

Aus dem Institut für Biochemie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zur Rolle der Glutathionperoxidase - 4 bei  
der Kontrolle des zellulären Redoxstatus und dessen  
Einfluss auf die Expressionsregulation von Sekretoglobinen  
beim Ovarialkarzinom

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Fischer

aus Dessau



Gutachter: 1. Prof. Dr. sc. med. H. Kühn

2. Prof. Dr. med. D. Hornung

3. Prof. Dr. rer. nat. I. Classen-Linke

Datum der Promotion: 25.10.2013



# Inhaltsverzeichnis

1	<b>Einleitung</b>	1
1.1	<b>Glutathionperoxidase 4</b>	1
1.1.1	Familie der Glutathionperoxidasen	1
1.1.2	Strukturelle Merkmale und Besonderheiten der GPx4	2
1.1.3	Isoformen der GPx4	3
1.1.4	Expression der Isoformen der GPx4 in Organismen und Geweben	4
1.1.5	Biologische Funktionen der GPx4	4
1.1.6	Zellmodelle	8
1.1.7	Knockout-Modelle der GPx4	9
1.2	<b>Pseudogene</b>	12
1.2.1	Retrotransposition und Duplikation zur Pseudogenbildung	13
1.2.2	Vorkommen und Verteilung von Pseudogenen in humanen und murinen Genom	15
1.2.3	Biologisch aktive Pseudogene u.a. GPx4-Pseudogen	16
1.3	<b>Sekretoglobine</b>	17
1.3.1	Genfamilie/ Gencluster	17
1.3.2	Strukturelle Merkmale der Sekretoglobine	18
1.3.3	Mitglieder der Sekretoglobinfamilie	19
1.3.4	Dysregulation in malignen Zellen	21
1.4	<b>Ovarialcarcinom</b>	24
1.4.1	Epidemiologie des Ovarialcarcinoms	24
1.4.2	Einteilung nach Histologie und Klinik (FIGO-Stadien)	24
1.4.3	Tumormarker: CA 125	27
1.4.4	Biomarker in der Diskussion	28
2	<b>Materialien und Methoden</b>	31
2.1	<b>Materialien</b>	31
2.1.1	Chemikalien und Gebrauchswaren	31
2.1.2	Geräte	32
2.1.3	Primer	34
2.1.4	Enzyme und Kits	35
2.1.5	Zelllinien und Gewebe	37
2.2	<b>Methoden</b>	40
2.2.1	Gewebe	40
2.2.2	RNA-Präparation	41
2.2.3	Untersuchung der Pseudogen-Expression	42
2.2.4	Herstellung von Zelllysaten	48
2.2.5	SDS-Gelelektrophorese	49
2.2.6	Western Blot	49
2.2.7	FACS-Analysen	50

2.2.8	Microarray-Untersuchungen	51
2.2.9	Untersuchung der ovariellen Gewebeproben	51
2.2.10	Untersuchungen RNA-Panel	52
2.2.11	Statistische Auswertung	55
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>57</b>
3.1	Expression von GPx4-Pseudogenen in Wildtyp- und heterozygoten Knockout-Mäusen	57
3.1.1	Genotypisierung des heterozygoten Knockout	57
3.1.2	Restriktionsstrategie	61
3.2	Zellphysiologische Rolle der GPx4	65
3.2.1	Microarray-Daten	69
3.2.2	MG1 und LP-B Expression in der stabilen Transfektante	70
3.3	Genexpression der Sekretoglobine im Ovarialcarcinom	72
3.3.1	Quantifizierungsregime	72
3.3.2	Mammaglobin 1	74
3.3.3	Lipophilin B	76
3.3.4	Mammaglobin 2	77
3.3.5	CA 125 im Serum	79
3.3.6	Expression von MG1, LP-B und GPx4 in humanen Geweben	82
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>89</b>
4.1	Glutathionperoxidase 4	89
4.1.1	Expression des GPx4-Pseudogens	89
4.2	Zellphysiologische Rolle der GPx4	95
4.2.1	Funktionelle Aspekte	95
4.2.2	GPx4 überexprimierende Zellen	96
4.2.3	Sekretoglobine in der stabilen Transfektante	97
4.3	Ausgewählte Sekretoglobine im Ovarialcarcinom	98
4.3.1	Mammaglobin 1 und Lipophilin B in Ovarialcarcinomen	98
4.3.2	Mammaglobin 2 (Lipophilin C) im Ovarialcarcinom	100
4.3.3	CA 125	101
4.4	Ausgewählte Sekretoglobine in humanen Geweben	102
4.4.1	Mammaglobin 1 in humanen Geweben	102
4.4.2	Lipophilin B in humanen Geweben	104
4.4.3	Koexpression von Mammaglobin 1 und Lipophilin B	104
4.4.4	Mammaglobin 2 in humanen Geweben	105
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>107</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>109</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>129</b>

7.1	Tabellarischer Lebenslauf	129
7.2	Selbständigkeitserklärung	131
7.3	Danksagung	133

## Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CA 125	Cancer Antigen 125
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbeccos modified Eagle´s medium
DNA	Desoxribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxribonukleotidtriphosphat
FACS-Analyse	Durchflusszytometrie (Flourescence activated cell sorting)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
Geo Mean	Geometrischer Mittelwert einer Fluoreszenzintensität
GPx	Glutathionperoxidase
GPx4	Phospholipidhydroperoxid- Glutathionperoxidase
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria Bertani Medium
Lip B	Lipophilin B
Lip C	Lipophilin C
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger Ribonucleic Acid)
MG	Molekulargewicht
MG 1	Mammaglobin 1
MG 2	Mammaglobin 2
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase chain reaction
PG	Pseudogen
PSE	Pseudogen
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rounds per minute)
RT	Reverse Transkription
SCGB	Sekretoglobin (Secretoglobine)
UGB	Uteroglobin



# 1 Einleitung

## 1.1 Glutathionperoxidase 4

### 1.1.1 Familie der Glutathionperoxidasen

Die Familie der Glutathionperoxidasen (GPx) umfasst nach derzeitigem Kenntnisstand sieben genetisch verschiedene Isoenzyme (Toppo et al., 2008) (Tab.1). Die Beschreibung der zellulären Glutathionperoxidase (GPx1) erfolgte nach Extraktion aus Schweine und Rattenleber (Mills, 1957). Nachfolgend wurden weitere Vertreter der Familie entdeckt: Phospholipid-Hydroperoxid Glutathion-Peroxidase (GPx4) (Ursini et al., 1982), der plasmatischen GPx (GPx3) (Maddipati und Marnett, 1987) und der gastrointestinalen Form (GPx2) (Chu et al., 1993). Zuletzt konnte eine Isoform der GPx4 isoliert werden, die eine Expression in den Nuclei der Spermien charakterisiert (Pfeifer et al., 2001). Anstelle eines Selenocysteins enthält diese Isoform ein Cystein im Aktiven Zentrum. Daraus resultierte die Bezeichnung als Non-Selenocystein GPx (GPx 7) (Utomo et al., 2004). Diese Isoform wird ubiquitär exprimiert, zeigt jedoch ein variables Expressionsverhalten in den Zellen der Brustdrüse. Zu der Familie der Glutathionperoxidasen werden zudem zwei Vertreter gezählt, die sich in ihrer Struktur von den übrigen Vertretern unterscheiden. So haben die GPx 6 und GPx7 ein Cystein im Aktiven Zentrum, während die fünf anderen Vertreter ein Selenocystein beherbergen.

Funktionell ist den Glutathionperoxidasen ein reduzierender Effekt gegenüber Wasserstoffperoxiden unter dem Verbrauch von Glutathion gemein. Ein kennzeichnendes Merkmal aller Vertreter ist ein Selenocystein im Aktiven Zentrum des Enzyms. Dieses ist eine wichtige Voraussetzung für eine regelrechte Funktion des Enzyms. Die Erstbeschreibung der GPx4 erfolgte zunächst als „Peroxid inhibierendes Protein“, das aus Schweineleber isoliert werden konnte (Ursini et al., 1982). Die Lokalisation des GPx4-Gens im humanen Genom ist für Chromosom 19p13.3 beschrieben. Das Gen besteht aus 7 Exons über eine Länge von 2,8kB (Kelner und Montoya, 1998) Im murinen Genom ist das Gen auf dem Chromosom 10 in der Nähe des Zentromers lokalisiert (Knopp et al., 1999).

