-Analysen eine ausschließlich Testis-spezifische Expression vermutet (Knopp et al., 1999). Durch Steigerung der Sensitivität durch halb-quantitative RT-PCR konnte aber vor kurzem gezeigt werden, dass sich Transkripte der mitochondrialen phGPx in allen murinen Geweben nachweisen lassen (Borchert A, nicht publiziert). Hierbei bestätigte sich jedoch die deutliche Hochexpression dieser Isoform im Testis. Ähnlich verhielt es sich mit der Gewebeverteilung der snGPx. Auch hier wurde aufgrund von Northern-Blot-Analysen von einer ausschließlich Testis-spezifischen Expression gesprochen. Auch hier konnte aber später durch Steigerung der Nachweis-Sensitivität gezeigt werden, dass die snGPx sowohl aus Protein- als auch auf Transkriptebene neben dem Testis in speziellen Zellen der Niere zu finden ist (Borchert et al., 2003).

Aufgrund der fehlenden Daten zur Expressionsverteilung von GRSF1 und der relativ ungenauen Angaben zur Expression der phGPx-Isoformen sollte eine exakte vergleichende Quantifizierung der GRSF1- und phGPx-Transkripte in ihrer Gewebeverteilung durchgeführt werden. Eine sehr moderne Methode zur Quantifizierung von Transkripten ist die Real-Time-RT-PCR. Die Gen-spezifischen Primer wurden hierbei so gewählt, dass sie für die phGPx spezifisch die mitochondriale phGPx-Isoform (m-phGPx) beziehungsweise das gemeinsame Transkript der zytosolischen und der mitochondrialen Isoform (m+z-phGPx) erfassten. Für GRSF1 wurden die Primer so gewählt, dass sie entweder die alternative Spleißform K6-GRSF1 oder den allen GRSF1-Spleißformen gemeinen Bereich der mRNA erfassten.

#### **GRSF1- und phGPx-Isoformen in Organen der Maus**

Die Daten aus der Quantifizierung (Abb. 28) der mitochondrialen phGPx (m-phGPx) und der zytosolischen (z-phGPx) bestätigten das Bild, welches zuvor in der halbquantitativen RT-PCR gezeigt worden war (Borchert, nicht publiziert). Die zytosolische phGPx-Isoform lässt sich in allen Geweben auf moderatem Niveau nachweisen. Im Testis jedoch besteht die

Summe der phGPx-Transkripte dominant aus denen der mitochondrialen Isoform. Neben dieser erheblichen Hochexpression der mitochondrialen Isoform im Testis findet sich dieses Transkript wenngleich auf deutlich niedrigerem Niveau in allen anderen untersuchten Geweben. Interessanterweise ergab die Gewebeverteilung für GRSF1 ein ähnliches Muster. Während sich die Summe der GRSF1-Isoformen in allen untersuchten Geweben auf relativ niedrigem Niveau nachweisen lässt (etwa um den Faktor 20 geringer als die beiden phGPx-Isoformen), kommt es spezifisch im Testis zu einer sechsfachen Hochexpression. Dabei rekrutiert sich die Summe der GRSF1-Transkripte hier zu etwa 25 % aus der im Hefe-Drei-Hybrid-Screen identifizierten alternativen Form K6-GRSF1. In allen anderen untersuchten Geweben spielt die Isoform K6-GRSF1 eine vergleichsweise untergeordnete Rolle. Aufgrund dieser Real-Time-PCR-Daten lässt sich daher sagen, dass GRSF1 auf mRNA-Ebene ein schwach exprimierter aber ubiquitär vorliegender Faktor ist, welcher wie die phGPx eine deutliche Testis-spezifische Hochexpression aufweist. Es wird also offensichtlich, dass GRSF1 und die mitochondriale Form der phGPx einer ähnlichen Gewebe-spezifischen Regulation unterliegen.



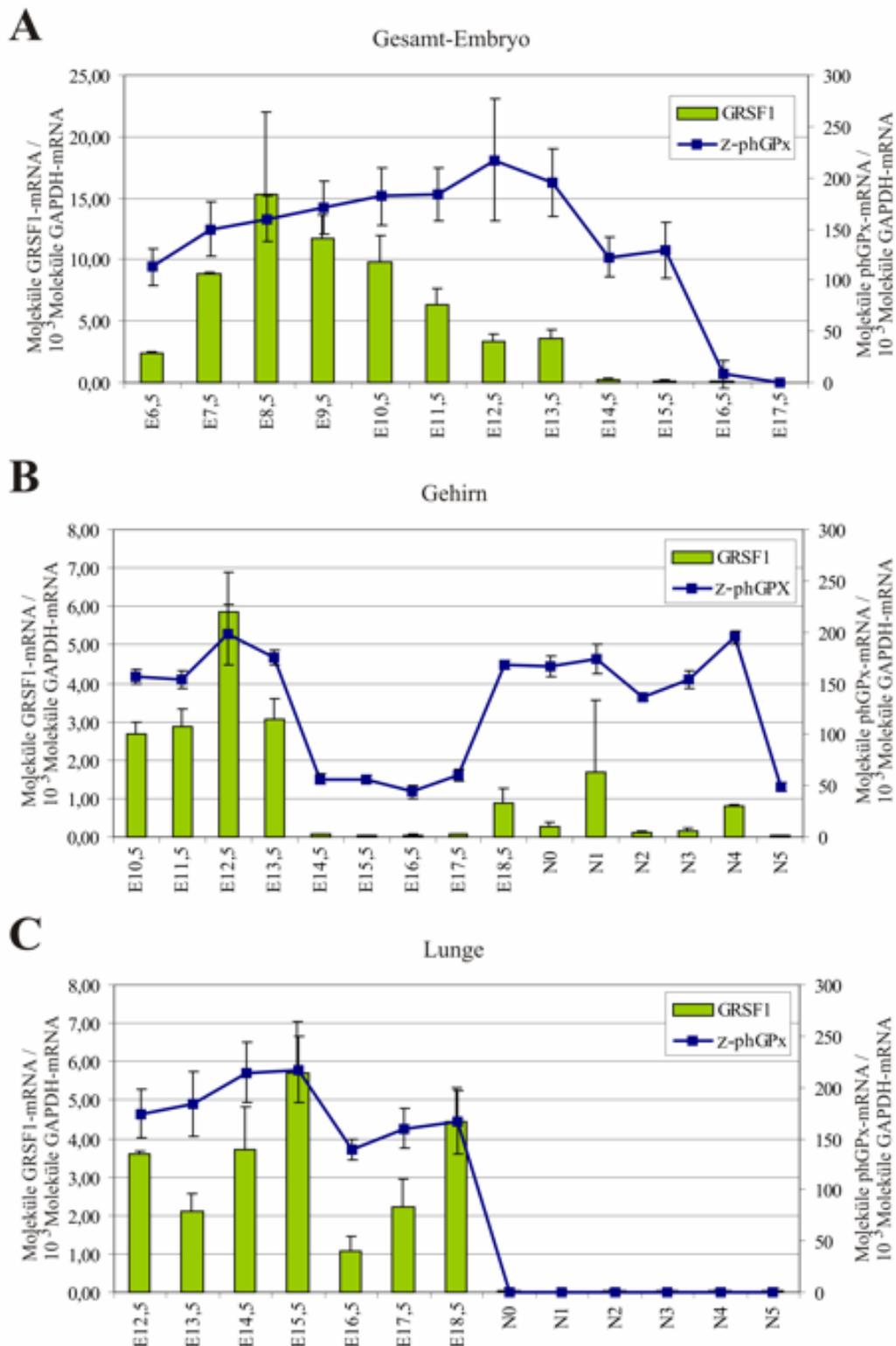
**Abb. 28: Quantifizierung von phGPx- und GRSF1-Transkripten mittels Real-Time-PCR**  
 Nach RNA-Präparation und anschließender Reverser Transkription wurde die resultierende cDNA mit Gen-spezifischen Primern in der Real-Time-PCR vervielfältigt und quantifiziert. Die relativen Transkriptmengen wurden auf die der GAPDH als „housekeeping“ Gen normalisiert. Dargestellt ist A. die Lage der Gen-spezifischen Primer im Gen der phGPx bzw. GRSF1; B. die relativen Transkriptmengen der mitochondrialen phGPx (m-phGPx; Primer m-phGPx-up/m+z-phGPx-do) und der Summe aus mitochondrialer und zytosolischer Isoform (m+z-phGPx; Primer z-phGPx-up/m+z-phGPx-do), und C. die relativen Transkriptmengen von GRSF1 (Summe der alternativen Spleißformen; Primer GRSF1/2-up/GRSF1/4-do) sowie der im Hefe-Drei-Hybrid-Screen identifizierten Isoform K6-GRSF1 (Primer GRSF1/1b-up/GRSF1/4-do). Die eingesetzten Grafiken stellen exemplarisch die Schmelzkurven der PCR-Produkte zur Verifizierung der Produktspezifität dar.

### **Expression von mitochondrialer phGPx-Isoform und GRSF1 in der Embryogenese der Maus**

In homozygoten phGPx Knockout-Mäusen ist gezeigt worden, dass die phGPx während der Embryogenese eine überlebenswichtige Rolle spielt. Homozygote Knockout-Tiere überlebten den Tag E7,5 nicht (Yant et al., 2003). Dies impliziert eine Schlüsselrolle der phGPx während der Embryogenese. Jüngere Untersuchungen enthüllten ebenfalls für den GRSF1 eine wesentliche Funktion während der Embryogenese (Lickert et al., 2005). Knock-down-Versuche an Maus-Embryonen mit siRNA gegen GRSF1 zeigten eine gestörte Organogenese. Aufgrund dieser vielfältigen Hinweise auf eine Funktion von GRSF1 und phGPx während der Embryogenese wurden die relativen Transkriptmengen beider Proteine während dieses Prozesses vergleichend untersucht. Mit Gen-spezifischen Primern für GRSF1 wurden die relative Transkriptmengen im Gesamtembryo, des Gehirns und der Lunge ermittelt und denen der mitochondrialen phGPx gegenübergestellt.

Die mitochondriale phGPx zeigte während der Embryogenese ein spezifisches, zeitliches Expressionsmuster (Abb. 29). Während sie am Tag E12,5 ein Expressionsmaximum aufweist, sinkt ihr mRNA-Pegel zum Tag E17,5 unter die Nachweisgrenze. Im embryonalen Gehirn fällt die relative mRNA-Menge der mitochondrialen phGPx während der Tage E14,5 bis E17,5 auf etwa 30 % ab. Zur Geburt (N0) steigt die mRNA-Menge wieder auf das Niveau von vor Tag E14,5, um am fünften Tag nach der Geburt wieder auf etwa 30 % abzusinken. In der embryonalen Lunge ist die mitochondriale phGPx auf gleich bleibendem Niveau exprimiert. Dahingegen sind nach der Geburt bis zum Tage 5 keine Transkripte der mitochondrialen phGPx PCR-technisch mehr nachweisbar.

Entsprechend dieser Daten wurde die Expression von GRSF1 untersucht (Abb. 29). Insgesamt muss zunächst bemerkt werden, dass das durchschnittliche Expressionsniveau von GRSF1 um mehr als den Faktor 40 niedriger ausfällt als das der mitochondrialen phGPx. Im Gesamtembryo zeigte sich für GRSF1 ein Expressionsmaximum am Tag E8,5 der Embryogenese. Danach sinkt das Expressionsniveau von GRSF1-Transkripten sukzessive bis zur Geburt auf unter die Nachweisgrenze. Im embryonalen Gehirn zeigt sich am Tag E12,5 ein Expressionsmaximum. Danach ist während der Tage E14,5 bis E18,5 keine GRSF1-mRNA nachweisbar. Zur Geburt und während der ersten post-natalen Tage (bis N5) steigt die Expression wieder an, erreicht aber zunächst nicht die Höhe während der Embryogenese (E10,5 bis E13,5). Die embryonale Lunge weist ein gleich bleibendes relatives Niveau an GRSF1-Transkripten auf, wohingegen in der Lunge nach der Geburt bis zum post-natalen Tag N5 keine Transkripte nachweisbar sind.



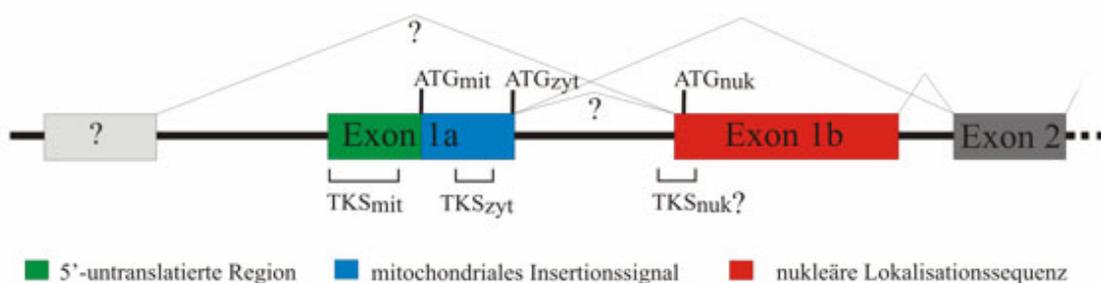
**Abb. 29:** Relative Quantifizierung der Transkripte von GRSF1 und mitochondrialer phGPx während der Embryogenese der Maus

Nach RNA-Präparation aus Gesamt-Embryo (A) bzw. Gehirn (B) und Lunge (C) verschiedener Embryonalstadien und anschließender Reverser Transkription wurde die resultierende cDNA mit Gen-spezifischen Primern in der Real-Time-PCR vervielfältigt und quantifiziert. Die relativen Transkriptmengen wurden auf die der GAPDH als „housekeeping“ Gen normalisiert. Mit grünen Säulen sind die auf GAPDH bezogenen, relativen GRSF1-Transkriptmengen dargestellt. Die relativen Transkriptmengen der mitochondrialen phGPx-Isoform (m-phGPx) sind durch eine blaue Linie gekennzeichnet.

## 5 Diskussion

### 5.1 Protein-DNA-Interaktionen am Promotor des murinen phGPx-Gens

Das Gen der phGPx kodiert für drei Proteine, welche sich hinsichtlich ihrer N-terminalen Region, ihrer subzellulären Lokalisation und ihres Gewebe-spezifischen Expressionsmusters unterscheiden. Der N-Terminus der zytosolischen sowie der mitochondrialen Isoform werden durch das Exon 1a kodiert, wobei alternative Startkodons verwendet werden, die im gleichen Leserahmen liegen. Vom alternativen Exon 1b hingegen wird der N-Terminus der nukleären Isoform kodiert. Für die mitochondriale und die zytosolische Isoform sind zudem für Ratte, Maus und den Menschen unterschiedliche Transkriptionsstarts beschrieben, welche ein langes Testis-spezifisches Primärtranskript sowie ein kurzes Transkript ergeben, dass vor allem in somatischer Zellen vorkommt (Esworthy et al., 1994; Knopp et al., 1999; Nam et al., 1997; Pushpa-Rekha et al., 1995). Das lange Transkript enthält zwei im gleichen Leserahmen liegende Startkodons (ATGs), sowie die für das mitochondriale Insertionssignal kodierende Sequenz, die zwischen diesen beiden ATGs lokalisiert ist. Der kurze Messenger hingegen enthält nur das 3'-ATG, welches als Startkodon für die zytosolische Isoform der phGPx fungiert. Das 5'-ATG und die mitochondriale Insertionssequenz fehlt. Neben diesen beiden Isoformen der phGPx existiert eine dritte so genannte nukleäre Isoform, deren N-Terminus eine Arginin-reiche nukleäre Lokalisationssequenz enthält. Mehrere molekulare Mechanismen, die zur Expression der unterschiedlichen Isoformen führen, werden derzeit in der Literatur diskutiert (Abb. 30). Vorgeschlagen werden sowohl alternatives Spleißen eines allen Isoformen gemeinen Messenger-Vorläufers (Borchert et al., 2003; Puglisi et al., 2003), sowie die Bildung unterschiedlicher Primärtranskripte, die von separaten Promotoren gesteuert werden (Maiorino et al., 2003; Moreno et al., 2003; Tramer et al., 2004).



**Abb. 30: Unterschiedliche Mechanismen können für die Vielfalt der phGPx-Isoformen verantwortlich sein.**

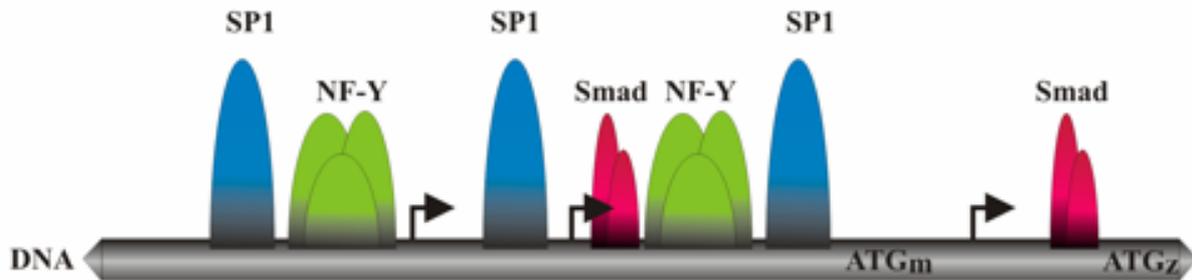
Sowohl alternatives Spleißen eines gemeinsamen mRNA-Vorläufers als auch alternative Transkriptionsstarts in unabhängigen Promotoren können zu den unterschiedlichen Isoformen führen. Im 5'-gelegenen Bereich des phGPx-Gens befinden sich in zwei alternativen Exons drei alternative Startkodone (ATGs) für die mitochondriale (mit), die zytosolische (zyt) und die nukleäre (nuk) Isoform. Des Weiteren existieren für die phGPx-Isoformen mehrere unterschiedliche Fenster für Transkriptionsstarts (TKS).

Neben ihrer subzellulären Lokalisation unterscheiden sich die phGPx-Isoformen auch hinsichtlich ihrer Gewebeverteilung. Während sich die zytosolische phGPx auf mRNA- und auf Proteinebene in allen Geweben nachweisen lässt, zeigen die mitochondriale und nukleäre phGPx eine Stadien-spezifische Expression, vor allem in bestimmten testikulären Zelltypen. Vor der Pubertät jedoch lassen sich nur geringe Mengen an phGPx im Testis nachweisen. Hingegen weist der postpubertäre Testis die höchste phGPx-Expression auf, die bisher in Säugergeweben gemessen wurde. Diese ist um zwei Größenordnungen höher als die zerebrale bzw. hepatische Expression des Enzyms (Maiorino *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Zusammenhänge wurde eine direkte hormonelle Regulation der phGPx-Expression durch Testosteron vermutet (Brigelius-Flohe *et al.*, 1994; Roveri *et al.*, 1992), was sich jedoch bislang nicht nachweisen ließ. Vielmehr scheint die Expression der phGPx nicht direkt von Testosteron gesteuert zu werden, sondern beruht auf einer Stadien-spezifischen Expression in spermatogenen Zellen, die unter dem Einfluss von durch Leydig-Zellen gebildetem Testosteron zu stehen scheinen (Maiorino *et al.*, 1998). Besonders bemerkenswert hierbei ist die hohe mRNA-Expression der phGPx in runden Spermatiden, die während des Überganges von runden zu elongierten Spermatiden abrupt abfällt (Maiorino *et al.*, 1998; Nam *et al.*, 1998). Untersuchungen auf Protein-Ebene zeigen jedoch, dass das phGPx-Protein intensiver in elongierten Spermatiden und Spermatozoen vorhanden ist (Tramer *et al.*, 2002). Das bedeutet, dass die phGPx-Produktion aufrechterhalten wird, lange nachdem die Transkription abgeschaltet wurde (Tramer *et al.*, 2002). Die stärkste Expression der nukleären phGPx findet sich in post-meiotischen Spermatiden (Puglisi *et al.*, 2003). Auch hier liegen die molekularen Mechanismen, welche dieses komplexe Expressionsmuster der phGPx-Isoformen hervorrufen, noch weitestgehend im Dunkeln. Fortschritte im Verständnis der komplexen Regulationsprozesse konnten kürzlich durch die Identifizierung funktioneller Protein-DNA-Interaktionen (Sp1, SREBP, CREM $\tau$ ) im Intron 1 des phGPx-Gens erzielt werden (Borchert *et al.*, 2003; Tramer *et al.*, 2004).