Typ	Bezeichnung	Spezies	Höchste Expression
<b>GPx 1</b>	Klassische GPx	Mensch, Ratte, Maus, Rind, Hase	Lunge, Niere
<b>GPx 2</b>	Gastrointestinale GPx	Mensch, Ratte, Maus	Magen, Darm
<b>GPx 3</b>	Plasma GPx	Mensch, Ratte, Maus, Rind	Niere, Lunge
<b>GPx 4</b>	Phospholipid- Hydroperoxid GPx	Mensch, Ratte, Maus, Schwein	Testis, Spermatozoen
<b>GPx 5</b>	Epididymale GPx	Mensch, Ratte, Maus, Schwein, Hund, Affe, Pferd	Nebenhoden, Spermatozoen
<b>GPx 6</b>	OMP (olfactory metabolizing protein)	Mensch, Ratte, Maus	Olfaktorisches Epithel
<b>GPx 7</b>	Non-selenocysteine GPx4	Mensch, Maus	Brustdrüse, Fettgewebe

Tab. 1: Übersicht der Glutathionperoxidase-Isoformen mit Lokalisation und Bezeichnung

### 1.1.2 Strukturelle Merkmale und Besonderheiten der GPx4

Innerhalb der Familie der Glutathionperoxidasen nimmt die GPx4 eine Sonderstellung ein. Alle Vertreter der Familie der Glutathionperoxidasen, ausschließlich der GPx4, zeigen einen strukturellen Aufbau in Form von Tetrameren (Imai und Nakagawa, 2003). Die GPx4 zeigt als einziger Vertreter einen monomeren Aufbau mit einer geschätzten Molekulargewicht von 23kDa (Ursini et al., 1985) bei einer Länge von 170 Aminosäuren (Imai et al., 1995). Neben strukturellen Unterschieden differieren die Vertreter ebenfalls bezüglich der Substratspezifität. Während die Mitglieder der tetrameren Form auf Wasserstoffperoxide als Substrat beschränkt sind, kann die GPx4 zusätzlich Peroxide von Cholesterolester (Thomas et al., 1990) und Lipoproteinen (Sattler et al., 1994) enzymatisch verwerten und reduzieren. Eine Besonderheit ist, dass auch Lipidperoxide in Biomembranen durch die GPx4 reduziert werden können und so einen schützenden Effekt vor Membranschäden aufgrund von oxidativem Stress ausüben (Ursini und Bindoli, 1987). Neben ihrem eigentlichen Kofaktor Glutathion kann die GPx4 auch andere Thiolgruppen als Reduktionsäquivalent akzeptieren, insbesondere dann, wenn die Glutathionlevel sehr niedrig sind, was physiologischerweise vor allem in Spermien auftritt (Mauri et al., 2003; Roveri et al., 2001; Ursini et al., 1997). Als Selenoenzym zeigt sich die GPx4 zudem abhängig von vorliegenden Konzentrationen des Spurenelementes. Eine Abnahme der

Selenkonzentration führt ebenfalls zu einer Reduktion der GPx4-Aktivität (Weitzel et al., 1990).

### 1.1.3 Isoformen der GPx4

#### *Mitochondriale (mGPx4) und zytosolische Isoform (zGPx4)*

Für die GPx4 sind drei Isoformen bekannt, nämlich die mitochondriale (mGPx4), zytosolische (zGPx4) und nukleäre (nGPx4) Isoform. Dabei wurden zunächst zwei Isoformen, die mitochondriale und die zytosolische Form entdeckt (Arai et al., 1999). Die Größe beider Isoformen ist unterschiedlich, die mitochondriale Form enthält 197 Aminosäuren, während die zytosolische Form 170 Aminosäuren umfasst (Pushpa-Rekha et al., 1995). Für den Import in das Mitochondrium benötigt die Vorläufer-Form der GPx4 eine Signalsequenz. Diese Sequenz umfasst insgesamt 27 Aminosäuren und ist im ersten Exon des GPx4-Gens lokalisiert. Nach Import der GPx4 wird diese Sequenz abgespalten und die mitochondriale Form endet bei gleicher Länge der Aminosäuresequenz wie die zytosolische Form der GPx4 mit einem Molekulargewicht von 20kDa (Arai et al., 1996).

#### *Nukleäre Isoform (snGPx)*

Entsprechend der spezifischen Lokalisation in Nuclei von Spermatozoen und Zellen des Testis wird diese Isoform als Spermien-Nukleus Glutathionperoxidase (snGPx) bezeichnet. Das Selenoprotein mit einem Molekulargewicht von 34kDa wurde erstmals im testikulären Gewebe der Ratte beschrieben (Behne et al., 1988). Im Hinblick auf die anderen Isoformen der GPx4, zeigt sich eine hohe Sequenzhomologie der Transkripte. Die nukleäre Form der GPx4 wird durch Exon 2-7 des GPx4-Gens codiert (Maiorino et al., 2003). Ein alternatives Exon codiert das N-terminale Ende des Proteins, das eine Insertionssequenz zum Import in den Spermiennucleus enthält (Pfeifer et al., 2001). In Ratten findet sich die höchste Expression der snGPx in den Nuclei der Spermatozoen (Pfeifer et al., 2001).

<b>Isoform</b>	<b>Größe</b>	<b>Vorkommen</b>
mGPx4	23k-Da	Mitochondrien
cGPx4.	20-kDa	Nichtmitochondriale Form
snGPx4	34-kDa	Spermiennucleus

Tab. 2: Übersicht der einzelnen Isoformen der GPx4. Ergänzend ist die Lokalisation, sowie die Größe der einzelnen Isoformen angegeben.

#### 1.1.4 Expression der Isoformen der GPx4 in Organismen und Geweben

Im humanen Organismus zeigt sich eine ubiquitäre Expression des Enzyms, jedoch ist eine besonders hohe Expression im testikulären Gewebe auffällig (Roveri et al., 1994). Der Nachweis der höchsten GPx4-Aktivität konnte im Organismus der Ratte für Leber und Niere erbracht werden (Zhang et al., 1989). In murinen Geweben war ebenfalls eine ubiquitäre Expression der GPx4 evident (Baek et al., 2007). Im Testis war eine Expression von GPx4-mRNA in den Leydig-Zellen, Spermatozyten und verschiedenen Zellstadien der Spermatozytogenese beobachtet werden. Kein Nachweis des Enzyms konnte in Spermatozyten der frühen Stadien, sowie Spermatozytogenen erbracht werden.

#### 1.1.5 Biologische Funktionen der GPx4

Bei der Entdeckung des Enzyms GPx4 ist initial ein schützender Effekt des Enzyms vor der Peroxidation von Phospholipiden nachgewiesen worden (Ursini et al., 1982). Eine besondere Eigenschaft der GPx4 ist die Fähigkeit Phospholipidperoxide (Ursini et al., 1985), sowie Cholesterolester (Thomas et al., 1990) in Membranen direkt reduzieren zu können. Eine weitere Funktion der GPx4 in der Artherogenese wird diskutiert aufgrund der Beobachtung, dass die GPx4 Hydroperoxide in HDL- und LDL-Cholesterin reduzieren kann (Sattler et al., 1994). Daraus könnte ein möglicher protektiver Effekt des Selenoenzyms vor der Entstehung von Artherosklerose resultieren. Für das Selenoenzym GPx4 ist zudem ein Einfluß auf den Eicosanoidstoffwechsel beschrieben worden. Die GPx4 besitzt einen inhibierenden Effekt auf die Aktivierung der 5-Lipoxygenase (Haurand und Flohe, 1988) und 15-Lipoxygenase (Schnurr et al., 1996). Daraus resultieren auch Auswirkungen auf die Synthese von Leukotrienen, die vor allem während eines entzündlichen Geschehens durch die 5-Lipoxygenase gebildet werden (Engels und Nijkamp, 1998). Eine Überexpression der cytosolischen GPx4 führt zu einer Abnahme der Produktion an Leukotrienen (Imai et al., 1998). Daraus resultiert das Prinzip eines Gegenspielers der GPx4 gegenüber Mediatoren des Entzündungsstoffwechsels.