Der erste Schritt vom Gen zum fertigen Protein ist die Transkription. Diese steht unter anderem unter dem Einfluss von Protein-DNA-Interaktionen im Promotor eines Gens. Für die phGPx ist diesbezüglich wenig bekannt. Die einzige Information hierzu ist die Beschreibung einer funktionellen CCAAT-Box im Promotor des humanen phGPx-Gens, welche den Nukleären Faktor Y (NF-Y) bindet (Huang *et al.*, 1999). Um dieses Bild zu vervollständigen, wurde in dieser Arbeit eine systematische Analyse des proximalen Promotors der murinen phGPx hinsichtlich seiner cis- und trans-regulatorischen Elemente durchgeführt.

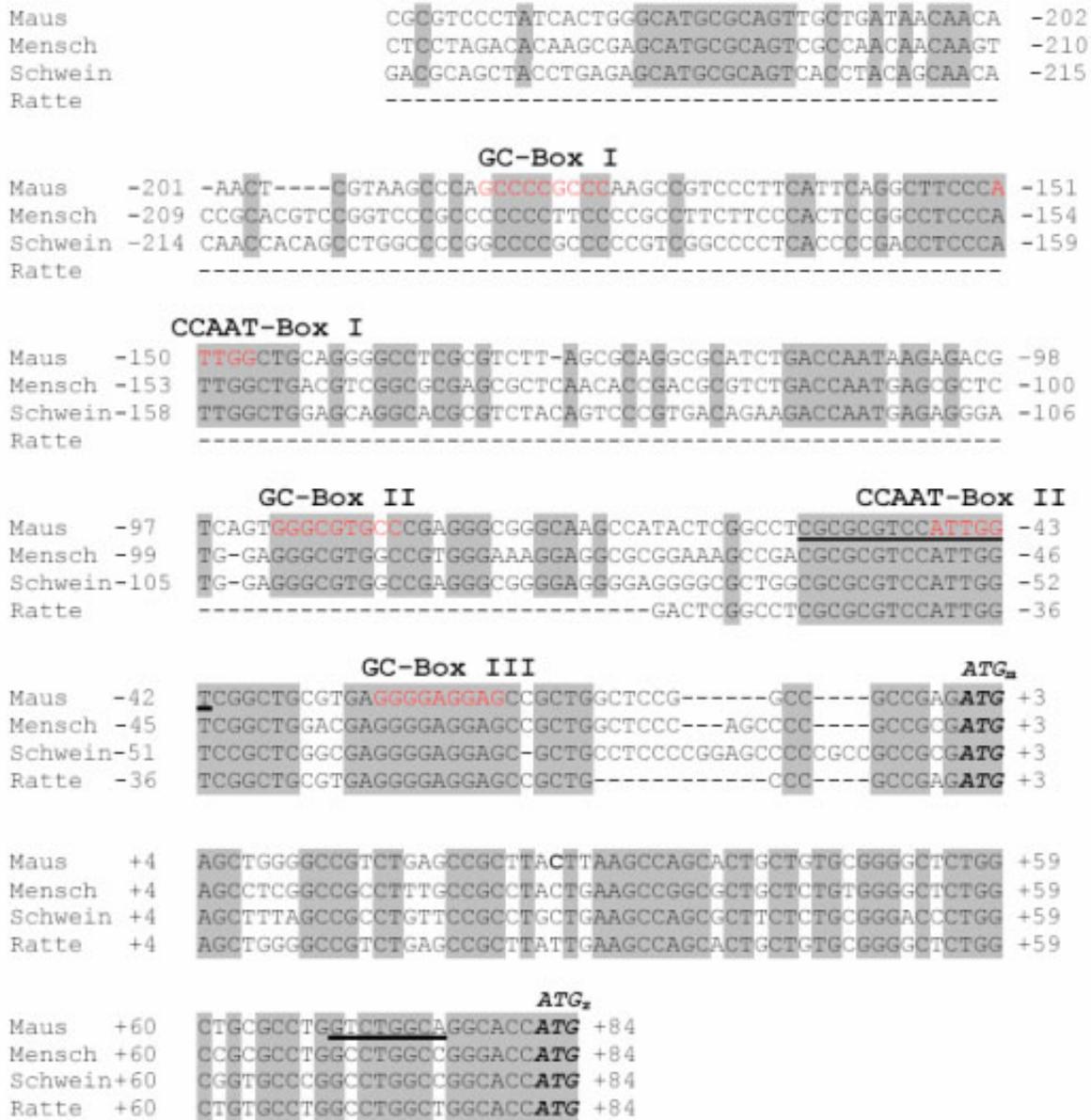
Im herkömmlichen Sinne wird jener Bereich eines Gens als Promotor bezeichnet, der stromaufwärts vom Transkriptionstart liegt und regulatorisch wirksame Sequenzen enthält. Es mehren sich jedoch die Hinweise darauf, dass funktionelle cis-regulatorische Elemente auch in intronischen bzw. exonischen Sequenzen vorkommen (Farina et al., 1999; Frederickson et al., 1989; Wandersee et al., 1996; Zhao et al., 2003). Die 5'-flankierende Region der phGPx ist exemplarisch für die eines Haushaltsgens, welche GC-reich (CpG-Insel von -356bp bis +36bp vom mitochondrialen Translationsstart) ist (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>, 8.10.2004) und sich durch das Fehlen einer TATA-Box sowie eines Initiator-Elements (Inr) auszeichnet. Darüber hinaus enthält sie eine Vielzahl von potentiellen Transkriptionsstarts, was häufig für TATA- und Inr-lose Promotoren beschrieben wurde (Geng und Johnson, 1993). Aufgrund dieser Befunde wurde der Einfachheit halber für diese Arbeit der am weitesten stromaufwärts gelegene, Testis-spezifische Transkriptionsstart als +1 definiert. Daraus ergibt sich, dass der Großteil der untersuchten Promotorsequenz im Bereich zwischen -100 bp bis + 228 bp im transkribierten Bereich liegt. Würde man einen der weiter stromabwärts gelegenen somatischen Transkriptionsstarts mit +1 bezeichnen, befände sich der größte Teil der untersuchten Region entsprechend der klassischen Promotordefinition im nicht-transkribierten Bereich des phGPx Gens. Die in dieser Studie untersuchten Sequenzen liegen demnach sowohl im 5'-flankierenden Bereich des phGPx Gens, in der 5'-UTR der entsprechenden mRNA als auch im kodierenden Bereich des ersten Exons. Die Sequenz zwischen -100 bp und dem mitochondrialen Translationsstart bei +226 bp, vermittelte im Reporter-gen-Assay in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293-Zellen) die höchste Promotoraktivität und wurde deshalb als der basale Promotor definiert. Da demnach die Faktoren, welche für eine Promotoraktivierung notwendig sind, in dieser Zelllinie vorhanden sind, wurden nukleäre Extrakte von HEK293-Zellen verwendet, um diejenigen trans-regulatorischen Faktoren zu identifizieren, welche an entsprechenden cis-regulatorischen Elementen im proximalen Promotor der phGPx binden. Der proximale Promotor enthält drei GC-Boxen (inverse GC-Box I, „normale“ GC-Box II und GGGAGG-Hexamer der GC-Box III) sowie zwei inverse CCAAT-Boxen. Beide DNA-Motive können mit einer Vielzahl von Protein-Faktoren interagieren. So besteht beispielsweise die Familie von GC/GT-Box-bindenden Proteinen aus 24 Mitgliedern, wovon allein neun zu den Sp-Faktoren (Zhao und Meng, 2005) und 15 zu den „Krüppel-like“ Faktoren gehören (Bouwman und Philipsen, 2002). Für das CCAAT-Motiv sind unter anderem Proteine wie C/EBP (CCAAT-Enhancer Bindendes Protein), CTF (CCAAT-Transkriptionsfaktor), Y-Box-Faktoren, CDP (CCAAT-Displacement-Protein) und schließlich der Nukleäre Faktor Y (NF-Y) beschrieben

(Mantovani, 1998). Obwohl sowohl GC-reiche Sequenzen als auch die CCAAT-Box mit verschiedenen Proteinen interagieren können, ist es in dieser Arbeit gelungen, spezifische Faktoren zu identifizieren, die an die cis-regulatorischen Elemente binden. Es handelt sich um das GC-Box-bindende Stimulierende Protein 1 (Sp1) und den Nukleären Faktor Y (NF-Y), welcher mit dem CCAAT-Motiv interagiert (Abb. 31).



**Abb. 31: Schematische Darstellung der Protein-DNA-Interaktionen am basalen Promotor der pHGPx**  
**In der stromabwärts vom mitochondrialen Translationsstart (ATG<sub>m</sub>) gelegenen Region wurden die Faktoren Sp1 und NF-Y und Proteine der Smad-Familie identifiziert. Zwischen dem mitochondrialen (ATG<sub>m</sub>) und zytosolischen ATG (ATG<sub>z</sub>) binden Proteine der Smad-Familie von Transkriptionsfaktoren.**

Obwohl die GC-Box III nicht das klassische Sp1-Bindemotiv (GGGGCGGGG) aufweist, bindet hier auch der Faktor Sp1. Dass Sp1 ebenfalls mit einem GGGAGG-Hexamer interagiert ist nicht überraschend, da auch die Promotoren der humanen Rezeptor-Gene für Insulin, das Low Density Lipoprotein und des humanen Wachstumshormons ein solches funktionelles Motiv enthalten, welches von Sp1 erkannt und gebunden wird (Dawson et al., 1988; Lee et al., 1992; Lemaigre et al., 1989). Betont werden sollte an dieser Stelle, dass die Relevanz dieser Protein-DNA-Interaktionen für das pHGPx-Gen auch *in vivo* mittels der Chromatin-Immunopräzipitation bestätigt werden konnte. Neben den beiden Faktoren Sp1 und NF-Y gibt es jedoch Hinweise auf weitere Protein-DNA-Interaktionen im proximalen Promotorbereich. Darüber hinaus wurde die potentiell translatierte Region zwischen den beiden alternativen Translationsstarts der mitochondrialen und zytosolischen pHGPx-Isoform untersucht. Diese Sequenz hatte in Reporter-Gen-Assays im Vergleich zur Region von -100 bp bis zum zytosolischen Translationsstart eine Verdopplung der Reporter-Genaktivität bewirkt. Die *in silico* Analyse der entsprechenden Sequenzen gegen die TransFac-Datenbank (Quandt et al., 1995) ergab eine Vielzahl von bekannten Bindungssequenzen, deren Identität in kompetitiven Gelshift-Assays jedoch nicht bestätigt werden konnte. Schließlich gelang es aber, die noch nicht-identifizierten Protein-DNA-Komplexe sowohl in der untranslatierten Region als auch in der Region zwischen den ATGs aufzuklären. Überraschender Weise binden an beide DNA-Elemente Transkriptionsfaktoren der Smad-Familie.



**Abb. 32:** Vergleich der untersuchten Promotorregion der murinen phGPx mit den korrespondierenden genomischen Sequenzen von Mensch, Schwein und Ratte. Für die bessere Vergleichbarkeit wurde der Translationsstart der m-phGPx (ATG<sub>m</sub>) als +1 definiert. Die cis-regulatorischen Elemente der CCAAT- bzw. GC-Boxen sind rot dargestellt und die konservierten Nukleotide grau hinterlegt. Die mit der CCAAT-Box II überlappende und die zwischen den ATGs gelegene Smad-Bindestelle sind durch Unterstreichung kenntlich gemacht. ATG<sub>z</sub>, Translationsstart der z-phGPx.

Ein Vergleich der untersuchten Promotorsequenz (Abb. 32) zwischen verschiedenen Säugertierspezies zeigt, dass alle identifizierten Elemente zwischen den Spezies Maus, Mensch, Schwein und Ratte (soweit die Sequenzen bekannt sind) in unterschiedlichem Grad konserviert sind. Es wird deutlich, dass insbesondere die CCAAT-Boxen in allen Spezies in Orientierung und Lage zu den Startkodons außerordentlich ähnlich sind, was als Hinweis auf ihre funktionelle Bedeutung für die phGPx-Expression angesehen werden kann. Das hier als

CCAAT-Box I (Abb. 32) bezeichnete Motiv entspricht dem bereits im humanen Promotor beschriebenen Element (Huang et al., 1999).

In den folgenden Abschnitten sollen nun, die identifizierten trans-regulatorischen Faktoren hinsichtlich ihrer Relevanz für die pHGPx-Expression und die Ergebnisse zu den funktionellen Untersuchungen der Faktoren Sp1 und NF-Y diskutiert werden.

### **5.1.1 Funktionelle Wechselwirkungen am Promotor der pHGPx**

Zur Untersuchung der funktionellen Relevanz der identifizierten Proteine Sp1 und NF-Y wurden Reportergen-Assays mit mutierten Reportergen-Konstrukten durchgeführt, an welche die entsprechenden Faktoren nicht mehr banden. Hierbei wurden zwei Reportergen-Konstrukten verwendet, die sich durch das Vorhandensein der Region zwischen dem mitochondrialen und zytosolischen Translationsstart unterschieden. Der Bereich zwischen diesen beiden ATGs führte zu einer Verdopplung der Promotoraktivität.

Die funktionellen Reportergen-Assays ergaben interessanter Weise, dass die GC-Box I, welche den Faktor Sp1 bindet, von größter Bedeutung für beiden Reportergen-Konstrukte ist. Ohne diese Protein-DNA-Interaktion fällt die Promotoraktivität dramatisch ab (Abb. 33 C). Dies steht im Gegensatz zu Untersuchungen am humanen Promotor, welche einer inversen CCAAT-Box, die den Faktor NF-Y bindet, das größte Gewicht für die Expressionsregulation zuwies (Huang et al., 1999). Dieses cis-regulatorische Element ist sowohl in seiner Orientierung als auch in seiner Lage zwischen den beiden Spezies Maus und Mensch konserviert (Abb. 32). Im murinen Promotor konnte dem Element der CCAAT-Box I in beiden Konstrukten zwar ein geringer Anteil an der Reportergenaktivität zugewiesen werden, jedoch war dieser statistisch nicht signifikant (Abb. 33 B). Während sich in diesen Versuchen die beiden Konstrukte in Gegenwart oder Abwesenheit der Sequenz zwischen den ATGs analog verhalten hatten, kam es in der Doppelmutante der GC- und CCAAT-Box I zu deutlichen Unterschieden (Abb. 33 D). Im Konstrukt B1 war bei simultaner Mutation dieser beiden Elemente keine Reportergenaktivität messbar. Dem gegenüber war die Reportergenaktivität der entsprechenden Doppelmutante von Konstrukt C1 im Vergleich zur Einzelmutation der GC-Box I nahezu wieder hergestellt. Diese Ergebnisse können wie folgt interpretiert werden. Die GC-Boxen II und III und die CCAAT-Box II sind ohne die Sequenz zwischen den ATGs und ohne eine funktionelle GC-Box I kaum in der Lage, die Transkription zu initiieren. Dies unterstreicht die Bedeutung der GC-Box I. Daneben ist es auch möglich, dass NF-Y gebunden an CCAAT-Motiv I in Abwesenheit von Sp1 mit den übrigen Faktoren am Promotor so interagiert, dass eine transkriptionelle Aktivierung gestört ist. Weiterhin lassen diese Ergebnisse eine Clusterung der Faktoren am Promotor in Cluster I

(GC- und CCAAT-Box I) und Cluster II (GC-Box II und III und CCAAT-Box II) vermuten. Diese Clusterung ist typisch für TATA-lose Promotoren (Boisclair et al., 1993; Lee et al., 1992). Zusätzliche Versuche mit Einzel- und Doppelmutanten in Cluster II unterstützen diese Vermutung (Abb. 33 E). In Konstrukt B1 ist ihr Einfluss an der transkriptionellen Aktivierung nur gering. Damit wird die oben geäußerte Vermutung bestätigt, dass der Einfluss der Elemente in Cluster II ohne die Sequenz zwischen den ATGs gering ist. Dem gegenüber zeigten die Faktoren in Cluster II im Konstrukt C1 in Gegenwart der Sequenz zwischen den alternativen ATGs einen deutlichen Anteil an der Reportergenaktivität. Darüber hinaus führen die Doppelmutation innerhalb des Clusters II hier stets zu einer stärkeren Reduktion der Reportergen-Aktivität als die Einzelmutanten, was ein funktionelles Wechselspiel zwischen den Elementen vermuten lässt.

Diese Daten weisen darauf hin, dass am Promotor der phGPx ein hoher Grad an funktioneller Interaktion zwischen den einzelnen cis- und trans-regulatorischen Elementen für die Initiation und Aktivierung der Transkription erforderlich ist. Daneben scheint die Sequenz zwischen den ATGs im Zusammenspiel mit den 5'-flankierenden Sequenzen von großer Bedeutung für die transkriptionelle Regulation zu sein. Vermutlich ist dieses Szenario eine starke Vereinfachung der Situation *in vivo*, da die Interaktionen der identifizierten Proteine mit weiteren Faktoren vernachlässigt wird. Darüber hinaus sind weiter entfernte *Silencer*- oder *Enhancer*-Elemente und die räumliche Anordnung des Initiationskomplexes der Transkriptionsmaschinerie am phGPx Promotor noch völlig unbekannt. Eine weitere Einschränkung wird bedingt durch das für diese Experimente gewählte zelluläre Modell. Jedes zelluläre System besitzt die jeweilige typische Zusammensetzung an Proteinen. Das Expressionsmuster der verschiedensten Transkriptionsfaktoren wirkt sich folglich auch auf die in diesem System zu messenden Reportergenaktivitäten aus.

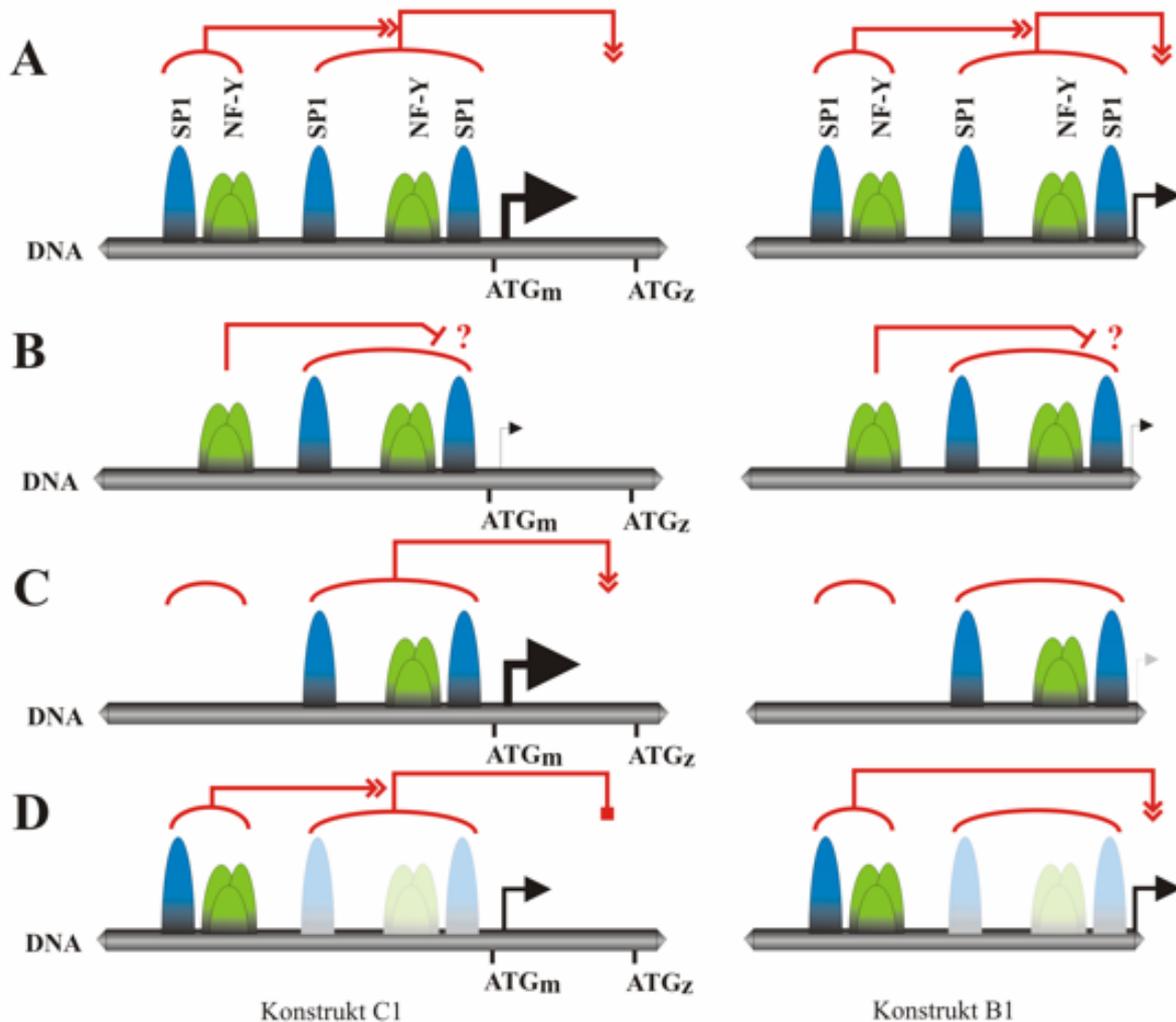


Abb. 33: Hypothetische Interaktionen zwischen Sp1 und NF-Y am Promotor der murinen phGPx. Dargestellt ist das hypothetische Zusammenspiel von Sp1 und NF-Y und ihr Einfluss auf die Transkriptionelle Aktivierung des zytosolischen (Konstrukt C1) bzw. des mitochondrialen Transkriptionsstarts (Konstrukt B1), welche durch die Dicke des entsprechenden Pfeils symbolisiert werden soll. A. Zusammenspiel der Faktoren an den Wildtyp-Konstrukten. B. Mutagenese der CCAAT-Box I. C. Mutagenese der GC-Box I. D. Simultane Mutagenese der GC- und CCAAT-Box I. E. Einzel- und Doppelmutationen der GC-Box II und III und der CCAAT-Box II.