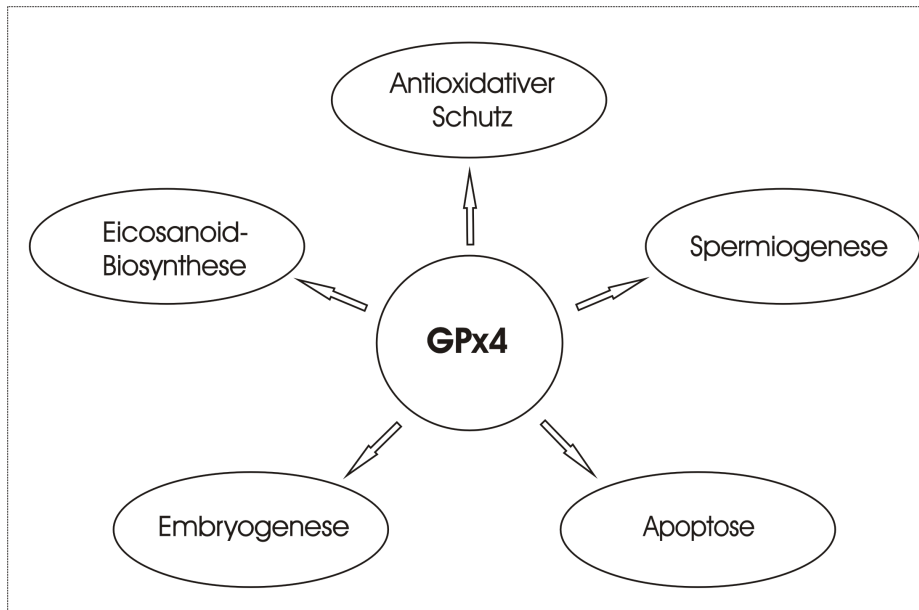


Abb. 1: Schematische Darstellung der verschiedenen biologischen Funktionen der GPx4. Zunächst war GPx4 als antioxidatives Enzym beschrieben worden (Ursini et al., 1982). Mit der Entdeckung weiterer Funktionen, scheint die GPx4 eine wichtige Rolle im Zellstoffwechsel einzunehmen.

Zur weiteren Analyse möglicher biologischer Effekte eines Enzyms ist das Studium von Zellmodellen etabliert. Dabei können direkte Auswirkungen auf die Zelle und ihren Stoffwechsel durch gezielte Veränderungen der Umgebungsfaktoren beobachtet werden. Ebenfalls können durch Veränderungen der Zelleigenschaften im Modell Rückschlüsse auf biologische Funktionen des Enzyms gezogen werden. Für das Enzym GPx4 sind verschiedene Zellmodelle betrachtet worden, die neben dem antioxidativen Effekt weitere biologische Funktionen des Enzyms erkennen ließen.

### *Oxidativer Stress*

Die biologische Relevanz der GPx4 im Zellstoffwechsel wird besonders deutlich bei Abwesenheit oder auch bei Überexpression des Enzyms. Zur Differenzierung welche Unterform des Enzyms diesem Effekt zugrunde liegt, erfolgten die weiteren Analysen anhand einer die mitochondriale Form der GPx4 überexprimierenden Zelllinie. Eine erhöhte Widerstandsfähigkeit dieser Zellen gegenüber oxidativem Stress und einer induzierten Apoptose, die die Vektorkontrolle im Vergleich durchlief, gezeigt werden. (Kriska et al., 2002). Diese Beobachtung deckt sich mit weiteren Ergebnissen, dass Zellen, die die mGPx4 überexprimieren eine vermehrte Resistenz gegenüber oxidativem Stress aufweisen. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von mGPx4 Zellen einer

Meerschweinchen-Zelllinie vor exogen zugeführten Peroxidschäden schützt (Yagi et al., 2002).

### *Spermatogenese und GPx4*

In der Spermatogenese kommt der GPx4 eine wichtige biologische Funktion zu. Als Mitglied der Familie der Selenoproteine scheint die GPx4 essentiell für die Entwicklung der Keimzellen zu sein. Die höchste Expression der GPx4 ist im testikulären Gewebe beschrieben worden (Roveri et al., 1992). Dabei konnte die höchste Enzymaktivität der GPx4 für Nucleus und Mitochondrien nachgewiesen werden. In Abhängigkeit von der hormonellen Entwicklung konnte im Testis der Ratte keine mGPx4-Aktivität nach der Geburt nachgewiesen werden. Vielmehr war ein Nachweis erst nach Wochen möglich, so dass die Vermutung einer Induktion der Enzymaktivität nach Einsetzen der Geschlechtsreife nahe liegt (Roveri et al., 1992). Ergänzend konnte ein linearer Anstieg der mGPx4-Aktivität zum Wachstum des Hodens in der Geschlechtsentwicklung gezeigt werden (Maiorino et al., 1998). In Spermatozoen der Ratte ist die GPx4 in Mitochondrien des Caputs und der Cauda lokalisiert (Godeas et al., 1997). Mit Verweis auf die Existenz von drei Isoformen der GPx4 scheinen vor allem die mitochondriale und die nukleäre Form eine entscheidende Funktion in der Spermatogenese einzunehmen. Dabei führt eine Reduktion der snGPx-Aktivität auf 30% zu schweren Störungen der Chromatin-Kondensation in Spermatozoen (Pfeifer et al., 2001). Bei gezieltem Ausschalten der nukleären Isoform ist die Fertilität im Mausmodell weiterhin erhalten (Conrad et al., 2005). Morphologisch fallen Veränderungen im Bereich des Caput der Spermatozoen, sowie eine gestörte Chromatin-Kondensation der Keimzellen auf. Bei Patienten mit Infertilität und nachgewiesener Oligoasthenozoospermie zeigten sich zum Teil deutlich erniedrigte Expressionslevel der mitochondrialen Isoform in den Spermatozoen (Imai et al., 2001). Zudem zeigten sich in den Spermatozyten der betroffenen Patienten morphologische Veränderungen der Mitochondrien. Ebenfalls war bei Patienten mit Oligoasthenozoospermie ein vermehrter intrazellulärer Anfall von Lipidperoxiden in Spermatozoen im Vergleich zu normofertilen Männern nachzuweisen (Zalata et al., 1998). Im Mausmodell führt ein Fehlen der mitochondrialen Isoform der GPx4 in Keimzellen zur Ausbildung von Infertilität (Schneider et al., 2009). Bei Patienten mit einer nachgewiesenen Asthenozoospermie waren in 24% der Fälle eine Reduktion der Expressionslevel der GPx4 im testikulären Gewebe nachweisbar. Genetische Veränderungen des GPx4-Gens, die ursächlich zu Störungen der Spermienentwicklung und

-funktion führen, konnten bei den betroffenen Patienten nicht nachgewiesen werden (Diaconu et al., 2006). Ebenso scheint eine ausreichende Bereitstellung des Spurenelementes Selen für die Fertilität von essentieller Bedeutung zu sein. Eine selenarme Diät führt nicht zu einer Abnahme der GPx4-Aktivität im testikulären Gewebe, jedoch zeigt sich die Enzymaktivität in der Leber um 28% reduziert (Lei et al., 1997). Anhand von in-vitro-Fertilisation konnte gezeigt werden, dass die Fertilisation von Oozyten durch Spermien von selen-defizienten Mäusen herabgesetzt ist (Sanchez-Gutierrez et al., 2008).

### *Embryogenese und GPx4*

Beim homozygoten GPx4-Knockout der Maus kommt es in der frühen Embryonalentwicklung zum Absterben der Frucht in utero (Yant et al., 2003). Die heterozygoten GPx4-Knockoutmodelle zeigen keine Auffälligkeiten in der Entwicklung und Fertilität (Imai et al., 2003). Bisher konnte der frühe Abort bei GPx4-Defizienz keiner Isoform zugeordnet werden. Durch Ausschalten der nukleären Form fielen in der Embryonalentwicklung eine Abnahme des Wachstums, sowie morphologische Veränderungen der kardialen Strukturen auf (Borchert et al., 2006). Die mitochondriale Form der GPx4 scheint in der cerebralen Entwicklung entscheidend zu sein; das Fehlen dieser Isoform der GPx4 führt zu einer erhöhten Apoptoserate im Rhombencephalon. In weiteren Betrachtungen u.a. von posttranskriptionellen Mechanismen, die diesem Effekt zuzuordnen sind, fiel auf, dass eine Koexpression von mGPx4 und eines Transkriptionsfaktor, das sog. Grsf1 im embryonalen Gehirn stattfindet (Ufer et al., 2008). Das Ausschalten dieses Faktors Grsf1 führt zu einer erniedrigten Expression der mGPx4 im embryonalen Gehirn. In der weiteren embryonalen Entwicklung kam es morphologisch zu Wachstumsstörungen von cerebralen Strukturen. Zusätzlich war in den betroffenen cerebralen Abschnitten eine vermehrte Apoptoserate und vermehrte Lipidperoxidation nachweisbar.