### 5.1.2 Das Stimulierende Protein 1 bindet an drei unabhängige GC-Boxen

Sp1 wurde 1982 aus HeLa-Zellen gereinigt, als ein Protein, welches in der Lage ist, Sequenzspezifisch DNA zu binden und die Transkription vom frühen Promotor des Affenvirus 40 (simian virus 40, SV40) im zellfreien System zu aktivieren (Dyanan und Tjian, 1983; Dyanan und Tjian, 1983). Sich daran anschließende Untersuchungen demonstrierten, dass Sp1 durch Interaktion mit einer GC-Box (Konsensus GGGCGGGG) in zahlreichen viralen und zellulären Genen zur transkriptionellen Aktivierung beiträgt (Dyanan und Tjian, 1985; Kadonaga und Tjian, 1986; Mitchell und Tjian, 1989). Da Sp1 auch der erste Sequenzspezifische Aktivator der RNA-Polymerase II war, ist er hinsichtlich seiner funktionellen und biochemischen Eigenschaften detailliert untersucht. Die Bindungseigenschaften von Sp1

beruhen auf einer Zinkfinger-Region in der Nähe des C-Terminus und die transkriptionelle Aktivierung auf vier separaten Domänen (Courey und Tjian, 1988; Kadonaga et al., 1987; Kadonaga et al., 1988). Die Domänen A und B vermitteln starke transkriptionelle Aktivierung (Emami et al., 1995; Girotti, 1998). Die Aktivierungsdomänen C und D verstärken diese Aktivierung (Courey und Tjian, 1988). Die D-Domäne dirigiert zusammen mit A und B die Multimerisation von Sp1, welche essentiell ist für die synergistische Transkriptionsaktivierung (Courey et al., 1989; Mastrangelo et al., 1991; Pascal und Tjian, 1991; Su et al., 1991). Da die Zinkfinger-Domäne essentielle Cystein-Reste enthält, sind Zinkfinger primäre Ziele für Redox-abhängige Regulation (Wu et al., 1996). Auf diese Weise ließe sich die phGPx-Expression in Abhängigkeit vom zellulären Redox-Status regulieren. Aufgrund der Beteiligung der phGPx an der Regulation des zellulären Redox-Status kann ein mögliches funktionelles Wechselspiel zwischen Sp1 und phGPx postuliert werden. Eine Redox-abhängige Regulation der phGPx Expression ist bislang jedoch noch nicht hinreichend belegt.

Wie viele andere Transkriptionsfaktoren benötigt Sp1 den Faktor TFIID (Pugh und Tjian, 1990; Smale et al., 1990; Tanese et al., 1991; Zhou et al., 1992). Sp1 interagiert mit Untereinheiten des TFIID-Komplexes und ist in der Lage, an diesen Komplex zu binden und ihn dadurch am basalen Promoter zu stabilisieren (Chiang und Roeder, 1995; Emili et al., 1994; Hoey et al., 1993; Kaufmann und Smale, 1994; Tanese et al., 1996; Weinzierl et al., 1993). Sp1 spielt eine prominente Rolle bei der Expressionsregulation von Genen, deren Promotoren keine TATA-Box enthalten. Für die Transkriptionsregulation solcher Gene ist meist jedoch eine einzelne Sp1-Bindestelle nicht ausreichend. Sp1 fungiert immer zusammen mit zusätzlichen Elementen, wie einem Inr-Element oder weiteren Sp1-Bindestellen (Blake et al., 1990; Means und Farnham, 1990; Travis et al., 1991), wie sie auch im Promotor der phGPx vorliegen.

Neben den Elementen des basalen Transkriptionsapparates interagiert Sp1 mit ubiquitären Transkriptionsfaktoren wie Oct-1 (Strom et al., 1996) oder NF- $\kappa$ B (Pazin et al., 1996). Interaktionen mit mehr Gewebe-spezifischen Regulatorproteinen wie GATA und Smad3 sind ebenfalls beschrieben (Datta et al., 2000; Fluck und Miller, 2004; Inagaki et al., 2001; Merika und Orkin, 1995). Letztere Interaktion ist besonders interessant, da in dieser Arbeit auch im Promotor der phGPx Bindestellen für die Smad-Familie gefunden wurden.

In der 5'-flankierenden Region des murinen phGPx wurden keine Elemente identifiziert, welche eine Regulation durch Steroidhormone wie Testosteron vermitteln könnten. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass Sp1 mit nukleären Rezeptoren wie dem Vitamin-D3-Rezeptor

interagiert und eine entsprechende transkriptionelle Aktivierung vermittelt (Hussmann et al., 2000; Krikun und Lockwood, 2002).

Obwohl Sp1 ein ubiquitärer Faktor ist, zeigt seine Expression jedoch deutlich Unterschiede in unterschiedlichen Zelltypen und ist herabreguliert in vielen ausdifferenzierten Zellen (Saffer et al., 1991). Diese Schwankungen (bis zu Faktor 100) im Expressionsniveau von Sp1 wirken sich auf Promotoren aus, die GC-Boxen enthalten und führen zu gravierenden Veränderungen in der Transkription. Zum Beispiel ist die Expression von Sp1 in Spermatisden am höchsten (Saffer et al., 1991). Interessanter Weise ist in diesen Zellen auch die Expression der Protamin-Gene und die der phGPx hochreguliert (Puglisi et al., 2005; Tanaka und Baba, 2005). Sowohl der Promotor von Protamin 2 (Bunick et al., 1990) sowie der Promotor der phGPx enthalten GC-Boxen, die Sp1 binden. Es kann daher spekuliert werden, dass die hohe phGPx-Expression in Spermatisden wenigstens zum Teil auf die hohe Sp1-Expression zurückzuführen ist. Dem gegenüber ist die Sp1-Expression auch in Testis-Zellen, wie Spermatisgonien und Spermatisozyten, erniedrigt, in denen auch die phGPx-Expression vergleichsweise gering ist. Das murine Sp1 unterliegt darüber hinaus während der Spermatisogenese einem alternativen Spleißen, wodurch seine Affinität zur Testis DNA erhöht wird (Persengiev et al., 1996).

Sp1 selbst unterliegt einem komplexen Mechanismus verschiedenster Phosphorylierungsreaktionen, welche sich Kontext-abhängig unterschiedlich auf seine Aktivität auswirken (Chu und Ferro, 2005). So wurde gezeigt, dass Sp1 in der perinatalen Lunge starker Phosphorylierung ausgesetzt ist. Diese Modifizierung könnte durch Sp1-abhängige Gene eine Rolle bei der Lungenreifung während und nach der Geburt spielen. Viele Gene werden während der Geburt in der Lunge differentiell exprimiert. So zeigt zum Beispiel in der murinen Lunge die mitochondriale phGPx-mRNA in diesem Zeitfenster einen signifikanten Expressionsabfall. Es wird postuliert, dass diese Regulationen während der Lungenentwicklung wenigstens zum Teil von Sp1 abhängen (Chu und Ferro, 2005).

Nicht untersucht wurde in dieser Arbeit der Einfluss von GC-Methylierung und Histon-Azetylierung auf die phGPx-Expression. Auch in diese Prozesse scheint Sp1 involviert zu sein (Bouwman und Philipsen, 2002; Marin et al., 1997). Die 5'-flankierende Sequenz des phGPx-Gens enthält eine CpG-Insel (-356 bp bis +36 bp vom mitochondrialen Translationsstart). Solche CpG-Inseln enthalten oftmals Sp1-Bindestellen und Sp1 verhindert die Methylierung vieler CpG-Inseln im Genom (Marin et al., 1997). Die Aufrechterhaltung des richtigen Methylierungsmusters solcher CpG-Inseln ist von größter Bedeutung während der Embryogenese (Li et al., 1992).

### 5.1.3 Der Nukleäre Faktor Y bindet an zwei inverse CCAAT-Boxen

Die CCAAT-Box war eine der ersten cis-regulatorischen Elemente, die in Promotoren Protein-kodierender Gene identifiziert wurde (Benoist et al., 1980). Spätere Studien zeigten, dass dieses Pentanukleotid bei einer Vielzahl von Promotoren diverser Vertebraten, Hefen und Pflanzen vorkommt, bei *Drosophila* jedoch nicht nachzuweisen ist (Mantovani, 1999). Eine Untersuchung von über 500 Promotoren ergab, dass etwa 30% davon eine CCAAT-Box besitzen (Bucher, 1990). Untersuchungen in den letzten Jahren zeigten zudem, dass das CCAAT-Motiv von einer Vielzahl von Faktoren erkannt und gebunden wird (Mantovani, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei inverse CCAAT-Boxen identifiziert, die den Nukleären Faktor Y (NF-Y) binden. NF-Y ist ein ubiquitär vorkommendes Protein, das sich aus drei Untereinheiten zusammensetzt – NF-YA, NF-YB und NF-YC. Alle drei Untereinheiten sind für das Binden an DNA erforderlich. Die Bildung eines Heterodimers aus NF-YB und NF-YC ist Voraussetzung für die Interaktion mit NF-YA und für sequenz-spezifische DNA-Interaktionen (Sinha et al., 1995). Beide, NF-YB und NF-YC, enthalten ein so genanntes „histone-fold“-Motiv. Dieses Motiv ist notwendig sowohl für die Interaktion der Untereinheiten untereinander als auch für die DNA-Bindung (Maity et al., 1990; Sinha et al., 1995).

Von NF-Y gebundene CCAAT-Boxen werden bevorzugt in Promotoren gefunden, denen eine TATA-Box fehlt (Mantovani, 1998). Auffällig ist auch, dass CCAAT-Boxen, die in Promotoren liegen, welche eine TATA-Box enthalten, ca. -80 bp bis -90 bp vom Transkriptionsstart entfernt liegen. In TATA-losen Promotoren sind sie jedoch dichter am Transkriptionsstart lokalisiert und kommen bevorzugt in inverser Orientierung vor. Sie können sogar mit dem Transkriptionsstart überlappen (Mantovani, 1998). Dieser Befund lässt sich auch auf den Promotor des phGPx-Gens übertragen. Hier liegen die CCAAT-Boxen in einem TATA-losen Promotor in inverser Orientierung vor und befinden sich in unmittelbarer räumlicher Nähe zu den Transkriptionsstarts.

Innerhalb eines Gens sind CCAAT-Boxen inklusive der flankierenden Nukleotide zwischen den Arten außerordentlich stark konserviert (Mantovani, 1999). Das Sequenz-Alignment der potentiellen Promotorregion des phGPx-Gens verschiedener Säugerspezies (Abb. 32) zeigt, dass dies auch in der 5'-flankierenden Region des phGPx der Fall ist. Darüber hinaus ist die Funktionalität der CCAAT-Box I im humanen Promotor bestätigt worden. Auch hier wird das CCAAT-Motiv von NF-Y gebunden (Huang et al., 1999). Robert Mantovani geht sogar so weit zu behaupten, dass konservierte CCAAT-Boxen in jedem Fall eine Rolle bei der

transkriptionellen Aktivierung spielen (Mantovani, 1999). CCAAT-Boxen sind immer von mindestens einem weiteren funktionell wichtigen Promotorelement flankiert. Dabei scheint der Abstand zwischen den einzelnen Elementen eine große Bedeutung zu haben. In vielen Fällen konnte gezeigt werden, dass NF-Y mit benachbarten Faktoren interagiert. Dabei verstärkt NF-Y ihre Affinität zur DNA und stabilisiert somit den Protein-Komplex an der DNA, was funktionelle Synergismen erklären würde. So wurde dies für die Faktoren Sp1, SREBP1 und Smad-Proteine gezeigt (Chen et al., 2002; Inagaki et al., 2001; Wright et al., 1995). Für beide Faktoren konnte die Interaktion sogar in Abwesenheit von DNA nachgewiesen werden (Dooley et al., 1998; Roder et al., 1999). Sp1-Interaktionen am Promotor des phGPx-Gens wurden in der vorliegenden Arbeit gefunden. Unsere funktionellen Promotorstudien belegen darüber hinaus eine Interaktion zwischen NF-Y und Sp1. Weiterhin wurde für Sequenzen des Introns 1 eine Wechselwirkung mit SREBP 1 unter *in vitro* und *in vivo* Bedingungen beobachtet (Borchert et al., 2003). Eine Kooperation von NF-Y und Sp1 wurde vielfach beschrieben und scheint in die Vermittlung einer Vielzahl von Stimulatoren auf die Transkriptionsregulation involviert zu sein (Inoue et al., 1999; Roder et al., 1997; Sorensen und Wintersberger, 1999; Xiong et al., 2000; Zhong et al., 2000; Zwicker und Muller, 1997). Dabei lagen die Sp1- und NF-Y-Bindungsstellen meist dicht bei einander (20 - 30bp), wie es auch bei der phGPx der Fall ist. Theoretisch könnten solche funktionellen Interaktionen auch durch weitere Proteine vermittelt werden (Mantovani, 1999). Sp1 und NF-Y sind beide in der Lage, mit dem TFIID-Komplex zu interagieren (Bellorini et al., 1997) und können auch direkt nukleosomale DNA binden (Li et al., 1994; Motta et al., 1999). Es ist bekannt, dass NF-Y und Sp1 Veränderungen in der Doppelhelix der DNA induzieren und in ihrer Umgebung für die Rekrutierung weiterer Faktoren sorgen, die ihren Einfluss eher über Protein-Protein-Interaktionen als über Protein-DNA-Interaktionen ausüben (Roder et al., 1997; Ronchi et al., 1995).

#### **5.1.4 Proteine der Smad-Familie binden in der 5'flankierenden Region des phGPx-Gens**

Neben den ubiquitären Transkriptionsfaktoren Sp1 und NF-Y, die im Promotor des phGPx-Gens binden, konnten zwei cis-regulatorische Sequenzen für Transkriptionsfaktoren der Smad-Familie identifiziert werden (Smad-bindende Elemente, SBE). Entsprechend der Gelshift-Analysen finden sich Smad-bindende Elemente in unmittelbarer Nähe der CCAAT-Box II (SBE I) sowie 7 Basen vor dem Translationsstart der zytosolischen phGPx-Isoform (SBE II). Die *in silico* Analyse mithilfe des MatInspector Programms (Quandt et al., 1995) postuliert für SBE I die Interaktion mit dem Protein FAST1 und für SBE II mit Smad3. Die

minimale Erkennungssequenz der Smad-Proteine ist AGAC (Dennler et al., 1998), wie sie sich in SBE II finden lässt. Eine ähnliche Situation von überlappenden Bindestellen für CCAAT und FAST1, konnte auch im TATA-losten Promotor des humanen Methioninsulphoxidreduktase A Gens beschrieben werden (De Luca et al., 2005). Auch hier zeigten sich in Gelshift-Versuchen mit nukleären Extrakten aus HEK293-Zellen spezifische Protein-DNA-Komplexe. Die Identifizierung des entsprechenden Komplexes mit spezifischen Antikörpern schlug dort jedoch ebenfalls fehl (De Luca et al., 2005). Möglicher Weise handelt es sich in beiden Fällen um bisher nicht bekannte Zell-spezifische Transkriptionsfaktoren der Smad-Familie.

Smad-Proteine sind Schlüssel-Mediatoren der Signalkaskaden der TGF- $\beta$ -Superfamilie. Diese Proteinfamilie umfasst mehr als 30 verwandte Proteine, inklusive 3 TGF- $\beta$ s, 4 Activine, Inhibin, Müllerian Inhibiting Substance, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren und mehr als 20 Bone Morphogenetic Proteins (BMP) (Dennler et al., 2002; Shi und Massague, 2003). Diese Faktoren sind in eine Vielzahl von Prozessen involviert. Derzeit sind bei Säugetieren acht Smad-Isoformen bekannt, die sich in mehrere Untergruppen untergliedern lassen: i) Rezeptor-aktivierte Smads, inklusive der BMP-aktivierten Smads (Smad1, Smad5 und Smad7) und den TGF- $\beta$ -aktivierten Smads (Smad2 und Smad3), ii) der obligatorische Smad4 und iii) die inhibierenden Smads (Smad6 und Smad7). TGF- $\beta$  selbst initiiert als Homodimer durch Bindung an Transmembran-Serin/Threonin-Kinase Rezeptoren, eine Phosphorylierung von Smad2 und Smad3. Die daraus resultierenden Konformationsänderungen führen zu Multimerisierungen mit Smad4. Diese Komplexe wandern daraufhin in den Kern und assoziieren mit weiteren Co-Faktoren, um schließlich die Transkription zu aktivieren (Shi und Massague, 2003). Die meisten Smad-bindenden Elemente enthalten nur eine Kopie des SBE. Da die DNA-Bindungsspezifität der einzelnen Smad Proteine relativ gering ist, müssen sie mit einander und anderen Proteine interagieren, um ihre spezifischen transkriptionellen Effekte auszuüben (Shi und Massague, 2003). Eines dieser mit Smads interagierenden Proteine ist das Forkhead/Winged Helix-Protein FAST1 (FoxH1). FAST1 kann stimuliert durch Activin (Mitglied der TGF- $\beta$  Liganden-Superfamilie) mit Smad2 und Smad4 multimerisieren (Chen et al., 1997). Dieser ternäre Komplex ist dann in der Lage, vermittelt durch FAST1, spezifisch mit DNA zu interagieren, um die Transkription von Zielgenen zu aktivieren (Zhou et al., 1998). Der transkriptionell aktivierende Komplex FAST1/Smad2/Smad4 kann durch Interaktion mit Smad3, welches in angrenzenden Sequenzen bindet, gehemmt werden (Labbe et al., 1998). FAST1 allein ist jedoch nicht in der Lage, die Transkription zu aktivieren (Labbe et al., 1998). Zusammen mit Smad2, Smad 3

und Smad4 ist FAST1 jedoch nötig, um die Signaltransduktionskaskade durch Nodals (Mitglieder der TGF- $\beta$  Liganden-Superfamilie) einzuleiten (Hoodless et al., 2001; Sirotkin et al., 2000; Weisberg et al., 1998). Nodal-Signaltransduktion ist essentiell für die frühe Embryogenese bei Wirbeltieren und steht in Wechselwirkung mit anderen Signalkaskaden, wie dem Wnt-Signalweg (Trinh et al., 2003). Da die Rolle der phGPx in letzter Zeit auch im Zusammenhang mit der Embryogenese diskutiert wird (Imai et al., 2003; Yant et al., 2003), scheint die Identifizierung potentieller Smad/FAST1-Bindestellen im Promotor des entsprechenden Gens von besonderem Interesse zu sein. Die Verknüpfung von TGF- $\beta$ -Signaltransduktion und phGPx-Expression in der Embryonalentwicklung bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

Neben der Embryogenese sind die Signalwege der TGF- $\beta$  Liganden-Superfamilie auch von großer Bedeutung für die Spermatogenese. Activin stimuliert, vermutlich vermittelt durch Smad2 und Smad3, eine Proliferation von Sertoli-Zellen, erhöht die mitotische Aktivität der Spermatogonien und hemmt die durch humanes Choriongonadotropin stimulierte Testosteron-Bildung (Xu et al., 2003). Activin wird dabei nicht von den Gonaden sondern vielmehr von der Hypophyse gebildet (Bernard, 2003). Der Fakt, dass die testikuläre phGPx-Expression, die unter dem Einfluss von Testosteron steht, das durch Ledge-Zellen lokal gebildet wurde, und abhängig ist von einem intakten Wechselspiel zwischen Hypophyse und Gonaden (Maiorino et al., 1998), bedarf im Hinblick auf die Entdeckung von cis-regulatorischen DNA-Elementen der Smad-Familie als Mediatoren der TGF- $\beta$ -Signaltransduktionen weiterführender Aufklärung.

Die Identifikation von Smad-bindenden Elementen eröffnet ein weites Feld an Regulationsmöglichkeiten durch eine Vielzahl von Stimulantien, insbesondere während der Embryogenese und der Spermatogenese. Welches Protein der Smad-Familie jedoch in der humanen Nierenzelllinie HEK293 mit Elementen im Promotor der phGPx interagieren und inwieweit sich das Muster an DNA-bindenden Proteinen während unterschiedlicher physiologischer und pathologischer Prozesse ändert, muss in weiterführenden Arbeiten aufgeklärt werden.

## **5.2 Protein-RNA-Interaktionen in der 5'-untranslatierten Region der mitochondrialen phGPx-mRNA**

Die Regulation der Expression der phGPx-Isoformen ist ein komplexer Prozess, der sowohl transkriptionelle als auch post-transkriptionelle Prozesse umfasst. Insbesondere für post-transkriptionelle Ereignisse häufen sich in den letzten Jahren die Hinweise. Zunächst jedoch unterliegt die Expression der phGPx als Selenoprotein der Regulation durch den

kotranslatorischen Einbau des Selenocysteins und der damit verbundenen Ereignisse (siehe Kapitel 1.1). Daneben gibt es Hinweise für die Regulation der phGPx Expression auf post-transkriptioneller Ebene durch Zytokine (Kühn und Borchert, 2002; Sneddon et al., 2003) und während der Spermatogenese (Tramer et al., 2002).

Im Folgenden haben wir uns deshalb mit der Untersuchung post-transkriptioneller Regulationsmechanismen bei der phGPx Expression beschäftigt. Es ist gut dokumentiert, dass auch post-transkriptionelle Effekte durch Protein-Nukleinsäure-Interaktionen vermittelt werden können. Für die phGPx und Selenoproteine im Allgemeinen ist bekannt, dass der Einbau des Selenocysteins ein post-transkriptioneller Prozess ist, der Protein-RNA-Interaktionen beinhaltet (Copeland et al., 2000; Copeland et al., 2001). Vermittelt wird die Insertion des Selenocysteins in das wachsende Polypeptid unter anderem durch die in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der mRNA gelegene Selenocystein-Insertionssequenz. Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass es regulatorische Sequenzen auf RNA-Ebene neben der SECIS in der 3'-UTR gibt, die den Einbau des Selenocysteins beeinflussen (Müller et al., 2003).

Die Transkription des phGPx-Gens ist besonders hoch in runden Spermatisden und fällt während des Überganges zu elongierten Spermatisden stark ab (Maiorino et al., 1998; Nam et al., 1998). Auf Protein-Ebene ist die Expression jedoch am intensivsten in elongierten Spermatisden und Spermatozoen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die phGPx-Expression noch lange nach der Transkription des entsprechenden Gens aufrechterhalten wird (Tramer et al., 2002). Aufgrund dieser Hinweise für post-transkriptionelle Regulationsmöglichkeiten, haben wir die 5'-UTR der mitochondrialen phGPx mRNA auf potentielle Protein-RNA-Interaktionen untersucht. Die 5'-UTR der verschiedenen phGPx-Isoform, ist für jede Isoform einzigartig. Dadurch scheint eine individuelle Regulation der Expression der verschiedenen mRNA Species auf post-transkriptioneller Ebene möglich zu sein. Mit Hilfe des *in vivo* Ansatzes des Hefe-Drei-Hybrid Systems ist es gelungen, den Guanin-reiche Sequenz-bindenden Faktor 1 (GRSF1) als ein Protein zu identifizieren, welches mit cis-regulatorischen Sequenzen der 5'-UTR der mRNA der mitochondrialen phGPx interagiert.

### **5.2.1 Der Guanin-reiche Sequenz bindende Faktor 1**

Der humane Faktor GRSF1 (hGRSF1, NM\_002092) wurde erstmals 1994 als zytosolisches, poly-A mRNA-bindendes Protein beschrieben (Qian und Wilusz, 1994). Das GRSF1-Protein enthält mehrere interessante Domänen (Abb. 34). Zunächst können drei RNA-Erkennungsmotive unterschieden werden. Jedes RNA-Erkennungsmotiv enthält jeweils ein

stark konserviertes Octamer- und Hexamer-Motiv. Da GRSF1 drei nicht identische RNA-Erkennungsmotive enthält, wird angenommen, dass es multiple RNA-Elemente binden kann, wobei jedes RNA-Erkennungsmotiv eine unabhängige Spezifität besitzen sollte (Qian und Wilusz, 1994). Solche Proteine sind in der Lage, Sequenzelemente in räumliche Nähe zu bringen, die sonst weit von einander entfernt liegen (Qian und Wilusz, 1994). Zweitens, gibt es eine saure Domäne zwischen den RNA-Erkennungsmotiven 2 und 3, welche den Aktivierungsdomänen von Transkriptionsfaktoren ähnelt (Abb. 34). Damit wäre GRSF1 befähigt mit anderen Proteinen zu interagieren. Schließlich besitzt GRSF1 am N-Terminus einen Alanin-reichen Bereich, dessen exakte Funktion bisher unbekannt ist. Im murinen GRSF1 (mGRSF1) sind alle beschriebenen Domänen insbesondere die Octamer- und Hexamer-Motive der RNA-Erkennungsmotive in hoch konservierter Form enthalten (Abb. 34). Einzige Ausnahme scheint eine Mutation an Aminosäure-Position 254 zu sein (Arginin zu Threonin). Da die im Hefe-Drei-Hybrid-System ermittelte GRSF1-Isoform an dieser Position aber ebenfalls ein Arginin besitzt, scheint es sich bei mGRSF1 (NM\_178700) um ein Sequenzierartefakt zu handeln und auch dieses Hexamer-Motiv konserviert zu sein. Die N-terminale Alanin-reiche Domäne ist in der murinen Form deutlich größer, enthält aber ebenfalls viele Alaninresten (45% Alanin). Ebenfalls konserviert ist die saure Aspartat- und Glutamat-reiche Domäne (35% Aspartat und Glutamat). Aufgrund des hohen Grades an Konservierung zwischen Maus und Mensch insbesondere bezüglich der RNA-bindenden Domänen wird angenommen, dass sich ähnliche Funktionen von GRSF1, wie sie für den Menschen beschrieben sind, auch für das bisher nicht untersuchte Maus-System diskutieren lassen.

Im Hefe-Drei-Hybrid-System ist eine alternative Spleißform des murinen GRSF1 identifiziert worden (Hefe-Klon 6; K6-GRSF1). Bereits für den Menschen wird eine Vielzahl von GRSF1-Isoformen vermutet (Qian und Wilusz, 1994). Die hier gefundene alternative Isoform K6-GRSF1 unterscheidet sich lediglich hinsichtlich ihrer N-terminalen Sequenzen von der beschriebenen Isoform mGRSF1. Beide Isoformen zeigen in Hinblick auf ihre Sequenz-Spezifität für die 5'-UTR der phGPx übereinstimmende Eigenschaften.

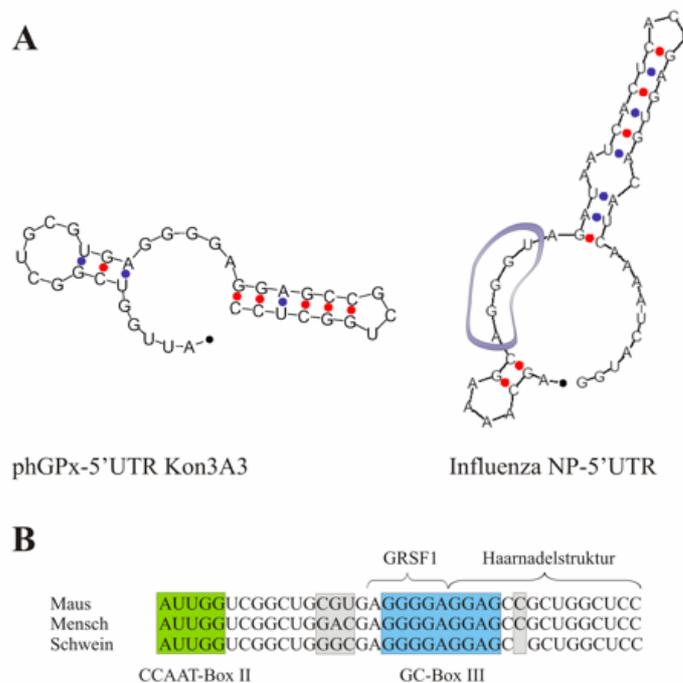
		Alanin-reiche Domäne		
hGRSF1	1	MAGTRWVLGALLRGCGCNCSSCRRTG	AAACLPFYSAA-----	36
mGRSF1	1	MAGTRWVLGALLRGYGCNCSSCRRTG	AAACLPFYSAAGTFPSGVSRRRLLLLGAAAAAASQTRGL	66
*****				
hGRSF1	37	-----	SYPALRASLLPQSLAAAAAVPTRSYSQESKTTYLEDLPPP	76
mGRSF1	67	QLGPAAGRLAGPI	PARPSAAAAAATSYSALRAPLFRSLAAAAG-PARGYSQESKTTYLEDLPLL	131
** * * * * * * * * * * * * * * * * * *				
		RNA-Erkennungsmotiv 1		
hGRSF1	77	PEYELAPSKLEEVDVFL	IRAQGLPWCTMEDVLNFFSDCRIRNGENGIHFLNLRDGRKRGDALI	142
mGRSF1	132	PEYELSPSKLGDEVDVYL	IRAQGLPWCTVEDVLNFFSDCRIRNSENGIHFLLNLRDGRKRGDALI	197
*****				
hGRSF1	143	EMESEQDVQKALEKHRMYMGORYVEVYEINNEDVDA	LMKSLQVKSSPVVNDGVVRLRGLPYSCNEK	208
mGRSF1	198	EMESEQDVQKALEKHRMYMGORYVEVYEINNEDVDA	LMKSLQVKSPVLSDGVVRLTGLPYSCNEK	263
*****				
		RNA-Erkennungsmotiv 2		
hGRSF1	209	DIVDFFAGLNIVDITFVMDYRGRRK	TGEAYVQFEEPEMANQALLKHREEIGNRYIEIFPSRRNEVR	274
mGRSF1	264	DIVDFFAGLNIVDITFVMDYRGRRK	TGEAYVQFEEPEMANQALLKHREEIGNRYIEIFPSRRNEVR	329
*****				
		Glutamat-/Aspartat-reiche Domäne		
hGRSF1	275	THVGSYKGGKIASFPTAKYIT	PEMVFEEHEVNEVPOPMTAFESKEIQLPKVEPEKLPEAAVFGT	340
mGRSF1	330	THVGSYKGGKMTSSPPTYIT	PEVVFEEHEVNEDIKPMTAFESQKEIQLPKEMSEKLPKAVLFGT	395
*****				
		RNA-Erkennungsmotiv 3		
hGRSF1	341	TSSLHFVHMRGLP	PFQANAQDIINFFAPLKPVRITMEYSSSGKATGEADVHFETHEDAVAAMLKDRS	406
mGRSF1	396	LPSLHFVHMRGLP	PFQANAQDIINFFAPLKPVRITMEYSSSGKATGEADVHFETHEDAVAAMLKDRS	461
*****				
hGRSF1	407	HVHHRYIELFLNSCPKGG		424
mGRSF1	462	HVQHRYIELFLNSCPKGG		479
** * * * * * * * * * * * *				

**Abb. 34: Sequenzvergleich der Aminosäuresequenz des humanen und murinen GRSF1. Sternchen markieren konservierte Aminosäuren. Wichtige Domänen sind farblich hinterlegt. Der Pfeil markiert eine mutierte Base im Octamer-Motiv des RNA-Erkennungsmotivs 2, bei der es sich möglicherweise um einen Sequenzierartefakt handelt. Erläuterungen Siehe Text.**

Am besten ist die Funktion von GRSF1 im Zusammenhang mit der Virus-Proteinsynthese von Influenza untersucht. Hier scheint GRSF1 als zelluläres Protein an der selektiven Translation von viraler mRNA beteiligt zu sein (Park et al., 1999). Dabei tritt GRSF1 als translationaler Aktivator der viralen Proteinsynthese auf (Kash et al., 2002). In diesem Zusammenhang wurde die cis-regulatorische RNA-Sequenz in der 5'-UTR der mRNA des Influenza Nukleokapsid-Proteins (NP) ausführlich analysiert. Hierbei zeichnete sich die Sequenz AG<sub>3-4</sub>U vor einer kleineren Haarnadelstruktur als Kernmotiv ab (Abb. 35). Diese Anordnung findet sich in ähnlicher Weise in dem 37nt-Motiv (Kon3A3) wieder, welches in dieser Arbeit als spezifisch mit GRSF1 interagierend beschrieben wurde. Kon3A3 enthält ein AGGGGA-Motiv, welches bis auf das 3'-terminale A dem für Influenza beschriebenen Kern-Motiv entspricht, gefolgt von einer kurzen Haarnadelstruktur (Abb. 35). Zwischen den Spezies Maus, Mensch und Schwein ist diese Sequenz von 37 Nukleotiden hoch konserviert (Abb. 35). Daher lässt sich eine funktionelle Interaktionen von GRSF1 und phGPx-mRNA auch für Mensch und Schwein postulieren. Interessanterweise trägt das als Kon3A3 bezeichnete 37nt-Oligonukleotid cis-regulatorische Element sowohl für die Protein-DNA-

Interaktionen mit NF-Y und Sp1 als auch für Protein-RNA-Interaktionen mit GRSF1 (Abb. 35).

Eine Funktion von GRSF1 im Testis oder während der Spermatogenese ist bisher nicht beschrieben. Bemerkenswert jedoch ist, dass die GRSF1-mRNA selbst auch Substrat für RNA-bindende Proteine ist (Jiao et al., 2002). Das Protein mDAZL (murines deletiert in Azoospermie-Ähnlicher Faktor) ist essentiell für die Spermienproduktion und enthält RNA-Erkennungsmotive, welche unter anderem mit der GRSF1-mRNA interagieren (Jiao et al., 2002). Post-transkriptionelle Prozesse wie alternatives Spleißen, alternative 3'-Enden, Translationsinhibierung und -aktivierung sowie RNA-Stabilität scheinen eine wichtige Rolle während der Spermatogenese zu spielen (Elliott, 2003; Kleene, 2003; Venables und Eperon, 1999).



**Abb. 35: Die mit GRSF1-interagierende Sequenz in der 5'-untranslatierten Region der mitochondrialen phGPx.**

**A. Vergleich der Sekundärstrukturen der mit GRSF1 interagierenden RNA-Sequenzen der 5'-untranslatierten Region der m-phGPx (RNA-Sonde Kon3A3) und des Influenza-Proteins NP. Das AGGGU-Motiv der Influenza NP-5'-UTR ist hervorgehoben. B. Sequenz-Vergleich der cis-regulatorischen, GRSF1-bindenden Sequenz der 5'-UTR der m-phGPx in Maus, Mensch und Schwein.**

GRSF1 scheint auch mit einer G-reichen Sequenz in der 5'-untranslatierten Region des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 zu interagieren und dessen Expression negativ zu beeinflussen (Chen, 1999). Dieser Fund ist insofern interessant, als die phGPx ebenfalls als anti-apoptotischer Faktor diskutiert wird (siehe Kapitel 1.2.3.). Weitere Untersuchungen diesbezüglich scheinen lohnenswert.

### **5.2.2 Expressionsmuster von GRSF1 und phGPx in murinen Geweben und während der Embryogenese**

Neben seiner Funktion als positiver Regulator der Influenza-Proteinsynthese wird GRSF1 auch während der Embryogenese als Mediator des Wnt-Signalweges diskutiert (Lickert et al., 2005). Wie bereits erwähnt, ist auch die phGPx von großer Bedeutung während der Embryogenese (Imai et al., 2003; Yant et al., 2003). Aus diesem Grunde wurde die Kinetik der Expression von GRSF1 im murinen Embryonen mit der Expression der mitochondrialen phGPx, an deren mRNA GRSF1 bindet, verglichen. Im Gesamt-Embryo lassen sich die Transkripte für die mitochondriale phGPx und GRSF1 nachweisen, wobei ihre Expression zur Geburt hin absinkt. Im embryonalen Gehirn zeigen sowohl mitochondriale phGPx als auch GRSF1 einen signifikanten Expressionsabfall während der embryonalen Stadien E14,5 bis E17,5. Besonders überzeugend wird die Ko-Regulation von GRSF1 und mitochondrialer phGPx in der Lunge, wo die Expression beider mRNAs mit der Geburt auf unterhalb die Nachweisgrenze fällt. Dieses regulatorische Verhalten scheint eine Funktion von GRSF1 und mitochondrialer phGPx während der perinatalen Reifungsprozesse in der Lunge während der Geburt widerzuspiegeln. Es wird deutlich, dass GRSF1 und mitochondriale phGPx während der Embryogenese ähnliche Expressionskinetiken insbesondere in der Lunge und im Gehirn aufweisen.

Darüber hinaus wurde die Gewebeverteilung von GRSF1 und der phGPx-Isoformen in der adulten Maus im Rahmen dieser Arbeit auf RNA-Ebene quantifiziert. Dabei wurde deutlich, dass sowohl GRSF1 als auch die mitochondriale phGPx bevorzugt im Testis exprimiert werden. Dies legt eine Funktion beider Proteine in der Spermatogenese nahe. Insbesondere findet sich im Testis auch die alternative Isoform K6-GRSF1. Ebenso unterliegen eine Anzahl weitere Gene während der Spermatogenese alternativem Spleißen beziehungsweise post-transkriptioneller Modifikation (Elliott, 2003; Venables, 2002). Bestätigt werden konnte auch die Tatsache, dass die m-phGPx die im Testis dominierende Isoform der phGPx ist (Pushpa-Rekha et al., 1995), wohingegen in allen übrigen Geweben die zytosolische Isoform überwiegt.