### *Apoptose/ Zellzyklus*

In weiteren Veröffentlichungen konnten die apoptosereduzierenden Eigenschaften von Zellen, die eine Überexpression der GPx4 auswiesen, dokumentiert werden. So konnte auch für die nicht-mitochondriale Form der GPx4 eine vermehrte Widerstandsfähigkeit gegenüber Peroxiden gezeigt werden (Imai et al., 1996). Im Vergleich kommt jedoch der mitochondrialen Form der GPx4 hinsichtlich des Schutzes der Zelle vor oxidativen

Schäden eine größere Bedeutung zu (Arai et al., 1999), (Wang et al., 2001). Im Prozess der Apoptose kommt einem Protein der Mitochondrienmembran, dem Cytochrom c eine zentrale Funktion zu. Dieses verfügt neben seiner Funktion in der Atmungskette der Mitochondrien zudem über einen proapoptotischen Effekt: Die Freisetzung von Cytochrom c aus der Mitochondrienmembran aktiviert die Kaskade der Apoptose (Skulachev, 1998). In einer weiteren Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der mitochondrialen GPx4 die Freisetzung von Cytochrom c und den apoptotischen Prozess verhindert (Nomura et al., 2000). Dabei scheint die mGPx4 keinen direkten Effekt auf die Membranproteine zu haben. Kausal ist ein Zusammenhang mit den erniedrigten intrazellulären Hydroperoxidleveln aufgrund der Überexpression der mGPx4 hergestellt worden. Damit verbunden kam es zu einer geringeren peroxidbedingten Schädigung der Mitochondrien. Unter Berücksichtigung des Ablaufes der Apoptose und der Funktion der Mitochondrien ist mehrfach die regulative Funktion der mitochondrialen Form der GPx4 betrachtet worden. So konnte gezeigt werden, dass der Vorgang der Apoptose bei Zellen, die die mGPx4 überexprimieren, unter bestimmten Konditionen nicht induziert wurde, während in vergleichbaren Zellen der apoptotische Weg über die Freisetzung von Cytochrom c eingeleitet wurde (Nomura et al., 1999). Apoptose-induzierende Eigenschaften sind zudem für das Tumorsuppressor-Gen p53 beschrieben worden (Sharpless und DePinho, 2002). Bei heterozygoten GPx4-defizienten Mäusen konnte eine vermehrte Freisetzung des Tumorsuppressor-p53-Proteins nachgewiesen werden (Edwards et al., 2007) als Hinweis für mögliche regulative Einflüsse der GPx4 in den Zellzyklus.

### 1.1.6 Zellmodelle

In vitro Zellmodelle mit einer Überexpression der mitochondrialen Form der GPx4 Zellen zeigen biologische Eigenschaften, die auf eine erhöhte Resistenz der Zelle gegenüber Umwelteinflüssen hinweist. Die mGPx4-überexprimierenden Zellen sind resistenter gegenüber der Lipidperoxidation an Membranen durch freie Radikale, als auch gegenüber Cholesterolphydroperoxide-induzierte Apoptose (Hurst et al., 2001). Weiterhin weisen selbige Zellen eine geringere Photosensitivität und damit assoziierte geringere Apoptoserate gegenüber photochemischer Toxizität auf (Kriska et al., 2002). In vitro konnte nach Induktion einer chemischen Hypoxie durch die Applikation von Atmungsketteninhibitoren eine vermehrte Toleranz gegenüber höheren Dosen im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden (Imai et al., 2003).



Zelllinie	Inhibitor	Effektor	Quelle
Meerschweinchen–Zellen (104C1)	mGPx4	Phospholipidhydroperoxid	(Yagi et al., 1998)
Meerschweinchen–Zellen (104C1)	mGPx4	Lipidhydroperoxide	(Yagi et al., 1996)
basophile Leukämiezellen der Ratten (RBL)	GPx4	Hypoglykämie	(Arai et al., 1999)
humane Brustkrebszelllinie (COH-BR1)	mGPx4	Cholesterolhydroperoxide	(Hurst et al., 2001)
humane Brustkrebszelllinie (MCF7)	mGPx4	Photoxizität	(Wang et al., 2001)
basophile Leukämiezellen der Ratten (RBL)	GPx4	u.a. Etoposide Cycloheximide Actinomycin D UV Bestrahlung	(Nomura et al., 1999)
humane Epidermoidcarcinom-Zellen (A431)	GPx4	Arsen	(Huang et al., 2002)
basophile Leukämiezellen der Ratte (RBL)	mGPx4	KCN	(Arai et al., 1999)
basophile Leukämiezellen der Ratte (RBL)	non-mitochondrial GPx4	AAPH	(Imai et al., 1996)

Tab. 3: Im Zellmodell ist die Überexpression der GPx4 vielseitig untersucht worden. Die Zellen sind verschiedenen Zellnoxen ausgesetzt gewesen. Die Zellen zeigen im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit normaler Expression der GPx4 eine höhere Stabilität und Resistenz gegenüber oxidativem Stress und apoptoseinduzierenden Zellnoxen.

Ebenfalls war eine erhöhte Resistenz der überexprimierenden mGPx4-Zellen gegenüber photochemisch induzierten Lipidperoxiden nachweisbar. Unter regulären Umständen führt die Anwendung sowohl der Atmungsketteninhibitoren, als auch die generiertem Lipidperoxide der photodynamischen Therapie früh zur Induktion des Apoptose im Zellmodell. In verschiedenen Zelllinien konnte eine vermehrte Resistenz der GPx4-überexprimierenden Zelle gegenüber der Exposition von verschiedenen Zellnoxen gezeigt werden (Tab.3). Die GPx4 nimmt einen wesentlichen Anteil des antioxidativen Schutzsystems der Zelle ein.

### 1.1.7 Knockout-Modelle der GPx4

#### *Homozygoter Knockout der Maus*

Der murine homozygote GPx4-Knockout ist nicht lebensfähig. Es kommt zu einem Absterben der Frucht in utero bereits am 7.5 Tag der Embryonalentwicklung (Imai et al., 2003). Bis zu diesem Entwicklungsstadium ist keine Expression des Enzyms GPx4 nachweisbar. Ab dem 7.5 Tag kann eine Expression der GPx4 im Ektoderm und extraembryonalen Membranen nachgewiesen werden. In weiteren Untersuchungen zu

GPx4-Knockoutmodellen zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Der homozygote Knockout starb ebenfalls in utero zum gleichen Zeitpunkt ab (Yant et al., 2003).