Das RNA-bindende Protein GRSF1 scheint ein in murinen Organen ubiquitär vorkommendes Protein zu sein, dessen Funktion bisher kaum untersucht wurde. Offenbar ist es wie das orthologe menschliche Protein in translationale Regulationsmechanismen involviert. Der Erforschung dieser Mechanismen wurde jedoch in der Vergangenheit verglichen mit der transkriptionellen Regulation der Genexpression wenig Bedeutung beigemessen. In letzter Zeit stoßen jedoch post-transkriptionelle Regulationsmechanismen beispielsweise während der Spermatogenese oder der Translationsinitiation auf ein zunehmendes Interesse (Kleene,

2003; Schneider et al., 2001). Zum Teil beruht die bisherige Zurückhaltung darauf, dass *in vivo* Ansätze zur Untersuchung post-transkriptioneller Regulationsmechanismen sehr kompliziert sind und verschiedene Interpretationsmöglichkeiten bieten (Kleene, 2003). Derartige funktionelle Untersuchung der Interaktion von GRSF1 mit der phGPx-mRNA *in vivo* unter anderem während der Spermatogenese und Embryogenese sind daher ein mögliches Ziel weiterführender Arbeiten.

### 5.3 Abschließende Betrachtung und Ausblick

In dieser Arbeit ist es gelungen Faktoren zu identifizieren, die in der 5'-flankierenden Region des phGPx-Gens binden. Im Promotor des phGPx-Gens befinden sich die Bindestellen, der Transkriptionsfaktoren NF-Y und Sp1. Für beide Faktoren konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt werden, dass sie mit ihren Erkennungsmotiven im proximalen phGPx-Promotor interagieren. Bei NF-Y und Sp1 handelt es sich um ubiquitäre Faktoren, denen insbesondere eine Funktion bei der Positionierung und Initiation des Transkriptionsinitiationskomplexes zukommt. Beide Faktoren sind darüber hinaus jedoch in der Lage, mit einer Vielzahl von Faktoren zu interagieren. Dieses mögliche komplexe Netzwerk an Interaktionen und Synergismen wird ansatzweise auch in den funktionellen *in vitro* Promotorstudien verdeutlicht. Aufgrund dieser Eigenschaften bilden die Faktoren NF-Y und Sp1 möglicherweise eine Art Plattform am phGPx-Promotor, welche die Etablierung weiterer Protein/Protein- und/oder Protein/DNA-Kontakte ermöglicht. In Abhängigkeit vom Satz an Proteinen im jeweiligen zellulären System kann die Expression der phGPx unterschiedlich beeinflusst werden. Inwieweit die Faktoren NF-Y und Sp1 das Expressionsmuster der phGPx-Isoform in seiner entwicklungspezifischen und gewebespezifischen Form bedingen, bedarf weiterer Forschung. Insbesondere sollten hier *in vivo* Studien zum Einsatz kommen, welche den Einfluss von NF-Y und Sp1 unter anderem in Abhängigkeit vom Zell- und Gewebetyp untersuchen. Hierbei bieten sich zelluläre Modelle mit gezieltem Knock down (siRNA) oder Knockout-Mäuse mit einer funktionellen Defizienz bestimmter Transkriptionsfaktoren an. Darüber hinaus können *in vivo* Promotorstudien Informationen darüber liefern, wann welche Protein-DNA-Interaktionen am phGPx-Promotor für die korrekte Expression der phGPx in Erscheinung treten.

Im Weiteren konnten am phGPx-Promotor Protein-DNA-Interaktionen nachgewiesen werden, an denen vermutlich Proteine der Smad-Familie beteiligt sind. Transkriptionsfaktoren der Smad-Familie können eine nahezu unüberschaubar große Anzahl von Stimuli auf die Expression ihrer Zielgene vermitteln. Aus diesem Grunde ist es zunächst nötig, exakt die

Faktoren zu identifizieren, welche am Promotor der phGPx mit den entsprechenden Smad-bindenden Elementen interagieren (Proteinreinigung, Hefe Ein-Hybrid System). Inwiefern sich die Zusammensetzung der in Abhängigkeit vom zellulären System ändert, kann das Ziel weiterer Untersuchungen sein.

In Form von weiteren funktionellen Promotorstudien können darüber hinaus auch Bereiche der transkriptionellen Aktivierung/Inhibierung der phGPx-Expression untersucht werden, die in dieser Arbeit nicht betrachtet worden sind. Dazu gehören unter anderem die Identifikation möglicher weiter entfernter cis-regulatorischer Elemente sowie Untersuchungen zum Methylierungsstatus des phGPx-Promotors und zur Abhängigkeit der phGPx-Expression von der Histon-Azetylierung. Die Identifikation von Sp1- und Smad-Bindestellen im proximalen phGPx-Promotor liefern erste Ansatzpunkte für die Testis-spezifische Hochregulation der phGPx. Inwiefern diese Faktoren jedoch an dieser Regulation beteiligt sind, bedarf weiterer klärender Untersuchungen wie *in vivo* Promotorstudien, Identifikation der betreffenden Smad-Proteine und möglicher weiter Proteinfaktoren im gesamten Promotorbereich der phGPx.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte aufgrund der sich häufenden Hinweise auf eine post-transkriptionelle Regulation der phGPx-Expression die Analyse von der transkriptionellen zur post-transkriptionellen Ebene getragen werden. Ziel der Untersuchungen war es Protein-RNA-Interaktionen an der 5'-untranslatierten Region der mRNA der mitochondrialen phGPx aufzuklären. Mithilfe des *in vivo* Ansatzes des Hefe Drei-Hybrid Systems wurde der Guaninreiche Sequenz bindende Faktor 1 (GRSF1) identifiziert. Diese Protein-RNA-Interaktion konnte unter *in vitro* Bedingungen bestätigt und charakterisiert werden. Sich daran anschließende Untersuchungen zum Expressionsmuster von phGPx und GRSF1 in Maus-Geweben und während der murinen Embryogenese auf Transkriptionsebene lassen ähnliche Regulationsmechanismen der Expression für beide Proteine vermuten. Bestätigt werden konnte die prominente Expression der mitochondrialen phGPx im murinen Testis. Die Relevanz der testikulären Expression des bisher kaum untersuchten GRSF1 bedarf weiterer Untersuchungen. Interessant sind auch die parallelen Expressionskinetiken von GRSF1 und phGPx während der murinen Embryogenese. Die funktionelle Relevanz der hier identifizierten Protein-RNA-Interaktionen während der Embryogenese und für das gewebespezifische Expressionsmuster der phGPx ist das Ziel weitere Studien (UV-Crosslink, Immunopräzipitation, siRNA). Von großer Wichtigkeit hierbei ist die Etablierung von geeigneten *in vivo* und *in vitro* Modellen zur Charakterisierung der funktionellen Relevanz der Interaktion von GRSF1 und phGPx-mRNA.

## Literaturverzeichnis

- Aitken, R. J. und Vernet, P. (1998): Maturation of redox regulatory mechanisms in the epididymis, *J Reprod Fertil Suppl* 53, Seite 109-18. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10645271](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10645271)
- Amberg, R.; Mizutani, T.; Wu, X. Q. und Gross, H. J. (1996): Selenocysteine synthesis in mammalia: an identity switch from tRNA(Ser) to tRNA(Sec), *J Mol Biol* 263 [1], Seite 8-19. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8890909](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8890909)
- Arai, M.; Imai, H.; Koumura, T.; Yoshida, M.; Emoto, K.; Umeda, M.; Chiba, N. und Nakagawa, Y. (1999): Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a major role in preventing oxidative injury to cells, *J Biol Chem* 274 [8], Seite 4924-33. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9988735](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9988735)
- Arai, M.; Imai, H.; Sumi, D.; Imanaka, T.; Takano, T.; Chiba, N. und Nakagawa, Y. (1996): Import into mitochondria of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase requires a leader sequence, *Biochem Biophys Res Commun* 227 [2], Seite 433-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8878533](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8878533)
- Arthur, J. R.; Nicol, F. und Beckett, G. J. (1990): Hepatic iodothyronine 5'-deiodinase. The role of selenium, *Biochem J* 272 [2], Seite 537-40. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2268281](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2268281)
- Azizkhan, J. C.; Jensen, D. E.; Pierce, A. J. und Wade, M. (1993): Transcription from TATA-less promoters: dihydrofolate reductase as a model, *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 3 [4], Seite 229-54. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8286846](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8286846)
- Banning, A. und Brigelius-Flohe, R. (2005): NF-kappaB, Nrf2, and HO-1 interplay in redox-regulated VCAM-1 expression, *Antioxid Redox Signal* 7 [7-8], Seite 889-99. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15998244](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15998244)
- Banning, A.; Schnurr, K.; Bol, G. F.; Kupper, D.; Muller-Schmehl, K.; Viita, H.; Yla-Herttuala, S. und Brigelius-Flohe, R. (2004): Inhibition of basal and interleukin-1-induced VCAM-1 expression by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and 15-lipoxygenase in rabbit aortic smooth muscle cells, *Free Radic Biol Med* 36 [2], Seite 135-44. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14744625](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14744625)
- Bassell, G. J.; Oleynikov, Y. und Singer, R. H. (1999): The travels of mRNAs through all cells large and small, *Faseb J* 13 [3], Seite 447-54. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10064611](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10064611)
- Baum, J. S.; St George, J. P. und McCall, K. (2005): Programmed cell death in the germline, *Semin Cell Dev Biol* 16 [2], Seite 245-59. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15797835](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15797835)

- Behne, D.; Kyriakopoulos, A.; Weiss-Nowak, C.; Kalckloesch, M.; Westphal, C. und Gessner, H. (1996): Newly found selenium-containing proteins in the tissues of the rat, *Biol Trace Elem Res* 55 [1-2], Seite 99-110. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8971358](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8971358)
- Behne, D. und Kyriakopoulos, A. (2001): Mammalian selenium-containing proteins, *Annu Rev Nutr* 21, Seite 453-73. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11375445](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11375445)
- Behne, D.; Weiler, H. und Kyriakopoulos, A. (1996): Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats, *J Reprod Fertil* 106 [2], Seite 291-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8699413](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8699413)
- Behne, D. und Wolters, W. (1983): Distribution of selenium and glutathione peroxidase in the rat, *J Nutr* 113 [2], Seite 456-61. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6822915](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6822915)
- Belkner, J.; Stender, H. und Kuhn, H. (1998): The rabbit 15-lipoxygenase preferentially oxygenates LDL cholesterol esters, and this reaction does not require vitamin E, *J Biol Chem* 273 [36], Seite 23225-32. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9722553](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9722553)
- Bellorini, M.; Lee, D. K.; Dantonel, J. C.; Zemzoumi, K.; Roeder, R. G.; Tora, L. und Mantovani, R. (1997): CCAAT binding NF-Y-TBP interactions: NF-YB and NF-YC require short domains adjacent to their histone fold motifs for association with TBP basic residues, *Nucleic Acids Res* 25 [11], Seite 2174-81. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9153318](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9153318)
- Benoist, C.; O'Hare, K.; Breathnach, R. und Chambon, P. (1980): The ovalbumin gene-sequence of putative control regions, *Nucleic Acids Res* 8 [1], Seite 127-42. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6243777](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6243777)
- Bermano, G.; Arthur, J. R. und Hesketh, J. E. (1996): Role of the 3' untranslated region in the regulation of cytosolic glutathione peroxidase and phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase gene expression by selenium supply, *Biochem J* 320 ( Pt 3), Seite 891-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9003377](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9003377)
- Bernard, D. J. (2003): Editorial commentary: SMAD expression in the testis predicts age- and cell-specific responses to activin and TGFbeta, *J Androl* 24 [2], Seite 201-3. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12634306](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12634306)
- Bernstein, D. S.; Buter, N.; Stumpf, C. und Wickens, M. (2002): Analyzing mRNA-protein complexes using a yeast three-hybrid system, *Methods* 26 [2], Seite 123-41. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12054889](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12054889)
- Birringer, M.; Pilawa, S. und Flohe, L. (2002): Trends in selenium biochemistry, *Nat Prod Rep* 19 [6], Seite 693-718. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12521265](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12521265)

- Björnstedt, M.; Xue, J.; Huang, W.; Akesson, B. und Holmgren, A. (1994): The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase, *J Biol Chem* 269 [47], Seite 29382-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7961915](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7961915)
- Blake, M. C.; Jambou, R. C.; Swick, A. G.; Kahn, J. W. und Azizkhan, J. C. (1990): Transcriptional initiation is controlled by upstream GC-box interactions in a TATAA-less promoter, *Mol Cell Biol* 10 [12], Seite 6632-41. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2247077](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2247077)
- Boisclair, Y. R.; Brown, A. L.; Casola, S. und Rechler, M. M. (1993): Three clustered Sp1 sites are required for efficient transcription of the TATA-less promoter of the gene for insulin-like growth factor-binding protein-2 from the rat, *J Biol Chem* 268 [33], Seite 24892-901. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7693708](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7693708)
- Borchert, A.; Savaskan, N. E. und Kuhn, H. (2003): Regulation of expression of the phospholipid hydroperoxide/sperm nucleus glutathione peroxidase gene. Tissue-specific expression pattern and identification of functional cis- and trans-regulatory elements, *J Biol Chem* 278 [4], Seite 2571-80. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12427732](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12427732)
- Boschan, C.; Borchert, A.; Ufer, C.; Thiele, B. J. und Kuhn, H. (2002): Discovery of a functional retrotransposon of the murine phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: chromosomal localization and tissue-specific expression pattern, *Genomics* 79 [3], Seite 387-94. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11863368](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11863368)
- Bouwman, P. und Philipsen, S. (2002): Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors, *Mol Cell Endocrinol* 195 [1-2], Seite 27-38. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12354670](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12354670)
- Boya, P.; Roques, B. und Kroemer, G. (2001): New EMBO members' review: viral and bacterial proteins regulating apoptosis at the mitochondrial level, *Embo J* 20 [16], Seite 4325-31. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11500358](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11500358)
- Brielmeier, M.; Bechet, J. M.; Suppmann, S.; Conrad, M.; Laux, G. und Bornkamm, G. W. (2001): Cloning of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) as an anti-apoptotic and growth promoting gene of Burkitt lymphoma cells, *Biofactors* 14 [1-4], Seite 179-90. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11568455](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11568455)
- Brigelius-Flohe, R. (1999): Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases, *Free Radic Biol Med* 27 [9-10], Seite 951-65. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10569628](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10569628)
- Brigelius-Flohe, R.; Aumann, K. D.; Blocker, H.; Gross, G.; Kiess, M.; Kloppel, K. D.; Maiorino, M.; Roveri, A.; Schuckelt, R.; Usani, F. und et al. (1994): Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence, *J Biol Chem* 269 [10], Seite 7342-8. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8125951](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8125951)
- Brigelius-Flohe, R.; Banning, A.; Kny, M. und Bol, G. F. (2004): Redox events in interleukin-1 signaling, *Arch Biochem Biophys* 423 [1], Seite 66-73. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14989266](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14989266)
- Brigelius-Flohe, R.; Friedrichs, B.; Maurer, S.; Schultz, M. und Streicher, R. (1997): Interleukin-1-induced nuclear factor kappa B activation is inhibited by overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in a human endothelial cell line, *Biochem J* 328 ( Pt 1), Seite 199-203. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9359853](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9359853)
- Brigelius-Flohe, R.; Maurer, S.; Lotzer, K.; Bol, G.; Kallionpaa, H.; Lehtolainen, P.; Viita, H. und Yla-Herttuala, S. (2000): Overexpression of PHGPx inhibits hydroperoxide-induced oxidation, NFkappaB activation and apoptosis and affects oxLDL-mediated proliferation of rabbit aortic smooth muscle cells, *Atherosclerosis* 152 [2], Seite 307-16. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10998458](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10998458)
- Brookes, P. S.; Levenon, A. L.; Shiva, S.; Sarti, P. und Darley-Usmar, V. M. (2002): Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species, *Free Radic Biol Med* 33 [6], Seite 755-64. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12208364](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12208364)
- Bucher, P. (1990): Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences, *J Mol Biol* 212 [4], Seite 563-78. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2329577](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2329577)
- Bunick, D.; Johnson, P. A.; Johnson, T. R. und Hecht, N. B. (1990): Transcription of the testis-specific mouse protamine 2 gene in a homologous in vitro transcription system, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 [3], Seite 891-5. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2300581](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2300581)
- Burley, S. K. und Roeder, R. G. (1996): Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID), *Annu Rev Biochem* 65, Seite 769-99. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8811195](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8811195)
- Caiafa, P. und Zampieri, M. (2005): DNA methylation and chromatin structure: the puzzling CpG islands, *J Cell Biochem* 94 [2], Seite 257-65. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15546139](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15546139)
- Carey, M. (1998): The enhanceosome and transcriptional synergy, *Cell* 92 [1], Seite 5-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9489694](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9489694)
- Carlson, B. A.; Novoselov, S. V.; Kumaraswamy, E.; Lee, B. J.; Anver, M. R.; Gladyshev, V. N. und Hatfield, D. L. (2004): Specific excision of the selenocysteine tRNA[Ser]Sec (Trsp) gene in mouse liver demonstrates an essential role of selenoproteins in liver function, *J Biol Chem* 279 [9], Seite 8011-7. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14660662](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14660662)
- Chambers, I.; Frampton, J.; Goldfarb, P.; Affara, N.; McBain, W. und 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 [6], Seite 1221-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3015592](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3015592)
- Chen, C. J.; Huang, H. S.; Lin, S. B. und Chang, W. C. (2000): Regulation of cyclooxygenase and 12-lipoxygenase catalysis by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in A431 cells, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 62 [4], Seite 261-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10882192](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10882192)
- Chen, F.; Ogawa, K.; Liu, X.; Stringfield, T. M. und Chen, Y. (2002): Repression of Smad2 and Smad3 transactivating activity by association with a novel splice variant of CCAAT-binding factor C subunit, *Biochem J* 364 [Pt 2], Seite 571-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12023901](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12023901)
- Chen, H.; Zhao, H.; Huang, L.; Baeyens, W. R.; Delanghe, J. R.; He, D. und Ouyang, J. (2005): Direct chemiluminescent imaging detection of Cu/Zn-superoxidase dismutase, glutathione peroxidase, carbonic anhydrase-III, and catalase in rat liver cytosol separated by native porous gradient polyacrylamide gel electrophoresis, *Electrophoresis* 26 [22], Seite 4260-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16287182](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16287182)
- Chen, M.E., Fraizer, G.C.; Ahmed, T.; Zheng, B.; Wilusz, J.; Wood, C. (1999): Investigation of the role of GRSF-1 RNA binding protein in prostate cancer progression, *Journal of Urology* 161 [4S], Seite 61.
- Chen, X.; Weisberg, E.; Fridmacher, V.; Watanabe, M.; Naco, G. und Whitman, M. (1997): Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor, *Nature* 389 [6646], Seite 85-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9288972](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9288972)
- Chiang, C. M. und Roeder, R. G. (1995): Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators, *Science* 267 [5197], Seite 531-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7824954](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7824954)
- Chu, F. F.; Doroshov, J. H. und Esworthy, R. S. (1993): Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI, *J Biol Chem* 268 [4], Seite 2571-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8428933](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8428933)
- Chu, F. F. und Esworthy, R. S. (1995): The expression of an intestinal form of glutathione peroxidase (GSHPx-GI) in rat intestinal epithelium, *Arch Biochem Biophys* 323 [2], Seite 288-94. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7487090](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7487090)
- Chu, S. und Ferro, T. J. (2005): Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation, *Gene* 348, Seite 1-11. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15777659](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15777659)
- Conrad, M.; Moreno, S. G.; Sinowatz, F.; Ursini, F.; Kollé, S.; Roveri, A.; Brielmeier, M.; Wurst, W.; Maiorino, M. und Bornkamm, G. W. (2005): The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability, *Mol Cell Biol* 25 [17], Seite 7637-44. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16107710](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16107710)
- Copeland, P. R.; Fletcher, J. E.; Carlson, B. A.; Hatfield, D. L. und Driscoll, D. M. (2000): A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs, *Embo J* 19 [2], Seite 306-14. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10637234](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10637234)
- Copeland, P. R.; Stepanik, V. A. und Driscoll, D. M. (2001): Insight into mammalian selenocysteine insertion: domain structure and ribosome binding properties of Sec insertion sequence binding protein 2, *Mol Cell Biol* 21 [5], Seite 1491-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11238886](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11238886)
- Courey, A. J.; Holtzman, D. A.; Jackson, S. P. und Tjian, R. (1989): Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1, *Cell* 59 [5], Seite 827-36. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2512012](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2512012)
- Courey, A. J. und Tjian, R. (1988): Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif, *Cell* 55 [5], Seite 887-98. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3142690](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3142690)
- Crawford, D. L.; Segal, J. A. und Barnett, J. L. (1999): Evolutionary analysis of TATA-less proximal promoter function, *Mol Biol Evol* 16 [2], Seite 194-207. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10028287](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10028287)
- Croteau, W.; Whittemore, S. L.; Schneider, M. J. und St Germain, D. L. (1995): Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase, *J Biol Chem* 270 [28], Seite 16569-75. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7622463](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7622463)
- Datta, P. K.; Blake, M. C. und Moses, H. L. (2000): Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression by transforming growth factor-beta -induced physical and functional interactions between smads and Sp1, *J Biol Chem* 275 [51], Seite 40014-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11054406](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11054406)
- Davey, J. C.; Becker, K. B.; Schneider, M. J.; St Germain, D. L. und Galton, V. A. (1995): Cloning of a cDNA for the type II iodothyronine deiodinase, *J Biol Chem* 270 [45], Seite 26786-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7592917](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7592917)
- Dawson, P. A.; Hofmann, S. L.; van der Westhuyzen, D. R.; Sudhof, T. C.; Brown, M. S. und Goldstein, J. L. (1988): Sterol-dependent repression of low density lipoprotein receptor promoter mediated by 16-base pair sequence adjacent to binding site for

- transcription factor Sp1, *J Biol Chem* 263 [7], Seite 3372-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3277969](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3277969)
- de Haan, J. B.; Bladier, C.; Griffiths, P.; Kelner, M.; O'Shea, R. D.; Cheung, N. S.; Bronson, R. T.; Silvestro, M. J.; Wild, S.; Zheng, S. S.; Beart, P. M.; Hertzog, P. J. und Kola, I. (1998): Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide, *J Biol Chem* 273 [35], Seite 22528-36. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9712879](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9712879)
- de Haro, C.; Mendez, R. und Santoyo, J. (1996): The eIF-2alpha kinases and the control of protein synthesis, *Faseb J* 10 [12], Seite 1378-87. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8903508](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8903508)
- De Luca, A.; Sacchetta, P.; Di Ilio, C. und Favalaro, B. (2005): Identification and analysis of the promoter region of the human methionine sulphoxide reductase a gene, *Biochem J*. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16162094](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16162094)
- Demel, R. A.; Jordi, W.; Lambrechts, H.; van Damme, H.; Hovius, R. und de Kruijff, B. (1989): Differential interactions of apo- and holocytochrome c with acidic membrane lipids in model systems and the implications for their import into mitochondria, *J Biol Chem* 264 [7], Seite 3988-97. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2537300](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2537300)
- Dennler, S.; Goumans, M. J. und ten Dijke, P. (2002): Transforming growth factor beta signal transduction, *J Leukoc Biol* 71 [5], Seite 731-40. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11994497](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11994497)
- Dennler, S.; Itoh, S.; Vivien, D.; ten Dijke, P.; Huet, S. und Gauthier, J. M. (1998): Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene, *Embo J* 17 [11], Seite 3091-100. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9606191](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9606191)
- Dooley, K. A.; Millinder, S. und Osborne, T. F. (1998): Sterol regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase gene through a direct interaction between sterol regulatory element binding protein and the trimeric CCAAT-binding factor/nuclear factor Y, *J Biol Chem* 273 [3], Seite 1349-56. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9430668](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9430668)
- Dreyfuss, G.; Kim, V. N. und Kataoka, N. (2002): Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry, *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 [3], Seite 195-205. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11994740](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11994740)
- Dynan, W. S. und Tjian, R. (1983): Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II, *Cell* 32 [3], Seite 669-80. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6187469](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6187469)

- Dynan, W. S. und Tjian, R. (1983): The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter, *Cell* 35 [1], Seite 79-87. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6313230](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6313230)
- Dynan, W. S. und Tjian, R. (1985): Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins, *Nature* 316 [6031], Seite 774-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=4041012](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4041012)
- Elliott, D. (2003): Pathways of post-transcriptional gene regulation in mammalian germ cell development, *Cytogenet Genome Res* 103 [3-4], Seite 210-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15051941](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15051941)
- Emami, K. H.; Navarre, W. W. und Smale, S. T. (1995): Core promoter specificities of the Sp1 and VP16 transcriptional activation domains, *Mol Cell Biol* 15 [11], Seite 5906-16. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7565743](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7565743)
- Emili, A.; Greenblatt, J. und Ingles, C. J. (1994): Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein, *Mol Cell Biol* 14 [3], Seite 1582-93. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8114696](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8114696)
- Esworthy, R. S.; Doan, K.; Doroshov, J. H. und Chu, F. F. (1994): Cloning and sequencing of the cDNA encoding a human testis phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, *Gene* 144 [2], Seite 317-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8039723](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8039723)
- Esworthy, R. S.; Mann, J. R.; Sam, M. und Chu, F. F. (2000): Low glutathione peroxidase activity in Gpx1 knockout mice protects jejunum crypts from gamma-irradiation damage, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279 [2], Seite G426-36. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10915653](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10915653)
- Faber, P. W.; van Rooij, H. C.; Schipper, H. J.; Brinkmann, A. O. und Trapman, J. (1993): Two different, overlapping pathways of transcription initiation are active on the TATA-less human androgen receptor promoter. The role of Sp1, *J Biol Chem* 268 [13], Seite 9296-301. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8486625](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8486625)
- Farina, A.; Manni, I.; Fontemaggi, G.; Tiainen, M.; Cenciarelli, C.; Bellorini, M.; Mantovani, R.; Sacchi, A. und Piaggio, G. (1999): Down-regulation of cyclin B1 gene transcription in terminally differentiated skeletal muscle cells is associated with loss of functional CCAAT-binding NF-Y complex, *Oncogene* 18 [18], Seite 2818-27. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10362252](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10362252)
- Fluck, C. E. und Miller, W. L. (2004): GATA-4 and GATA-6 modulate tissue-specific transcription of the human gene for P450c17 by direct interaction with Sp1, *Mol Endocrinol* 18 [5], Seite 1144-57. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14988427](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14988427)
- Forchhammer, K.; Leinfelder, W. und Bock, A. (1989): Identification of a novel translation factor necessary for the incorporation of selenocysteine into protein, *Nature* 342

- [6248], Seite 453-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2531290](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2531290)
- Foresta, C.; Flohe, L.; Garolla, A.; Roveri, A.; Ursini, F. und Maiorino, M. (2002): Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, *Biol Reprod* 67 [3], Seite 967-71. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12193409](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12193409)
- Forman, H. J.; Torres, M. und Fukuto, J. (2002): Redox signaling, *Mol Cell Biochem* 234-235 [1-2], Seite 49-62. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12162460](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12162460)
- Frederickson, R. M.; Micheau, M. R.; Iwamoto, A. und Miyamoto, N. G. (1989): 5' flanking and first intron sequences of the human beta-actin gene required for efficient promoter activity, *Nucleic Acids Res* 17 [1], Seite 253-70. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2911466](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2911466)
- Gebauer, F. und Hentze, M. W. (2004): Molecular mechanisms of translational control, *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 [10], Seite 827-35. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15459663](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15459663)
- Geng, Y. und Johnson, L. F. (1993): Lack of an initiator element is responsible for multiple transcriptional initiation sites of the TATA-less mouse thymidylate synthase promoter, *Mol Cell Biol* 13 [8], Seite 4894-903. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8336725](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8336725)
- Gingras, A. C.; Raught, B.; Gygi, S. P.; Niedzwiecka, A.; Miron, M.; Burley, S. K.; Polakiewicz, R. D.; Wyslouch-Cieszyńska, A.; Aebersold, R. und Sonenberg, N. (2001): Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1, *Genes Dev* 15 [21], Seite 2852-64. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11691836](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11691836)
- Girotti, A. W. (1998): Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems, *J Lipid Res* 39 [8], Seite 1529-42. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9717713](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9717713)
- Gladyshev, V. N.; Jeang, K. T.; Wootton, J. C. und Hatfield, D. L. (1998): A new human selenium-containing protein. Purification, characterization, and cDNA sequence, *J Biol Chem* 273 [15], Seite 8910-5. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9535873](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9535873)
- Godeas, C.; Sandri, G. und Panfili, E. (1994): Distribution of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) in rat testis mitochondria, *Biochim Biophys Acta* 1191 [1], Seite 147-50. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8155669](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8155669)
- Godeas, C.; Tramer, F.; Micali, F.; Roveri, A.; Maiorino, M.; Nisii, C.; Sandri, G. und Panfili, E. (1996): Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) in rat testis nuclei is bound to chromatin, *Biochem Mol Med* 59 [2], Seite 118-24. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8986633](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8986633)

- Godeas, C.; Tramer, F.; Micali, F.; Soranzo, M.; Sandri, G. und Panfili, E. (1997): Distribution and possible novel role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa, *Biol Reprod* 57 [6], Seite 1502-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9408261](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9408261)
- Goldstrohm, A. C.; Greenleaf, A. L. und Garcia-Blanco, M. A. (2001): Co-transcriptional splicing of pre-messenger RNAs: considerations for the mechanism of alternative splicing, *Gene* 277 [1-2], Seite 31-47. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11602343](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11602343)
- Gray, N. K. und Wickens, M. (1998): Control of translation initiation in animals, *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, Seite 399-458. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9891789](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9891789)
- Green, D. R. (1998): Apoptotic pathways: the roads to ruin, *Cell* 94 [6], Seite 695-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9753316](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9753316)
- Guarnieri, C.; Muscari, C. und Caldarera, C. M. (1992): Mitochondrial production of oxygen free radicals in the heart muscle during the life span of the rat: peak at middle age, *Exs* 62, Seite 73-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1333312](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1333312)
- Guimaraes, M. J.; Peterson, D.; Vicari, A.; Cocks, B. G.; Copeland, N. G.; Gilbert, D. J.; Jenkins, N. A.; Ferrick, D. A.; Kastelein, R. A.; Bazan, J. F. und 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 U S A* 93 [26], Seite 15086-91. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8986768](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8986768)
- Hatfield, D. L. und Gladyshev, V. N. (2002): How selenium has altered our understanding of the genetic code, *Mol Cell Biol* 22 [11], Seite 3565-76. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11997494](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11997494)
- Hattori, H.; Imai, H.; Furuhashi, K.; Sato, O. und Nakagawa, Y. (2005): Induction of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in human polymorphonuclear neutrophils and HL60 cells stimulated with TNF-alpha, *Biochem Biophys Res Commun* 337 [2], Seite 464-73. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16223606](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16223606)
- Heby, O. (1995): DNA methylation and polyamines in embryonic development and cancer, *Int J Dev Biol* 39 [5], Seite 737-57. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8645558](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8645558)
- Ho, Y. S.; Magnenat, J. L.; Bronson, R. T.; Cao, J.; Gargano, M.; Sugawara, M. und Funk, C. D. (1997): Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia, *J Biol Chem* 272 [26], Seite 16644-51. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9195979](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9195979)
- Hoey, T.; Weinzierl, R. O.; Gill, G.; Chen, J. L.; Dynlacht, B. D. und Tjian, R. (1993): Molecular cloning and functional analysis of *Drosophila* TAF110 reveal properties

- expected of coactivators, *Cell* 72 [2], Seite 247-60. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7678780](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7678780)
- Holcik, M. und Sonenberg, N. (2005): Translational control in stress and apoptosis, *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 [4], Seite 318-27. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15803138](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15803138)
- Hoodless, P. A.; Pye, M.; Chazaud, C.; Labbe, E.; Attisano, L.; Rossant, J. und Wrana, J. L. (2001): FoxH1 (Fast) functions to specify the anterior primitive streak in the mouse, *Genes Dev* 15 [10], Seite 1257-71. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11358869](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11358869)
- Huang, H. S.; Chang, W. C. und Chen, C. J. (2002): Involvement of reactive oxygen species in arsenite-induced downregulation of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in human epidermoid carcinoma A431 cells, *Free Radic Biol Med* 33 [6], Seite 864-73. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12208374](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12208374)
- Huang, H. S.; Chen, C. J. und Chang, W. C. (1999): The CCAAT-box binding factor NF-Y is required for the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in human epidermoid carcinoma A431 cells, *FEBS Lett* 455 [1-2], Seite 111-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10428483](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10428483)
- Huang, H. S.; Chen, C. J.; Lu, H. S. und Chang, W. C. (1998): Identification of a lipoxygenase inhibitor in A431 cells as a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, *FEBS Lett* 424 [1-2], Seite 22-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9537508](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9537508)
- Hurst, R.; Korytowski, W.; Kriska, T.; Esworthy, R. S.; Chu, F. F. und Girotti, A. W. (2001): Hyperresistance to cholesterol hydroperoxide-induced peroxidative injury and apoptotic death in a tumor cell line that overexpresses glutathione peroxidase isotype-4, *Free Radic Biol Med* 31 [9], Seite 1051-65. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11677038](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11677038)
- Hussmann, M.; Dragneva, Y.; Romahn, E. und Jehnichen, P. (2000): Nuclear receptors modulate the interaction of Sp1 and GC-rich DNA via ternary complex formation, *Biochem J* 352 Pt 3, Seite 763-72. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11104684](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11104684)
- Imai, H.; Hirao, F.; Sakamoto, T.; Sekine, K.; Mizukura, Y.; Saito, M.; Kitamoto, T.; Hayasaka, M.; Hanaoka, K. und Nakagawa, Y. (2003): Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene, *Biochem Biophys Res Commun* 305 [2], Seite 278-86. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12745070](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12745070)
- Imai, H.; Koumura, T.; Nakajima, R.; Nomura, K. und Nakagawa, Y. (2003): Protection from inactivation of the adenine nucleotide translocator during hypoglycaemia-induced apoptosis by mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, *Biochem J* 371 [Pt 3], Seite 799-809. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12534348](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12534348)

- Imai, H. und Nakagawa, Y. (2003): Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells, *Free Radic Biol Med* 34 [2], Seite 145-69. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12521597](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12521597)
- Imai, H.; Narashima, K.; Arai, M.; Sakamoto, H.; Chiba, N. und Nakagawa, Y. (1998): Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, *J Biol Chem* 273 [4], Seite 1990-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9442035](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9442035)
- Imai, H.; Sumi, D.; Sakamoto, H.; Hanamoto, A.; Arai, M.; Chiba, N. und Nakagawa, Y. (1996): Overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppressed cell death due to oxidative damage in rat basophile leukemia cells (RBL-2H3), *Biochem Biophys Res Commun* 222 [2], Seite 432-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8670223](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8670223)
- Imai, H.; Suzuki, K.; Ishizaka, K.; Ichinose, S.; Oshima, H.; Okayasu, I.; Emoto, K.; Umeda, M. und Nakagawa, Y. (2001): Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males, *Biol Reprod* 64 [2], Seite 674-83. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11159372](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11159372)
- Inagaki, Y.; Nemoto, T.; Nakao, A.; Dijke, Pt; Kobayashi, K.; Takehara, K. und Greenwel, P. (2001): Interaction between GC box binding factors and Smad proteins modulates cell lineage-specific alpha 2(I) collagen gene transcription, *J Biol Chem* 276 [19], Seite 16573-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11278686](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11278686)
- Inoue, T.; Kamiyama, J. und Sakai, T. (1999): Sp1 and NF-Y synergistically mediate the effect of vitamin D(3) in the p27(Kip1) gene promoter that lacks vitamin D response elements, *J Biol Chem* 274 [45], Seite 32309-17. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10542271](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10542271)
- Jiao, X.; Trifillis, P. und Kiledjian, M. (2002): Identification of target messenger RNA substrates for the murine deleted in azoospermia-like RNA-binding protein, *Biol Reprod* 66 [2], Seite 475-85. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11804965](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11804965)
- Kadonaga, J. T. (2002): The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II, *Exp Mol Med* 34 [4], Seite 259-64. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12515390](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12515390)
- Kadonaga, J. T.; Carner, K. R.; Masiarz, F. R. und Tjian, R. (1987): Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain, *Cell* 51 [6], Seite 1079-90. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3319186](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3319186)
- Kadonaga, J. T.; Courey, A. J.; Ladika, J. und Tjian, R. (1988): Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation, *Science* 242 [4885], Seite 1566-70. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3059495](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3059495)
- Kadonaga, J. T. und Tjian, R. (1986): Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 [16], Seite 5889-93. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3461465](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3461465)
- Kanz, C.; Aldebert, P.; Althorpe, N.; Baker, W.; Baldwin, A.; Bates, K.; Browne, P.; van den Broek, A.; Castro, M.; Cochrane, G.; Duggan, K.; Eberhardt, R.; Faruque, N.; Gamble, J.; Diez, F. G.; Harte, N.; Kulikova, T.; Lin, Q.; Lombard, V.; Lopez, R.; Mancuso, R.; McHale, M.; Nardone, F.; Silventoinen, V.; Sobhany, S.; Stoehr, P.; Tuli, M. A.; Tzouvara, K.; Vaughan, R.; Wu, D.; Zhu, W. und Apweiler, R. (2005): The EMBL Nucleotide Sequence Database, *Nucleic Acids Res* 33 [Database issue], Seite D29-33. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15608199](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15608199)
- Kash, J. C.; Cunningham, D. M.; Smit, M. W.; Park, Y.; Fritz, D.; Wilusz, J. und Katze, M. G. (2002): Selective translation of eukaryotic mRNAs: functional molecular analysis of GRSF-1, a positive regulator of influenza virus protein synthesis, *J Virol* 76 [20], Seite 10417-26. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12239318](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12239318)
- Kaufmann, J. und Smale, S. T. (1994): Direct recognition of initiator elements by a component of the transcription factor IID complex, *Genes Dev* 8 [7], Seite 821-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7926770](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7926770)
- Kean, K. M. (2003): The role of mRNA 5'-noncoding and 3'-end sequences on 40S ribosomal subunit recruitment, and how RNA viruses successfully compete with cellular mRNAs to ensure their own protein synthesis, *Biol Cell* 95 [3-4], Seite 129-39. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12867078](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12867078)
- Kingston, R. E. und Narlikar, G. J. (1999): ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity, *Genes Dev* 13 [18], Seite 2339-52. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10500090](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10500090)
- Kleene, K. C. (2003): Patterns, mechanisms, and functions of translation regulation in mammalian spermatogenic cells, *Cytogenet Genome Res* 103 [3-4], Seite 217-24. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15051942](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15051942)
- Knopp, E. A.; Arndt, T. L.; Eng, K. L.; Caldwell, M.; LeBoeuf, R. C.; Deeb, S. S. und O'Brien, K. D. (1999): Murine phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: cDNA sequence, tissue expression, and mapping, *Mamm Genome* 10 [6], Seite 601-5. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10341094](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10341094)
- Kohrle, J.; Brigelius-Flohe, R.; Bock, A.; Gartner, R.; Meyer, O. und Flohe, L. (2000): Selenium in biology: facts and medical perspectives, *Biol Chem* 381 [9-10], Seite 849-64. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11076017](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11076017)