### *Heterozygoter Knockout der Maus*

Im heterozygoten Knockoutmodell der Maus zeigen sich im Vergleich zum Wildtyp keine Einschränkungen hinsichtlich der Entwicklung, der Fertilität oder des Verhaltens. Auf molekularbiologischer Ebene zeigt sich eine Reduktion der mRNA-Level um 50% in den Organen Herz, Leber und Gehirn. Anderenorts zeigt sich eine Reduktion der GPx4-Aktivität in o.g. Organen inklusive Lunge und Niere um ca. 30% (Scimeca et al., 2005). Ein weiterer Aspekt ist, dass der haploide GPx4-Typ und die daraus resultierenden reduzierten GPx4-Level in dieser Untersuchung keine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress zeigen. In einem weiteren heterozygoten GPx4-Mausmodell konnte eine signifikante Abnahme der GPx4-Aktivität für die Gewebe Testis und Leber gezeigt werden (Garry et al., 2008). In kultivierten Lungenfibroblasten des heterozygoten GPx4-Knockouts konnte eine vermehrte Anfälligkeit gegenüber chemisch induzierter Apoptose dokumentiert werden. Jedoch zeigten sich die GPx4-defizienten Lungenfibroblasten gegenüber Phosphatidylcholinhydroperoxid-induzierte Apoptose widerstandsfähiger als der vergleichbare Wildtyp. Hinsichtlich des Einflusses von oxidativem Stress zeigen GPx4-defiziente Tiere eine höhere Sensitivität und eine erniedrigte Überlebenszeit nach Exposition gegenüber Kontrolltieren mit normaler GPx4-Aktivität (Yant et al., 2003). Heterozygote GPx4-Fibroblasten von Mausembryonen zeigen auf molekularbiologischer Ebene gegenüber dem Wildtyp eine Reduktion der mRNA-Level um 50%, sowie eine deutliche Reduktion des Proteingehaltes (Ran et al., 2003). Zudem zeigen die murinen embryonalen Fibroblasten eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress im Vergleich zur Kontrollgruppe. In den betroffenen Zellen konnte keine kompensatorische Erhöhung anderer antioxidierender Enzymsysteme nachgewiesen werden. Basierend auf der Annahme, dass eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress zu vermehrter Morbidität und Mortalität des Organismus führt, konnte in Untersuchungen zur Überlebenszeit von heterozygoten GPx4-Mäusen eine längere Überlebenszeit gegenüber der Vergleichsgruppe gezeigt werden (Ran et al., 2007). In der genaueren Betrachtung zeigte sich, dass sich Unterschiede in den Ausprägungen der Erkrankungen mit der höchsten Mortalitätsrate (Lymphom und Glomerulonephritis) ergeben. So trat unter GPx4-defizienten Mäusen ein Lymphom im Vergleich zum Wildtyp

erst später auf, und die Erkrankung einer Glomerulonephritis zeigte sich im Krankheitsverlauf weniger fortschreitend.

### *Spezifischer Stammzellknockout der mitochondrialen Isoform*

In der Spermatogenese kommt dem Enzym GPx 4 eine entscheidende Bedeutung zu. Es zeigte sich, dass homozygote GPx4-Knockout Mäuse der mitochondrialen Isoform neben einer Infertilität zudem schwere morphologische Veränderungen der Spermatozoen ausbilden (Schneider et al., 2009). In der weiteren Analyse war im testikulären Gewebe ein deutlicher Abfall der Proteinlevel der GPx4 im Vergleich zum Wildtyp und dem heterozygoten Knockout bemerkenswert. Weiterführend kam es vor allem im Mittelstück des Spermatozoens zu einer Reduktion der GPx 4-Expression. Im Bereich des Akrosoms, sowie des Spermatozoenkopfes zeigten sich keine Veränderungen der Expressionshöhen der GPx4. Ebenfalls war im homozygoten GPx4-Knockout keine Reduktion der GPx4-Proteinlevel in somatischen Geweben und murinen Embryonen nachweisbar. In den somatischen Zellen des homozygoten mGPx4- Knockouts konnte eine erhöhte Apoptoserate, sowie eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress durch exogen zugeführte Toxine nicht nachgewiesen werden.

### *Gewebespezifischer Knockout in Spermien*

Der murine homozygote GPx4-Knockout zeigt sich nicht lebensfähig und stirbt bereits embryonal ab. In einer gezielten Ausschaltung einer Isoform des Enzyms, nämlich der nukleären Form konnte eine Lebensfähigkeit der Tiere nachgewiesen werden (Conrad et al., 2005). Weiterführend waren die Fertilität und die phänotypische Entwicklung der Knockouttiere erhalten. In der morphologischen Analyse ergaben sich keine Unterschiede zwischen snGPx4-Knockouttieren und der Kontrollgruppe. Auffällig zeigte sich, dass scheinbar eine Chromatin- Instabilität der Spermien einhergeht bei den Knockouttieren auf dem Boden einer fehlerhaften chromatischen Kondensation. Ergänzend dazu ergaben sich morphologische Veränderungen im Bereich des Caput der Spermatozoen von snGPx4-Knockouttieren.

### *Überexpression in transgenem Mausmodell*

Oxidativer Stress wirkt nicht nur auf Membranen und Enzyme, sondern kann zudem auch mitochondriale Funktionen wie z.B. Die ATP- Produktion oder die Atmungskette beeinträchtigen (Chinopoulos et al., 1999). In einem transgenen Mausmodell konnte in

vivo gezeigt werden, dass die Überexpression von GPx4 die mitochondriale ATP-Produktion vor dem Effekt von oxidativem Stress schützt (Liang et al., 2007). In der gleichen Untersuchung war ein protektiver Effekt gegenüber der mitochondrialen Atmungskette bei Einwirkung von oxidativem Stress unter einer Überexpression von GPx4 nicht zu dokumentieren.

Es wird vermutet, dass das Enzym GPx4 zudem eine bedeutende Rolle in der Spermatogenese einnimmt. Im transgenen Mausmodell zeigten sich bei einer Überexpression der mGPx4 mehrere morphologische Veränderungen, die mit einer Subfertilität der transgenen Tiere einhergehen (Puglisi et al., 2007). So zeigte sich eine Reduktion der Spermatozyten in den untersuchten testikulären Geweben, sowie ein vermehrtes Auftreten von apoptotischen Zellen.

Hinsichtlich des Einflusses der GPx4 auf eine spezifische Organfunktion konnte gezeigt werden, dass bei mGPx4-überexprimierenden Mäusen die kardiale Funktion hinsichtlich der Auswurfleistung und der Kontraktilität des Herzmuskels nach einer induzierten Ischämie besser ist im Vergleich zur Kontrollgruppe (Dabkowski et al., 2008). Weiterführend konnte nachgewiesen werden, dass der Gehalt an Lipidperoxiden in Kardiomyozyten des mGPx4-überexprimierenden Mausmodells nach einem hypoxischen Ereignis gegenüber der Vergleichsgruppe erniedrigt ist.

## **1.2 Pseudogene**

Pseudogene sind Sequenzen im Genom einer Spezies, die Sequenzhomologien zu einem paralogem Gen aufweisen. Sie gelten als nicht funktionelle Kopien des Gens, die durch vermehrte Stopcodons und Frameshifts zum Abbruch der Translation von Proteinen führen (Vanin, 1985). und zeigen häufig aufgrund eines fehlenden Selektionsdruckes gehäuft Mutationen in der Sequenz. Es gibt zwei verschiedene Prozesse, die Pseudogene generieren können: Die Duplikation von genomischer DNA, sowie den Vorgang der Retrotransposition. Pseudogene, die durch Retrotransposition entstehen nennt man prozessierte Pseudogene. Zunehmend ergibt sich aus dem Vorkommen von Pseudogenen eine klinische Relevanz. So interferieren manche Nachweismethoden (z.B. RT-PCR) insbesondere von Tumormarkern aufgrund der hohen Sequenzhomologie mit der Struktur von Pseudogen und paralogem Gen und erreichen womöglich falsch positive Werte (Ruud et al., 1999).

### 1.2.1 Retrotransposition und Duplikation zur Pseudogenbildung

Es wird zwischen prozessierten und duplizierten (nicht-prozessierten) Pseudogenen unterschieden. Nicht-prozessierte Pseudogene resultieren aus der Duplikation von genomischer DNA, während prozessierte Pseudogene über den Vorgang der Retrotransposition von mRNA erneut ins Genom gelangen. Innerhalb der Säugerspezies existieren mehrheitlich prozessierte Pseudogene gegenüber einer Minderheit an nicht-prozessierten Pseudogenen.

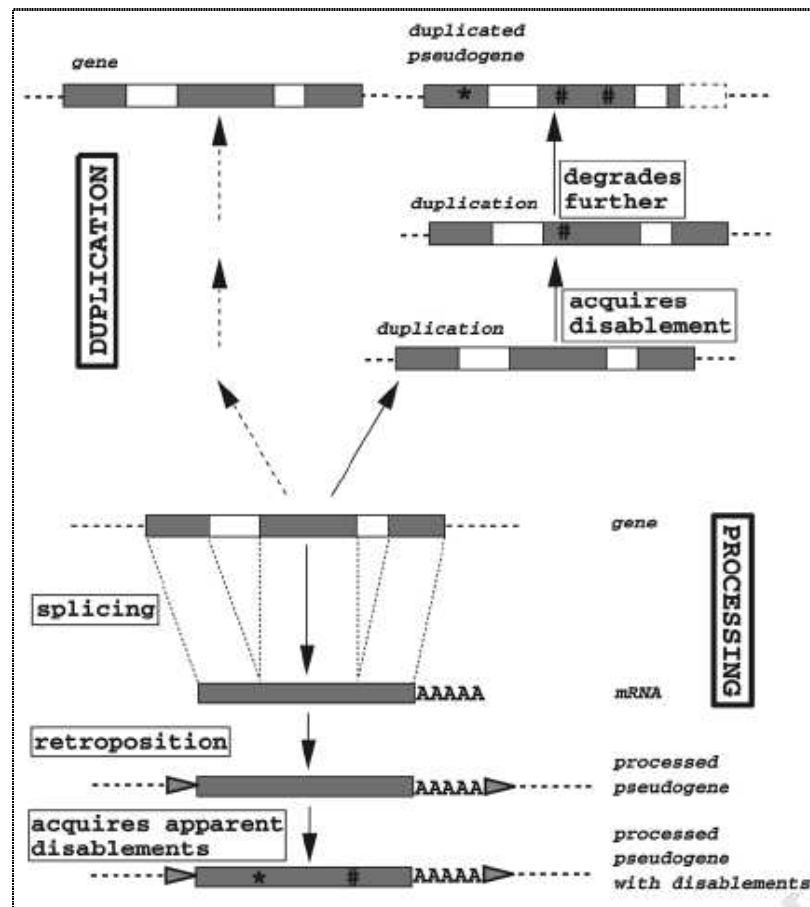


Abb. 2: aus (Harrison und Gerstein, 2002): Entstehung von duplizierten und prozessierten Pseudogenen. Beim Vorgang der Duplikation zur Generierung eines Pseudogens bleibt die Struktur des jeweiligen Gens erhalten. Das Produkt wird weiter nicht transkribiert, sondern degeneriert. \* steht für Stop Codon, # steht für Frameshift. Zur Generierung eines prozessierten Pseudogens erfolgt die Reintegration der mRNA in das Genom, so dass als Kennzeichen der erhaltene Poly-A-Schwanz bleibt. Ebenfalls finden sich in der Sequenz des prozessierten Pseudogens Akkumulationen von Fehlern, wie Frameshifts.

Prozessierte Pseudogene kennzeichnen verschiedene Charakteristika, u.a. besitzen sie keine Introns, enthalten einen Poly-A-Schwanz am 3'Ende und zeigen eine hohe Homologie zum funktionellen Gen (Vanin, 1985). Man nimmt aufgrund der strukturellen Eigenheit eines Poly-A-Endes an, dass der Ursprung der prozessierten Pseudogene in reifer

mRNA liegt. Diese wird über den Vorgang der Retrotransposition ins Genom reintegriert. Es wird angenommen, dass dieser Prozess durch die sogenannten LINE 1-Elemente (Long Interspersed Nuclear Elements) katalysiert werden kann (Esnault et al., 2000). Bei dieser Subfamilie handelt es sich um die aktivste Gruppe an autonomen transposablen Elementen im humanen Genom (Kazazian und Moran, 1998). Als wesentlicher Katalysator dieser Reaktion der reversen Transkription werden neben der Subfamilie der Line1-Elemente (Esnault et al., 2000) auch zu einem bedeutend geringeren Teil Retroviren (Zdobnov et al., 2005) in Erwägung gezogen.

Ein weiterer Aspekt der Retrotransposition ist, dass über diesen Vorgang neue Gene generiert werden können (Brosius, 1999). Diese transkribierten und funktionsfähigen Gene, sog. „Retrogene“ zeigen keine typischen strukturellen Merkmale der Retransposition. Eine überdurchschnittlich hohe Expression dieser Gene ist im testikulären Gewebe gezeigt worden (Marques et al., 2005). Mehr als 90 dieser Retrogene sind bereits im humanen und murinen Genom beschrieben worden (Emerson et al., 2004).

Ein weiteres Charakteristikum der prozessierten Pseudogene ist die Existenz unabhängig vom Selektionsdruck. Somit können Pseudogene Mutationen in ihrer Sequenz akkumulieren. Jedoch konnte in o.g. Analyse ebenfalls gezeigt werden, dass die Sequenzen in ca. 1000 Regionen trotzdem dem Selektionsdruck der Evolution unterliegen (Torrents et al., 2003).

Hochrechnungen ergeben eine Expression von prozessierten Pseudogenen im humanen Genom von 3%, während im murinen Genom mit einer Expression von 3% gerechnet wird (Yu et al., 2007). An anderer Stelle wird ein Unterschied in der Expression von Pseudogenen zwischen den Spezies postuliert- das humane Genom zeige 3% zu 0,5-1% im murinen Genom (Yano et al., 2004)

Im strukturellen Vergleich des funktionellen Gens zum prozessierten Pseudogen zeigt sich im Durchschnitt eine Aminosäuresequenz, die zu 75% und eine Nukleotidsequenz, die zu 86% identisch ist. Trotz dieser Ähnlichkeit des Pseudogens zum funktionellen Gen weist ersteres durchschnittlich fünf Frame-Disruptions auf. Dennoch besteht die theoretische Möglichkeit einer Translation in eine zu 90% intakte Aminosäuresequenz (Zhang et al., 2003). Die Mutationen und Änderungen in der Nukleotidsequenz von Retropseudogenen waren ebenso Gegenstand von Analysen. Dabei ergab sich, dass im Durchschnitt mehr als 90% der Nukleotidabfolge bestehen bleiben. (Zhang und Gerstein, 2003). Eine weitere

Auffälligkeit sind die Unterschiede in der Gewebeverteilung und der Struktur von Genen mit Retropseudogenen zu Genen ohne Retropseudogene (Goncalves et al., 2000). Dabei zeigen Gene ohne Retropseudogene eine größere Gewebsspezifität, ebenso wie eine zweifach längere proteincodierende Sequenz. Strukturelle Unterschiede ergeben sich durch eine Abnahme des GC-Gehaltes mit steigender Anzahl an Retropseudogenen, ebenso wie eine Abnahme der proteincodierenden Sequenz mit steigender Zahl an Retropseudogenen.

### 1.2.2 Vorkommen und Verteilung von Pseudogenen in humanen und murinen Genom

Über die Anzahl von prozessierten Pseudogenen im Genom gibt es verschiedene Auffassungen. So wird die Zahl der prozessierten Pseudogene im humanen Genom auf mindestens 8000 geschätzt (Zhang et al., 2003). Eine weitere Kalkulation schätzt die Regionen, die für beide Formen von Pseudogenen im menschlichen Genom kodieren auf mindestens 20 000 (Torrents et al., 2003). Prozessierte Pseudogene repräsentieren einen Anteil von 70% (14000 Regionen). Jedoch bedienen sich die Schätzungen unterschiedlicher Kriterien, so dass die Höhe der geschätzten Pseudogene durchaus durch strukturelle Kriterien der Analyse beeinflusst wird.

Innerhalb der Entität der prozessierten Pseudogene stellen den größten Anteil die ribosomalen Protein-Pseudogene, die mit einem Anteil von 22% an der Gesamtheit der prozessierten Pseudogene beziffert werden (Zhang et al., 2003). Aufgrund des hohen prozentualen Anteils an der Gesamtmenge der prozessierten Pseudogene erfolgten weitere Analysen dieser Subgruppe. Die Anzahl bezifferte sich auf über 2000 Stück, deren kodierende Sequenz zu mehr als 90% in voller Länge erhalten ist (Zhang et al., 2002).

Es ergeben sich durchaus Unterschiede in dem Vorkommen und der Struktur von humanen und murinen prozessierten Pseudogenen (Zhang et al., 2004). Man nimmt an, dass die Entwicklung der beiden Genome vor ca. 75 Mio. Jahren sich getrennt voneinander vollzog. Ebenso scheint sich die Entwicklung von prozessierten Pseudogenen in beiden Genomen unterschiedlich zu vollziehen. Es wird angenommen, dass sich im humanen Genom vor ca. 40 Mio. Jahren eine explosionsartige Vermehrung von Retrotransposons vollzogen hat, während die Generierung von Retrotransposons in murinen Genomen stetig vorgekommen ist. Im murinen Genom besteht eine wesentlich höhere Mutationsrate im Vergleich zum menschlichen Genom, so dass evolutionäre Residuen wie prozessierte Pseudogene deutlich früher verschwinden. Dennoch ergeben sich auch Ähnlichkeiten, wie die Korrelation von

Länge der proteincodierenden Sequenz zu der Anzahl der Retrotransposons. Gene, die multiple Kopien von prozessierten Pseudogenen enthalten, kodieren zumeist für „housekeeping“-Enzyme, die eine erhöhte Expression in den germinalen und embryonalen Zellen zeigen.