- Krikun, G. und Lockwood, C. J. (2002): Steroid hormones, endometrial gene regulation and the Sp1 family of proteins, *J Soc Gynecol Investig* 9 [6], Seite 329-34. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12445596](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12445596)
- Kryukov, G. V.; Kryukov, V. M. und Gladyshev, V. N. (1999): New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements, *J Biol Chem* 274 [48], Seite 33888-97. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10567350](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10567350)
- Kühn, H. (1996): Biosynthesis, metabolization and biological importance of the primary 15-lipoxygenase metabolites 15-hydro(pero)XY-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid and 13-hydro(pero)XY-9Z,11E-octadecadienoic acid, *Prog Lipid Res* 35 [3], Seite 203-26. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9082450](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9082450)
- Kühn, H. und Borchert, A. (2002): Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes, *Free Radic Biol Med* 33 [2], Seite 154-72. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12106812](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12106812)
- Labbe, E.; Silvestri, C.; Hoodless, P. A.; Wrana, J. L. und Attisano, L. (1998): Smad2 and Smad3 positively and negatively regulate TGF beta-dependent transcription through the forkhead DNA-binding protein FAST2, *Mol Cell* 2 [1], Seite 109-20. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9702197](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9702197)
- Latchman, D. S. (1990): Eukaryotic transcription factors, *Biochem J* 270 [2], Seite 281-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2119171](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2119171)
- Le Hir, H.; Moore, M. J. und Maquat, L. E. (2000): Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions, *Genes Dev* 14 [9], Seite 1098-108. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10809668](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10809668)
- Lee, J. K.; Tam, J. W.; Tsai, M. J. und Tsai, S. Y. (1992): Identification of cis- and trans-acting factors regulating the expression of the human insulin receptor gene, *J Biol Chem* 267 [7], Seite 4638-45. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1311316](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1311316)
- Lei, X. G. und Cheng, W. H. (2002): Analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase mRNA, *Methods Mol Biol* 196, Seite 183-93. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12152197](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12152197)
- Lei, X. G.; Evenson, J. K.; Thompson, K. M. und Sunde, R. A. (1995): Glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase are differentially regulated in rats by dietary selenium, *J Nutr* 125 [6], Seite 1438-46. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7782896](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7782896)
- Lemaigre, F. P.; Courtois, S. J.; Lafontaine, D. A. und Rousseau, G. G. (1989): Evidence that the upstream stimulatory factor and the Sp1 transcription factor bind in vitro to the

- promoter of the human-growth-hormone gene, *Eur J Biochem* 181 [3], Seite 555-61.  
URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2659342](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2659342)
- Lescure, A.; Gautheret, D.; Carbon, P. und Krol, A. (1999): Novel selenoproteins identified in silico and in vivo by using a conserved RNA structural motif, *J Biol Chem* 274 [53], Seite 38147-54. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10608886](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10608886)
- Lewis, J. D. und Izaurralde, E. (1997): The role of the cap structure in RNA processing and nuclear export, *Eur J Biochem* 247 [2], Seite 461-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9266685](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9266685)
- Li, B.; Adams, C. C. und Workman, J. L. (1994): Nucleosome binding by the constitutive transcription factor Sp1, *J Biol Chem* 269 [10], Seite 7756-63. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8126002](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8126002)
- Li, E.; Bestor, T. H. und Jaenisch, R. (1992): Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality, *Cell* 69 [6], Seite 915-26. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1606615](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1606615)
- Lickert, H.; Cox, B.; Wehrle, C.; Taketo, M. M.; Kemler, R. und Rossant, J. (2005): Dissecting Wnt/beta-catenin signaling during gastrulation using RNA interference in mouse embryos, *Development* 132 [11], Seite 2599-609. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15857914](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15857914)
- Low, S. C. und Berry, M. J. (1996): Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes, *Trends Biochem Sci* 21 [6], Seite 203-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8744353](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8744353)
- Low, S. C.; Grundner-Culemann, E.; Harney, J. W. und Berry, M. J. (2000): SECIS-SBP2 interactions dictate selenocysteine incorporation efficiency and selenoprotein hierarchy, *Embo J* 19 [24], Seite 6882-90. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11118223](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11118223)
- Maiorino, M.; Aumann, K. D.; Brigelius-Flohe, R.; Doria, D.; van den Heuvel, J.; McCarthy, J.; Roveri, A.; Ursini, F. und Flohe, L. (1995): Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx), *Biol Chem Hoppe Seyler* 376 [11], Seite 651-60. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8962674](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8962674)
- Maiorino, M.; Bosello, V.; Ursini, F.; Foresta, C.; Garolla, A.; Scapin, M.; Sztajer, H. und Flohe, L. (2003): Genetic variations of gpx-4 and male infertility in humans, *Biol Reprod* 68 [4], Seite 1134-41. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12606444](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12606444)
- Maiorino, M.; Mauri, P.; Roveri, A.; Benazzi, L.; Toppo, S.; Bosello, V. und Ursini, F. (2005): Primary structure of the nuclear forms of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) in rat spermatozoa, *FEBS Lett* 579 [3], Seite 667-70. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15670826](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15670826)
- Maiorino, M.; Wissing, J. B.; Brigelius-Flohe, R.; Calabrese, F.; Roveri, A.; Steinert, P.; Ursini, F. und 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], Seite 1359-70. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9761779](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9761779)
- Maity, S. N.; Vuorio, T. und de Crombrughe, B. (1990): The B subunit of a rat heteromeric CCAAT-binding transcription factor shows a striking sequence identity with the yeast Hap2 transcription factor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 [14], Seite 5378-82. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2196566](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2196566)
- Mangus, D. A.; Evans, M. C. und Jacobson, A. (2003): Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression, *Genome Biol* 4 [7], Seite 223. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12844354](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12844354)
- Mantovani, R. (1998): A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes, *Nucleic Acids Res* 26 [5], Seite 1135-43. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9469818](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9469818)
- Mantovani, R. (1999): The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y, *Gene* 239 [1], Seite 15-27. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10571030](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10571030)
- Marin, M.; Karis, A.; Visser, P.; Grosveld, F. und Philipsen, S. (1997): Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation, *Cell* 89 [4], Seite 619-28. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9160753](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9160753)
- Markesbery, W. R. und Carney, J. M. (1999): Oxidative alterations in Alzheimer's disease, *Brain Pathol* 9 [1], Seite 133-46. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9989456](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9989456)
- Martinez, E. (2002): Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription, *Plant Mol Biol* 50 [6], Seite 925-47. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12516863](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12516863)
- Mastrangelo, I. A.; Courey, A. J.; Wall, J. S.; Jackson, S. P. und Hough, P. V. (1991): DNA looping and Sp1 multimer links: a mechanism for transcriptional synergism and enhancement, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 [13], Seite 5670-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2062845](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2062845)
- Means, A. L. und Farnham, P. J. (1990): Transcription initiation from the dihydrofolate reductase promoter is positioned by HIP1 binding at the initiation site, *Mol Cell Biol* 10 [2], Seite 653-61. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2300058](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2300058)
- Merika, M. und Orkin, S. H. (1995): Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and

- EKLF, *Mol Cell Biol* 15 [5], Seite 2437-47. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7739528](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7739528)
- Mills, G. C. (1957): Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown, *J Biol Chem* 229 [1], Seite 189-97. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=13491573](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13491573)
- Miranda-Vizueté, A.; Damdimopoulos, A. E.; Pedrajas, J. R.; Gustafsson, J. A. und Spyrou, G. (1999): Human mitochondrial thioredoxin reductase cDNA cloning, expression and genomic organization, *Eur J Biochem* 261 [2], Seite 405-12. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10215850](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10215850)
- Mitchell, J. H.; Nicol, F.; Beckett, G. J. und Arthur, J. R. (1997): Selenium and iodine deficiencies: effects on brain and brown adipose tissue selenoenzyme activity and expression, *J Endocrinol* 155 [2], Seite 255-63. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9415060](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9415060)
- Mitchell, P. J. und Tjian, R. (1989): Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins, *Science* 245 [4916], Seite 371-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2667136](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2667136)
- Monteiro, H. P. und Stern, A. (1996): Redox modulation of tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways, *Free Radic Biol Med* 21 [3], Seite 323-33. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8855443](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8855443)
- Moreno, S. G.; Laux, G.; Brielmeier, M.; Bornkamm, G. W. und Conrad, M. (2003): Testis-specific expression of the nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx), *Biol Chem* 384 [4], Seite 635-43. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12751792](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12751792)
- Morley, S. J.; Curtis, P. S. und Pain, V. M. (1997): eIF4G: translation's mystery factor begins to yield its secrets, *Rna* 3 [10], Seite 1085-104. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9326485](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9326485)
- Motsenbocker, M. A. und Tappel, A. L. (1984): Effect of dietary selenium on plasma selenoprotein P, selenoprotein P1 and glutathione peroxidase in the rat, *J Nutr* 114 [2], Seite 279-85. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6693989](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6693989)
- Motta, M. C.; Caretti, G.; Badaracco, G. F. und Mantovani, R. (1999): Interactions of the CCAAT-binding trimer NF-Y with nucleosomes, *J Biol Chem* 274 [3], Seite 1326-33. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9880503](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9880503)
- Müller, C.; Wingler, K. und Brigelius-Flohe, R. (2003): 3'UTRs of glutathione peroxidases differentially affect selenium-dependent mRNA stability and selenocysteine incorporation efficiency, *Biol Chem* 384 [1], Seite 11-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12674495](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12674495)

- Nagdas, S. K.; Winfrey, V. P. und Olson, G. E. (2005): Tyrosine phosphorylation generates multiple isoforms of the mitochondrial capsule protein, phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx), during hamster sperm capacitation, *Biol Reprod* 72 [1], Seite 164-71. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15385412](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15385412)
- Nam, S.; Nakamuta, N.; Kurohmaru, M. und Hayashi, Y. (1997): Cloning and sequencing of the mouse cDNA encoding a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, *Gene* 198 [1-2], Seite 245-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9370288](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9370288)
- Nam, S. Y.; Fujisawa, M.; Kim, J. S.; Kurohmaru, M. und Hayashi, Y. (1998): Expression pattern of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase messenger ribonucleic acid in mouse testis, *Biol Reprod* 58 [5], Seite 1272-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9603263](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9603263)
- Nam, S.-Y.; H.-Y., Youn; Ogawa, K.; M., Kurohmaru und Y., Hayashi (1997): Expression of Mitochondrial Capsule Selenoprotein mRNA Increases with Aging, but Decreases by Selenium Deficiency in the Mouse Testis., *Journal of Reproduction and Development* 43 [3], Seite 227-234.
- Nayernia, K.; Diaconu, M.; Aumuller, G.; Wennemuth, G.; Schwandt, I.; Kleene, K.; Kuehn, H. und Engel, W. (2004): Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: expression pattern during testicular development in mouse and evolutionary conservation in spermatozoa, *Mol Reprod Dev* 67 [4], Seite 458-64. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14991737](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14991737)
- Neugebauer, K. M. (2002): On the importance of being co-transcriptional, *J Cell Sci* 115 [Pt 20], Seite 3865-71. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12244124](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12244124)
- Nomura, K.; Imai, H.; Koumura, T.; Arai, M. und Nakagawa, Y. (1999): Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway, *J Biol Chem* 274 [41], Seite 29294-302. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10506188](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10506188)
- Nomura, K.; Imai, H.; Koumura, T.; Kobayashi, T. und Nakagawa, Y. (2000): Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis, *Biochem J* 351 [Pt 1], Seite 183-93. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10998361](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10998361)
- Nomura, K.; Imai, H.; Koumura, T. und Nakagawa, Y. (2001): Involvement of mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase as an antiapoptotic factor, *Biol Signals Recept* 10 [1-2], Seite 81-92. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11223642](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11223642)
- Orphanides, G. und Reinberg, D. (2000): RNA polymerase II elongation through chromatin, *Nature* 407 [6803], Seite 471-5. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11028991](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11028991)

- Park, Y. W.; Wilusz, J. und Katze, M. G. (1999): Regulation of eukaryotic protein synthesis: selective influenza viral mRNA translation is mediated by the cellular RNA-binding protein GRSF-1, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [12], Seite 6694-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10359774](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10359774)
- Pascal, E. und Tjian, R. (1991): Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism, *Genes Dev* 5 [9], Seite 1646-56. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1885006](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1885006)
- Pazin, M. J.; Sheridan, P. L.; Cannon, K.; Cao, Z.; Keck, J. G.; Kadonaga, J. T. und Jones, K. A. (1996): NF-kappa B-mediated chromatin reconfiguration and transcriptional activation of the HIV-1 enhancer in vitro, *Genes Dev* 10 [1], Seite 37-49. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8557193](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8557193)
- Persengiev, S. P.; Raval, P. J.; Rabinovitch, S.; Millette, C. F. und Kilpatrick, D. L. (1996): Transcription factor Sp1 is expressed by three different developmentally regulated messenger ribonucleic acids in mouse spermatogenic cells, *Endocrinology* 137 [2], Seite 638-46. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8593813](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8593813)
- Pfeifer, H.; Conrad, M.; Roethlein, D.; Kyriakopoulos, A.; Brielmeier, M.; Bornkamm, G. W. und Behne, D. (2001): Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation, *Faseb J* 15 [7], Seite 1236-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11344099](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11344099)
- Pickering, B. M. und Willis, A. E. (2005): The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease, *Semin Cell Dev Biol* 16 [1], Seite 39-47. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15659338](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15659338)
- Porter, N. A.; Caldwell, S. E. und Mills, K. A. (1995): Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids, *Lipids* 30 [4], Seite 277-90. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7609594](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7609594)
- Proudfoot, N. J.; Furger, A. und Dye, M. J. (2002): Integrating mRNA processing with transcription, *Cell* 108 [4], Seite 501-12. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11909521](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11909521)
- Pugh, B. F. und Tjian, R. (1990): Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators, *Cell* 61 [7], Seite 1187-97. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2194667](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2194667)
- Puglisi, R.; Tramer, F.; Carlomagno, G.; Gandini, L.; Panfili, E.; Stefanini, M.; Lenzi, A.; Mangia, F. und Boitani, C. (2005): PHGPx in spermatogenesis: how many functions?, *Contraception* 72 [4], Seite 291-3. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16181973](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16181973)
- Puglisi, R.; Tramer, F.; Panfili, E.; Micali, F.; Sandri, G. und Boitani, C. (2003): Differential splicing of the phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene in diploid and haploid male germ cells in the rat, *Biol Reprod* 68 [2], Seite 405-11. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12533403](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12533403)
- Pushpa-Rekha, T. R.; Burdsall, A. L.; Oleksa, L. M.; Chisolm, G. M. und Driscoll, D. M. (1995): Rat phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. cDNA cloning and identification of multiple transcription and translation start sites, *J Biol Chem* 270 [45], Seite 26993-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7592947](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7592947)
- Qian, Z. und Wilusz, J. (1994): GRSF-1: a poly(A)+ mRNA binding protein which interacts with a conserved G-rich element, *Nucleic Acids Res* 22 [12], Seite 2334-43. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8036161](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8036161)
- Quandt, K.; Frech, K.; Karas, H.; Wingender, E. und Werner, T. (1995): MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data, *Nucleic Acids Res* 23 [23], Seite 4878-84. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8532532](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8532532)
- Ran, Q.; Liang, H.; Gu, M.; Qi, W.; Walter, C. A.; Roberts, L. J., 2nd; Herman, B.; Richardson, A. und Van Remmen, H. (2004): Transgenic mice overexpressing glutathione peroxidase 4 are protected against oxidative stress-induced apoptosis, *J Biol Chem* 279 [53], Seite 55137-46. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15496407](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15496407)
- Ran, Q.; Van Remmen, H.; Gu, M.; Qi, W.; Roberts, L. J., 2nd; Prolla, T. und Richardson, A. (2003): Embryonic fibroblasts from Gpx4<sup>+/-</sup> mice: a novel model for studying the role of membrane peroxidation in biological processes, *Free Radic Biol Med* 35 [9], Seite 1101-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14572612](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14572612)
- Reed, J. C. (1997): Cytochrome c: can't live with it--can't live without it, *Cell* 91 [5], Seite 559-62. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9393848](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9393848)
- Roder, K.; Wolf, S. S.; Beck, K. F. und Schweizer, M. (1997): Cooperative binding of NF-Y and Sp1 at the DNase I-hypersensitive site, fatty acid synthase insulin-responsive element 1, located at -500 in the rat fatty acid synthase promoter, *J Biol Chem* 272 [34], Seite 21616-24. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9261184](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9261184)
- Roder, K.; Wolf, S. S.; Larkin, K. J. und Schweizer, M. (1999): Interaction between the two ubiquitously expressed transcription factors NF-Y and Sp1, *Gene* 234 [1], Seite 61-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10393239](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10393239)
- Roeder, R. G. (1996): The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II, *Trends Biochem Sci* 21 [9], Seite 327-35. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8870495](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8870495)
- Ronchi, A.; Bellorini, M.; Mongelli, N. und Mantovani, R. (1995): CCAAT-box binding protein NF-Y (CBF, CP1) recognizes the minor groove and distorts DNA, *Nucleic Acids Res* 23 [22], Seite 4565-72. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8524643](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8524643)
- Roveri, A.; Casasco, A.; Maiorino, M.; Dalan, P.; Calligaro, A. und Ursini, F. (1992): Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. Gonadotropin dependence and immunocytochemical identification, *J Biol Chem* 267 [9], Seite 6142-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1556123](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1556123)
- Roveri, A.; Ursini, F.; Flohe, L. und Maiorino, M. (2001): PHGPx and spermatogenesis, *Biofactors* 14 [1-4], Seite 213-22. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11568459](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11568459)
- Saffer, J. D.; Jackson, S. P. und Annarella, M. B. (1991): Developmental expression of Sp1 in the mouse, *Mol Cell Biol* 11 [4], Seite 2189-99. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2005904](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2005904)
- Sakamoto, H.; Imai, H. und Nakagawa, Y. (2000): Involvement of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the modulation of prostaglandin D2 synthesis, *J Biol Chem* 275 [51], Seite 40028-35. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11010961](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11010961)
- Sattler, W.; Maiorino, M. und Stocker, R. (1994): Reduction of HDL- and LDL-associated cholesterylester and phospholipid hydroperoxides by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and Ebselen (PZ 51), *Arch Biochem Biophys* 309 [2], Seite 214-21. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8135530](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8135530)
- Schewe, T.; Halangk, W.; Hiebsch, C. und Rapoport, S. M. (1975): A lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria, *FEBS Lett* 60 [1], Seite 149-52. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6318](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6318)
- Schneider, R.; Agol, V. I.; Andino, R.; Bayard, F.; Cavener, D. R.; Chappell, S. A.; Chen, J. J.; Darlix, J. L.; Dasgupta, A.; Donze, O.; Duncan, R.; Elroy-Stein, O.; Farabaugh, P. J.; Filipowicz, W.; Gale, M., Jr.; Gehrke, L.; Goldman, E.; Groner, Y.; Harford, J. B.; Hatzglou, M.; He, B.; Hellen, C. U.; Hentze, M. W.; Hershey, J.; Hershey, P.; Hohn, T.; Holcik, M.; Hunter, C. P.; Igarashi, K.; Jackson, R.; Jagus, R.; Jefferson, L. S.; Joshi, B.; Kaempfer, R.; Katze, M.; Kaufman, R. J.; Kiledjian, M.; Kimball, S. R.; Kimchi, A.; Kirkegaard, K.; Koromilas, A. E.; Krug, R. M.; Kruys, V.; Lamphear, B. J.; Lemon, S.; Lloyd, R. E.; Maquat, L. E.; Martinez-Salas, E.; Mathews, M. B.; Mauro, V. P.; Miyamoto, S.; Mohr, I.; Morris, D. R.; Moss, E. G.; Nakashima, N.; Palmenberg, A.; Parkin, N. T.; Pe'ery, T.; Pelletier, J.; Peltz, S.; Pestova, T. V.; Pilipenko, E. V.; Prats, A. C.; Racaniello, V.; Read, G. S.; Rhoads, R. E.; Richter, J. D.; Rivera-Pomar, R.; Rouault, T.; Sachs, A.; Sarnow, P.; Scheper, G. C.; Schiff, L.; Schoenberg, D. R.; Semler, B. L.; Siddiqui, A.; Skern, T.; Sonenberg, N.; Tahara, S. M.; Thomas, A. A.; Toulme, J. J.; Wilusz, J.; Wimmer, E.; Witherell, G. und Wormington, M. (2001): New ways of initiating translation in eukaryotes, *Mol Cell Biol* 21 [23], Seite 8238-46. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11710333](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11710333)