### 1.2.3 Biologisch aktive Pseudogene u.a. GPx4-Pseudogen

Zunächst wurde vermutet, dass prozessierte Pseudogene biologisch nicht aktiv seien aufgrund von strukturellen Veränderungen, die zu einem Funktionsverlust führen. Mehrfach konnte inzwischen gezeigt werden, dass verschiedene prozessierte Pseudogene auch transkribiert werden (Boger et al., 2001; Edgar, 2002; Guo et al., 1998). Ebenfalls konnte die Expression eines prozessierten Pseudogens für Kallikrein, einer Serinprotease, mit dem Namen PsiKLK1 nachgewiesen werden. Eine biologische Aktivität wird aufgrund einer gemessenen mRNA-Expression in verschiedenen Drüsengewebe vermutet (Yousef et al., 2004).

Der Anteil der transkribierten Pseudogene an allen prozessierten Pseudogenen ist auf 4-6% geschätzt worden (Harrison et al., 2005). Für einzelne Vertreter dieser Entität ist eine regulatorische Funktion beschrieben worden. Es wird vermutet, dass das Transkript des Makorin 1-Pseudogen die mRNA des Makorin 1-Gens stabilisiert (Hirotsune et al., 2003). In der molekularbiologischen Untersuchung konnte eine längere Halbwertszeit der mRNA des Makorin 1-Gens in Anwesenheit des Pseudogens gezeigt werden. Bei Untersuchungen am murinen Knockoutmodell mit Auslöschung des Makorin-1 Pseudogens waren neben einer hohen postnatalen Mortalität ebenfalls schwere Fehlbildungen der betroffenen Knockout-Tiere zu beobachten. In einer nachfolgenden Untersuchung konnte der Nachweis dieses Pseudogens für den murinen Organismus erbracht werden, ein Nachweis bei verwandten Spezies wie im Organismus der Ratte oder des Menschen gelang nicht (Podlaha und Zhang, 2004). Für das Enzym Nitritoxid-Synthase ist neben dem paralogem Gen ebenfalls ein homologes Pseudogen beschrieben. Die regulatorische Funktion des Pseudogens zeigt sich nach Transkription des Pseudogens in *Lymnea stagnalis* durch eine Abnahme der Expressionslevel des kodierenden Gens (Korneev et al., 1999).

Die Genome aller Spezies unterliegen einer steten Entwicklung und Veränderung bedingt durch die Evolution und den ausgeübten Selektionsdruck. Dabei werden verschiedene genetische Mechanismen wirksam z.B. die Inaktivierung von Genen oder Teilabschnitten durch Mutationen und Methylierung.



## 1.3 Sekretoglobine

### 1.3.1 Genfamilie/ Gencluster

Die humanen Vertreter der Familie der Sekretoglobine sind alle in einem Gencluster auf Chromosom 11q12.2 lokalisiert (Ni et al., 2000) (Abb.3). Bei den Sekretoglobinen handelt es sich um sekretorische Proteine mit einem kleinen Molekulargewicht. Die Sekretoglobine sind bereits in vielen Organismen und Spezies untersucht worden. Dabei zeigte sich eine Homologie der Gene von 50-90% zwischen den Spezies Mensch, Maus, Affe und Ratte.

Weitere Charakteristika der Vertreter der Sekretoglobine sind eine ähnliche Länge des codierten Proteins, sowie strukturell zwei konservierte Cysteine und ein zentrales Lysin. Die Aminosäuresequenzen der einzelnen Vertreter zeigen sich verschieden. Die einzelnen Vertreter der Sekretoglobine zeigen eine spezifische Gewebsverteilung, jedoch ist die physiologische Funktion aller Vertreter weitestgehend unbekannt.

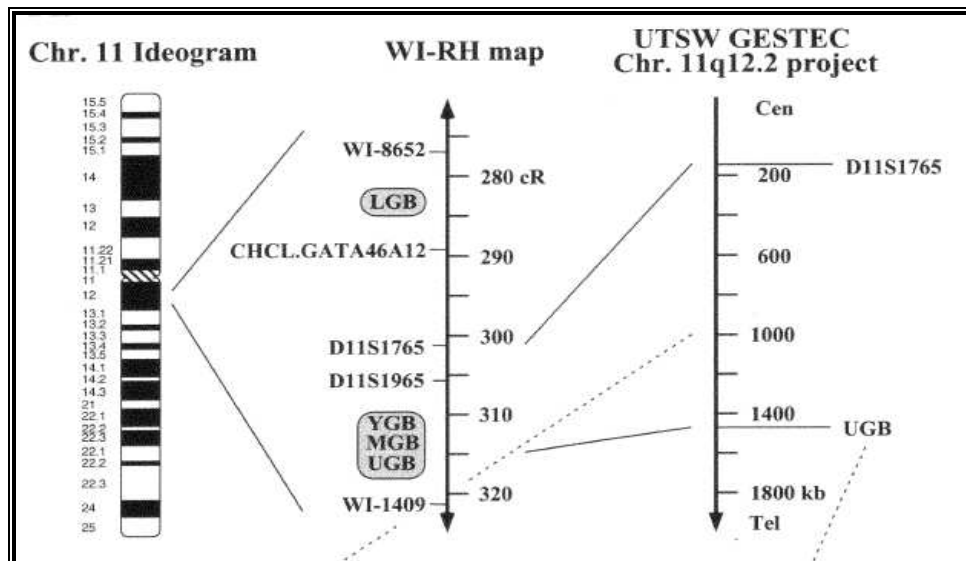


Abb. 3: aus (Ni et al., 2000). Darstellung des Genclusters auf Chromosom 11q12.2. In diesem Bereich sind die Gene für alle humanen Vertreter der Sekretoglobine lokalisiert

Die Familie der Sekretoglobine umfasst nach derzeitigem Kenntnisstand über 25 Vertreter verschiedener Spezies (Zafrakas et al., 2006). Die aktuell bekannten humanen Vertreter der Genfamilie sind in nachstehender Tabelle aufgeführt.

Name	Nomenklatur	Synonym	RefSeq(NM)
Uteroglobin	SCGB 1A1	Clara cell 10kDA protein (CC10)	NM_003357
		Clara cell secretory protein (CCSP)	
	SCGB1B1		NM_020563
	SCGB1B2		
	SCGB1C1	RYD 5	NM_145651
Lipophilin A	SCGB 1D1		NM_006552
Lipophilin B	SCGB 1D2	BU 101	NM_006551
Lymphoglobin	SCGB 1D3	YGB	
Lipophilin C	SCGB 2A1	UGB3	NM_002407
		Lacryoglobulin Mammaglobin B	
Mammaglobin	SCGB 2A2	UGB2	NM_002411
		Human steroid binding factor C2	
HIN- 1	SCGB 3A1	UGRP 2	NM_054037
		LU105	
UGRP 1	SCGB 3A2	UGRP 1	NM_054038

Tab.4: Auflistung der humanen Vertreter der Familie der Sekretoglobine. Dabei sind die Äquivalenzbezeichnungen sowie die Nomenklatur zu den einzelnen Vertretern aufgeführt. Quelle: <http://www.genenames.org/genefamily/scgb.html>. Die Terminologie „Sekretoglobine“ und das Symbol der Genfamilie „SCGB“ ist im Konsens festgelegt worden (Ni et al., 2000).