- Schnurr, K.; Belkner, J.; Ursini, F.; Schewe, T. und Kuhn, H. (1996): The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase controls the activity of the 15-lipoxygenase with complex substrates and preserves the specificity of the oxygenation products, *J Biol Chem* 271 [9], Seite 4653-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8617728](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8617728)
- Schnurr, K.; Brinckmann, R. und Kuhn, H. (1999): Cytokine induced regulation of 15-lipoxygenase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammalian cells, *Adv Exp Med Biol* 469, Seite 75-81. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10667313](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10667313)
- Schwartz, D. C. und Parker, R. (1999): Mutations in translation initiation factors lead to increased rates of deadenylation and decapping of mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Cell Biol* 19 [8], Seite 5247-56. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10409716](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10409716)
- Sheth, U. und Parker, R. (2003): Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies, *Science* 300 [5620], Seite 805-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12730603](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12730603)
- Shi, Y. und Massague, J. (2003): Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus, *Cell* 113 [6], Seite 685-700. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12809600](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12809600)
- Shimizu, S.; Eguchi, Y.; Kamiike, W.; Waguri, S.; Uchiyama, Y.; Matsuda, H. und Tsujimoto, Y. (1996): Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors, *Oncogene* 13 [1], Seite 21-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8700549](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8700549)
- Singh, R. (2002): RNA-protein interactions that regulate pre-mRNA splicing, *Gene Expr* 10 [1-2], Seite 79-92. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11868989](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11868989)
- Sinha, S.; Maity, S. N.; Lu, J. und de Crombrughe, B. (1995): Recombinant rat CBF-C, the third subunit of CBF/NFY, allows formation of a protein-DNA complex with CBF-A and CBF-B and with yeast HAP2 and HAP3, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 [5], Seite 1624-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7878029](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7878029)
- Sirotkin, H. I.; Gates, M. A.; Kelly, P. D.; Schier, A. F. und Talbot, W. S. (2000): Fast1 is required for the development of dorsal axial structures in zebrafish, *Curr Biol* 10 [17], Seite 1051-4. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10996072](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10996072)
- Smale, S. T. (1997): Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes, *Biochim Biophys Acta* 1351 [1-2], Seite 73-88. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9116046](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9116046)
- Smale, S. T.; Schmidt, M. C.; Berk, A. J. und Baltimore, D. (1990): Transcriptional activation by Sp1 as directed through TATA or initiator: specific requirement for mammalian

- transcription factor IID, Proc Natl Acad Sci U S A 87 [12], Seite 4509-13. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2141169](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2141169)
- Smith, K. J.; Kapoor, R. und Felts, P. A. (1999): Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species, Brain Pathol 9 [1], Seite 69-92. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9989453](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9989453)
- Sneddon, A. A.; Wu, H. C.; Farquharson, A.; Grant, I.; Arthur, J. R.; Rotondo, D.; Choe, S. N. und Wahle, K. W. (2003): Regulation of selenoprotein GPx4 expression and activity in human endothelial cells by fatty acids, cytokines and antioxidants, Atherosclerosis 171 [1], Seite 57-65. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14642406](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14642406)
- Sorensen, P. und Wintersberger, E. (1999): Sp1 and NF-Y are necessary and sufficient for growth-dependent regulation of the hamster thymidine kinase promoter, J Biol Chem 274 [43], Seite 30943-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10521489](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10521489)
- St Johnston, D. (1995): The intracellular localization of messenger RNAs, Cell 81 [2], Seite 161-70. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7736568](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7736568)
- Steller, H. (1995): Mechanisms and genes of cellular suicide, Science 267 [5203], Seite 1445-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7878463](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7878463)
- Strom, A. C.; Forsberg, M.; Lillhager, P. und Westin, G. (1996): The transcription factors Sp1 and Oct-1 interact physically to regulate human U2 snRNA gene expression, Nucleic Acids Res 24 [11], Seite 1981-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8668525](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8668525)
- Su, W.; Jackson, S.; Tjian, R. und Echols, H. (1991): DNA looping between sites for transcriptional activation: self-association of DNA-bound Sp1, Genes Dev 5 [5], Seite 820-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1851121](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1851121)
- Sun, Q. A.; Wu, Y.; Zappacosta, F.; Jeang, K. T.; Lee, B. J.; Hatfield, D. L. und Gladyshev, V. N. (1999): Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases, J Biol Chem 274 [35], Seite 24522-30. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10455115](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10455115)
- Sun, X.; Li, X.; Moriarty, P. M.; Henics, T.; LaDuca, J. P. und Maquat, L. E. (2001): Nonsense-mediated decay of mRNA for the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is detectable in cultured cells but masked or inhibited in rat tissues, Mol Biol Cell 12 [4], Seite 1009-17. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11294903](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11294903)
- Sutovsky, P.; Moreno, R. D.; Ramalho-Santos, J.; Dominko, T.; Simerly, C. und Schatten, G. (1999): Ubiquitin tag for sperm mitochondria, Nature 402 [6760], Seite 371-2. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10586873](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10586873)

- Sutovsky, P. und Schatten, G. (2000): Paternal contributions to the mammalian zygote: fertilization after sperm-egg fusion, *Int Rev Cytol* 195, Seite 1-65. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10603574](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10603574)
- Suzuki, Y.; Tsunoda, T.; Sese, J.; Taira, H.; Mizushima-Sugano, J.; Hata, H.; Ota, T.; Isogai, T.; Tanaka, T.; Nakamura, Y.; Suyama, A.; Sakaki, Y.; Morishita, S.; Okubo, K. und Sugano, S. (2001): Identification and characterization of the potential promoter regions of 1031 kinds of human genes, *Genome Res* 11 [5], Seite 677-84. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11337467](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11337467)
- Takahashi, K.; Avissar, N.; Whitin, J. und Cohen, H. (1987): Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme, *Arch Biochem Biophys* 256 [2], Seite 677-86. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3619451](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3619451)
- Tamura, T. und Stadtman, T. C. (1996): A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 [3], Seite 1006-11. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8577704](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8577704)
- Tanaka, H. und Baba, T. (2005): Gene expression in spermiogenesis, *Cell Mol Life Sci* 62 [3], Seite 344-54. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15723169](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15723169)
- Tanese, N.; Pugh, B. F. und Tjian, R. (1991): Coactivators for a proline-rich activator purified from the multisubunit human TFIID complex, *Genes Dev* 5 [12A], Seite 2212-24. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1748279](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1748279)
- Tanese, N.; Saluja, D.; Vassallo, M. F.; Chen, J. L. und Admon, A. (1996): Molecular cloning and analysis of two subunits of the human TFIID complex: hTAFII130 and hTAFII100, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 [24], Seite 13611-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8942982](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8942982)
- Thomas, J. P.; Geiger, P. G.; Maiorino, M.; Ursini, F. und Girotti, A. W. (1990): Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteins, *Biochim Biophys Acta* 1045 [3], Seite 252-60. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2386798](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2386798)
- Tramer, F.; Micali, F.; Sandri, G.; Bertoni, A.; Lenzi, A.; Gandini, L. und Panfili, E. (2002): Enzymatic and immunochemical evaluation of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) in testes and epididymal spermatozoa of rats of different ages, *Int J Androl* 25 [2], Seite 72-83. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11903656](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11903656)
- Tramer, F.; Vetere, A.; Martinelli, M.; Paroni, F.; Marsich, E.; Boitani, C.; Sandri, G. und Panfili, E. (2004): cAMP-response element modulator-tau activates a distinct promoter element for the expression of the phospholipid hydroperoxide/sperm nucleus glutathione peroxidase gene, *Biochem J* 383 [Pt 1], Seite 179-85. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15225122](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15225122)

- Travis, A.; Hagman, J. und Grosschedl, R. (1991): Heterogeneously initiated transcription from the pre-B- and B-cell-specific mb-1 promoter: analysis of the requirement for upstream factor-binding sites and initiation site sequences, *Mol Cell Biol* 11 [11], Seite 5756-66. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1922076](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1922076)
- Trinh, L. A.; Meyer, D. und Stainier, D. Y. (2003): The Mix family homeodomain gene *bonnie* and *clyde* functions with other components of the Nodal signaling pathway to regulate neural patterning in zebrafish, *Development* 130 [20], Seite 4989-98. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12930774](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12930774)
- Tujebajeva, R. M.; Copeland, P. R.; Xu, X. M.; Carlson, B. A.; Harney, J. W.; Driscoll, D. M.; Hatfield, D. L. und Berry, M. J. (2000): Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion, *EMBO Rep* 1 [2], Seite 158-63. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11265756](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11265756)
- Ursini, F.; Heim, S.; Kiess, M.; Maiorino, M.; Roveri, A.; Wissing, J. und Flohe, L. (1999): Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation, *Science* 285 [5432], Seite 1393-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10464096](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10464096)
- Ursini, F.; Maiorino, M. und Gregolin, C. (1985): The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, *Biochim Biophys Acta* 839 [1], Seite 62-70. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3978121](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3978121)
- Ursini, F.; Maiorino, M.; Valente, M.; Ferri, L. und Gregolin, C. (1982): Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides, *Biochim Biophys Acta* 710 [2], Seite 197-211. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7066358](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7066358)
- van der Velden, A. W. und Thomas, A. A. (1999): The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development, *Int J Biochem Cell Biol* 31 [1], Seite 87-106. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10216946](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10216946)
- van Leyen, K.; Duvoisin, R. M.; Engelhardt, H. und Wiedmann, M. (1998): A function for lipoxygenase in programmed organelle degradation, *Nature* 395 [6700], Seite 392-5. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9759730](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9759730)
- Venables, J. P. (2002): Alternative splicing in the testes, *Curr Opin Genet Dev* 12 [5], Seite 615-19. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12240623](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12240623)
- Venables, J. P. und Eperon, I. (1999): The roles of RNA-binding proteins in spermatogenesis and male infertility, *Curr Opin Genet Dev* 9 [3], Seite 346-54. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10377282](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10377282)

- Vendeland, S. C.; Beilstein, M. A.; Chen, C. L.; Jensen, O. N.; Barofsky, E. und Whanger, P. D. (1993): Purification and properties of selenoprotein W from rat muscle, *J Biol Chem* 268 [23], Seite 17103-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8349599](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8349599)
- Wahle, E. und Keller, W. (1996): The biochemistry of polyadenylation, *Trends Biochem Sci* 21 [7], Seite 247-50. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8755245](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8755245)
- Wandersee, N. J.; Ferris, R. C. und Ginder, G. D. (1996): Intronic and flanking sequences are required to silence enhancement of an embryonic beta-type globin gene, *Mol Cell Biol* 16 [1], Seite 236-46. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8524301](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8524301)
- Wang, H. P.; Qian, S. Y.; Schafer, F. Q.; Domann, F. E.; Oberley, L. W. und Buettner, G. R. (2001): Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase protects against singlet oxygen-induced cell damage of photodynamic therapy, *Free Radic Biol Med* 30 [8], Seite 825-35. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11295525](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11295525)
- Weinzierl, R. O.; Dynlacht, B. D. und Tjian, R. (1993): Largest subunit of Drosophila transcription factor IID directs assembly of a complex containing TBP and a coactivator, *Nature* 362 [6420], Seite 511-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8464492](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8464492)
- Weisberg, E.; Winnier, G. E.; Chen, X.; Farnsworth, C. L.; Hogan, B. L. und Whitman, M. (1998): A mouse homologue of FAST-1 transduces TGF beta superfamily signals and is expressed during early embryogenesis, *Mech Dev* 79 [1-2], Seite 17-27. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10349617](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10349617)
- Weiss, S. L. und Sunde, R. A. (1998): Cis-acting elements are required for selenium regulation of glutathione peroxidase-1 mRNA levels, *Rna* 4 [7], Seite 816-27. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9671054](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9671054)
- Weitzel, F. und Wendel, A. (1993): Selenoenzymes regulate the activity of leukocyte 5-lipoxygenase via the peroxide tone, *J Biol Chem* 268 [9], Seite 6288-92. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8454601](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8454601)
- Wickens, M. und Goldstrohm, A. (2003): Molecular biology. A place to die, a place to sleep, *Science* 300 [5620], Seite 753-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12730589](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12730589)
- Wiley, S. R.; Kraus, R. J. und Mertz, J. E. (1992): Functional binding of the "TATA" box binding component of transcription factor TFIID to the -30 region of TATA-less promoters, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 [13], Seite 5814-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1321424](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1321424)
- Wilkie, G. S.; Dickson, K. S. und Gray, N. K. (2003): Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors, *Trends Biochem Sci* 28 [4], Seite 182-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12713901](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12713901)

- Wilusz, C. J.; Wormington, M. und Peltz, S. W. (2001): The cap-to-tail guide to mRNA turnover, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 [4], Seite 237-46. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11283721](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11283721)
- Woolveridge, I.; de Boer-Brouwer, M.; Taylor, M. F.; Teerds, K. J.; Wu, F. C. und Morris, I. D. (1999): Apoptosis in the rat spermatogenic epithelium following androgen withdrawal: changes in apoptosis-related genes, *Biol Reprod* 60 [2], Seite 461-70. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9916015](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9916015)
- Wright, K. L.; Moore, T. L.; Vilen, B. J.; Brown, A. M. und Ting, J. P. (1995): Major histocompatibility complex class II-associated invariant chain gene expression is up-regulated by cooperative interactions of Sp1 and NF-Y, *J Biol Chem* 270 [36], Seite 20978-86. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7673122](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7673122)
- Wu, X.; Bishopric, N. H.; Discher, D. J.; Murphy, B. J. und Webster, K. A. (1996): Physical and functional sensitivity of zinc finger transcription factors to redox change, *Mol Cell Biol* 16 [3], Seite 1035-46. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8622648](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8622648)
- Xiong, S.; Chirala, S. S. und Wakil, S. J. (2000): Sterol regulation of human fatty acid synthase promoter I requires nuclear factor-Y- and Sp-1-binding sites, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 [8], Seite 3948-53. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10759542](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10759542)
- Xu, J.; Beyer, A. R.; Walker, W. H. und McGee, E. A. (2003): Developmental and stage-specific expression of Smad2 and Smad3 in rat testis, *J Androl* 24 [2], Seite 192-200. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12634305](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12634305)
- Yagi, K.; Komura, S.; Kojima, H.; Sun, Q.; Nagata, N.; Ohishi, N. und Nishikimi, M. (1996): Expression of human phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene for protection of host cells from lipid hydroperoxide-mediated injury, *Biochem Biophys Res Commun* 219 [2], Seite 486-91. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8605014](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8605014)
- Yant, L. J.; Ran, Q.; Rao, L.; Van Remmen, H.; Shibatani, T.; Belter, J. G.; Motta, L.; Richardson, A. und Prolla, T. A. (2003): The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults, *Free Radic Biol Med* 34 [4], Seite 496-502. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12566075](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12566075)
- Yoshikai, Y. (2001): Roles of prostaglandins and leukotrienes in acute inflammation caused by bacterial infection, *Curr Opin Infect Dis* 14 [3], Seite 257-63. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11964841](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11964841)
- Yoshimura, S.; Watanabe, K.; Suemizu, H.; Onozawa, T.; Mizoguchi, J.; Tsuda, K.; Hatta, H. und Moriuchi, T. (1991): Tissue specific expression of the plasma glutathione peroxidase gene in rat kidney, *J Biochem (Tokyo)* 109 [6], Seite 918-23. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1939013](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1939013)
- Zenklusen, D. und Stutz, F. (2001): Nuclear export of mRNA, FEBS Lett 498 [2-3], Seite 150-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11412847](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11412847)
- Zhao, C. und Meng, A. (2005): Sp1-like transcription factors are regulators of embryonic development in vertebrates, Dev Growth Differ 47 [4], Seite 201-11. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15921495](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15921495)
- Zhao, J.; Bilsland, A.; Hoare, S. F. und Keith, W. N. (2003): Involvement of NF-Y and Sp1 binding sequences in basal transcription of the human telomerase RNA gene, FEBS Lett 536 [1-3], Seite 111-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12586348](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12586348)
- Zhong, L. und Holmgren, A. (2000): Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations, J Biol Chem 275 [24], Seite 18121-8. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10849437](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10849437)
- Zhong, Z. D.; Hammani, K.; Bae, W. S. und DeClerck, Y. A. (2000): NF-Y and Sp1 cooperate for the transcriptional activation and cAMP response of human tissue inhibitor of metalloproteinases-2, J Biol Chem 275 [24], Seite 18602-10. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10764764](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10764764)
- Zhou, Q.; Lieberman, P. M.; Boyer, T. G. und Berk, A. J. (1992): Holo-TFIID supports transcriptional stimulation by diverse activators and from a TATA-less promoter, Genes Dev 6 [10], Seite 1964-74. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1398073](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1398073)
- Zhou, S.; Zawal, L.; Lengauer, C.; Kinzler, K. W. und Vogelstein, B. (1998): Characterization of human FAST-1, a TGF beta and activin signal transducer, Mol Cell 2 [1], Seite 121-7. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9702198](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9702198)
- Zinoni, F.; Birkmann, A.; Stadtman, T. C. und Bock, A. (1986): Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine-containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogen-lyase-linked) from Escherichia coli, Proc Natl Acad Sci U S A 83 [13], Seite 4650-4. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2941757](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2941757)
- Zwicker, J. und Muller, R. (1997): Cell-cycle regulation of gene expression by transcriptional repression, Trends Genet 13 [1], Seite 3-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9009839](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9009839)

Anhang

## Danksagung

Ich möchte folgenden Personen danken, ohne die ich meine Arbeit nicht hätte vollenden können:

Prof. Dr. Hartmut Kühn, dass ich in seiner Arbeitsgruppe die Möglichkeit hatte zu arbeiten und mich zu entfalten sowie für die wohl dosierten Denkanstöße.

Dr. Astrid Borchert, die mich seit meinen ersten Gehversuchen in der Laborwelt ständig unterstützt hat und mir immer offener und kritischer Diskussionspartner war und hoffentlich auch sein wird.

Heike Schiebel, die goldene Hände beim Klonepicken hat und zu einem lieben Freund geworden ist.

... und alle anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe von Professor Kühn, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Die Arbeiten mit dem Hefe-Drei Hydrid-System wären ohne die Unterstützung von David Bernstein an der Universität Wisconsin-Madison in den USA.

Einen großen Dank auch an Chi Chiu „Ronald“ Wang an der chinesischen Universität von Hong Kong für die wunderbare und produktive Kooperation für die Arbeiten mit den Mausembryonen.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre konstante Unterstützung bedanken.

... und der allergrößte Dank an Dich, Stephan.

**Lebenslauf**

<b>Name:</b>	Christoph Ufer
<b>Email:</b>	<a href="mailto:christoph.ufer@charite.de">christoph.ufer@charite.de</a>
<b>Geburtsdatum, -ort:</b> 30.01.1976 in Potsdam-Babelsberg	
<b>Staatsangehörigkeit:</b>	deutsch
<b>Familienstand:</b>	ledig
<b>Schulausbildung:</b>	
1982 – 1988	Polytechnische Oberschule 11, Potsdam
1989 – 1995	Espengrund-Gymnasium, Potsdam, Abschluss: Abitur
<b>Zivildienst:</b>	
1995 – 1996	Grünflächenamt, Potsdam
<b>Studium:</b>	
10/1996 – 04/2002	Studium an der Humboldt-Universität zu Berlin in der Fachrichtung Biologie mit Diplom
12/1998	Diplom-Vorprüfung
10/1999 – 11/2000	Tätigkeit als stud. Hilfskraft am Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin
04/2002	Abschluss als Diplom-Biologe mit der Diplomarbeit zum Thema „Funktionelle Promotorstudien am Gen der murinen Phospholipid-Hydroperoxid Glutathion-Peroxidase“
seit 06/2002	Promotionsarbeit am Institut für Biochemie der Charité, Humboldt-Universität zu Berlin

Berlin, den

## Publikationen

**Ufer, C., Borchert A., et al.** (2003). "Functional characterization of cis- and trans-regulatory elements involved in expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase."

*Nucleic Acids Res* **31**(15): 4293-303.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12888488](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12888488).

**Ufer, C., et al.** (2006). „Guanine-rich sequence binding factor binds sequences within the 5'-untranslated region of the the phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase mRNA.“

In Vorbereitung.

Borchert, A., **Ufer, C., et al.** (2006). „Differentially expressed isoforms of the murine phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase are indispensable during embryogenesis.“

In Vorbereitung.

Fischer, K., Borchert, A., **Ufer, C., et al.** (2006). „Differential expression of secretoglobulins in benign an neoplastic ovaries.“

Eingereicht.

**Eidstattliche Erklärung**

Ich erkläre an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation in allen Teilen von mir selbständig angefertigt wurde und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben worden sind.

Berlin, den