### 1.3.2 Strukturelle Merkmale der Sekretoglobine

Hinsichtlich von strukturellen Eigenschaften fallen Gemeinsamkeiten der einzelnen Sekretoglobine untereinander auf. Die Mitglieder der Familie sind sekretorische Proteine von bisher unbekannter biologischer Funktion. Weiterhin kennzeichnen die Proteine eine geringe Größe. Im Aufbau kennzeichnen sich die Mitglieder der Sekretoglobine durch eine dimere Struktur (Homo- und Heterodimere) und bilden in den Untereinheiten alpha-Helices. So treten Lipophilin A und Lipophilin C (Mammaglobin B) in humaner

Tränenflüssigkeit als Heterodimer auf (Lehrer et al., 1998). Ebenso konnte für Mammaglobin 1 und Lipophilin B eine Heterodimerbildung gezeigt werden (Colpitts et al., 2000). Das Uteroglobulin besitzt ein Molekulargewicht von 8,5kDa und bildet ein Homodimer, das über zwei Disulfidbrücken verbunden ist (Nieto et al., 1977). Eine weitere strukturelle Gemeinsamkeit aller Vertreter dieser Genfamilie sind mehrere konservierte Regionen: das Cystein bei Aminosäure 22 und 39, sowie Lysin bei Aminosäure 63 (Becker et al., 1998). Weiterhin fallen auch Homologien v.a. in der Nukleotidsequenz auf.

### 1.3.3 Mitglieder der Sekretoglobinfamilie

#### *Uteroglobulin*

Das Uteroglobulin wurde als erster Vertreter der Sekretoglobinfamilie im Uterus von Kaninchen als sekretorisches Protein in der frühen Schwangerschaft entdeckt (Krishnan und Daniel, 1967). Im humanen Organismus ist das äquivalente Protein zunächst als Clara-Zell-sekretorisches Protein in der Bronchiallavage erstbeschrieben worden (Dhanireddy et al., 1988). Im Verlauf konnte eine Expression des Uteroglobins vor allem in verschiedenen Schleimhautepithelien, u.a. in Epithelzellen der Lunge gezeigt werden (Peri et al., 1993; Ryerse et al., 2001), sowie im humanen Endometrium isoliert werden (Muller-Schottle et al., 2000). In Untersuchungen von Uteroglobulin-defizienten entwickeln die Tiere vor allem strukturelle, organische Erkrankungen, wie z.B. eine IgA-Nephropathie (Zheng et al., 1999), fokale pulmonale Fibrose (Lee et al., 2006) oder zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Kanzerogenen (Yang et al., 2004). In Tumoren verändert sich das Expressionsverhalten von Uteroglobulin. So kommt es in malignen Zellen zu einem Rückgang der Expression. Im progredienten Prostatacarcinom konnte ein Verlust der Expression von Uteroglobulin gezeigt werden (Weeraratna et al., 1997). Ebenfalls war eine Abnahme der Uteroglobulinexpression in Tumoren der Lunge (Sjodin et al., 2003) und des Uterus (Tanaka et al., 2004) nachweisbar.

#### *Weitere Vertreter der Sekretoglobinfamilie*

Derzeit besteht besonders an einem Mitglied der Sekretoglobinfamilie Interesse, nämlich dem Mammaglobin 1. Dabei wird eine mögliche Eigenschaft als Tumormarker für das Mammacarcinom diskutiert. Für Mammaglobin 1 ist eine gewebespezifische Expression im adulten Brustgewebe beschrieben worden (Watson und Fleming, 1996). Dabei handelt es sich um ein Glykoprotein, das aus 93 Aminosäuren besteht mit einem geschätzten Molekulargewicht von 10,5kDa (Watson et al., 1998). Im Brustgewebe liegt

Mammaglobin 1 in zwei Formen mit einem geschätzten Molekulargewicht von 18kDa und 25kDa aufgrund von posttranslationeller Modifikationen vor (O'Brien et al., 2005).

Lipophilin B bildet mit Mammaglobin 1 ein Heterodimer (Colpitts et al., 2000). Darüberhinaus zeigt sich eine Korrelation der Expressionslevel von Mammaglobin 1 und Lipophilin B (Carter et al., 2002; O'Brien et al., 2002). Das Molekulargewicht von Lipophilin B ist mit 7,7 kDa geschätzt worden (Colpitts et al., 2000). Jedoch scheint es nicht zu einer ausschließlichen Expression von Lipophilin B im Komplex mit Mammaglobin 1 zu kommen. Auch bei Fehlen einer Mammaglobin 1-Expression kann in verschiedenen Geweben Lipophilin B-mRNA nachgewiesen werden (Carter et al., 2002). Neben einem Nachweis in hormonabhängigen Geweben, konnte zudem die Expression von Lipophilin B u.a. in Trachea, Niere, Speicheldrüsen (Zhao et al., 1999) und Hypophyse (Sjodin et al., 2005) gezeigt werden.

Mammaglobin B ist ursprünglich in Uterusgewebe von Ratten (Becker et al., 1998) isoliert worden. Trotz einer hohen Sequenzhomologie zu Mammaglobin 1, wird Mammaglobin 2 nicht ausschließlich in Brustgewebe exprimiert. Die Expression von Mammaglobin B ist für die Speicheldrüsen, Uterus und Brustdrüse (Becker et al., 1998), sowie für Prostata, Testis, Ovarien, Trachea und Niere (Zhao et al., 1999), sowie in Tränendrüsen und Konjunktiven (Stoeckelhuber et al., 2006) dokumentiert.

### *Physiologie und biologische Funktion der Sekretoglobine*

Die physiologische Funktion der Sekretoglobine ist zum jetzigen Zeitpunkt unklar. Aufgrund des Aufbaus der kleinen, globulären Proteine der Sekretoglobinfamilie wird als wichtigste Eigenschaft die Sekretion beschrieben. In Uteroglobulin-defizienten Knockoutmäusen konnte ein Fehlen der sekretorischen Granula in Clara-Zellen der Lunge gezeigt werden (Stripp et al., 1996). Zudem wird eine Transportfunktion der Sekretoglobine für hydrophobe Moleküle, wie z.B. Hormone (Mukherjee et al., 1999) oder Pheromone (Austin et al., 2004) diskutiert. Für Uteroglobulin konnte gezeigt werden, dass aufgrund einer strukturellen Eigenheit die Bindung von hydrophoben Liganden, wie z.B. Progesteron möglich ist (Mukherjee et al., 1999). An anderer Stelle ist postuliert worden, dass Sekretoglobine bei Nagetieren als Pheromone wirken und zur Geruchserkennung beitragen (Emes et al., 2004).

### *Expressionsregulation der Sekretoglobine*

Ein Kennzeichen der Sekretoglobine ist die Transkriptionsregulation durch Steroidhormone (Miele et al., 1994). Zudem konnten klassische Hormone-Responsive-Elements in der Promotorregion nachgewiesen werden. Für Mammaglobin B konnte eine Induktion und ein Anstieg der Expression durch Androgene (v.a. Dihydrotestosteron) in der Prostata gezeigt werden (Xiao et al., 2005). Hingegen war für Mammaglobin 1 keine Veränderung der Transkription durch Glucocorticoide oder Steroidhormone, wie Estradiol, Progesteron oder Androgene nachweisbar (Watson et al., 1998). In der Analyse der Promotorregion des MG1-Gens waren zudem keine Steroid-Responsive-Elements zu detektieren. Eine Expression des Mammaglobin 1-Gens konnte nicht durch Cytokine induziert werden (Ballestrero et al., 2005). Weitere Untersuchungen zur Expressionsregulation konnten innerhalb der ersten 345bp oberhalb der proteincodierenden Sequenz Regulationselemente aufzeigen, die für das spezifische Expressionsmuster von MG1 verantwortlich sind (Shi et al., 2004).

#### 1.3.4 Dysregulation in malignen Zellen

##### *Mammaglobin 1: Brustkrebsmarker*

Für die Diagnostik und Therapie des Mammacarcinoms sind bis dato viele Ansätze und Fortschritte in der Behandlung erzielt worden. Ein durchaus vielversprechender Parameter ist das Mammaglobin 1, das in die Familie der Sekretoglobine einzuordnen ist. Dabei versprechen eine hohe Gewebespezifität und eine hohe Sensitivität des Parameters einen entscheidenden Fortschritt in der Früherkennung von Malignitäten des Brustdrüsengewebes.

Mammaglobin 1 ist erstmals im adulten Brustgewebe beschrieben worden (Watson und Fleming, 1996). Dabei fiel neben einer ausschließlichen Expression im epithelialen Brustgewebe, zudem eine erhöhte Expression von Mammaglobin 1 in Malignomen des Brustgewebes auf. In duktalem Mammacarcinomen konnten in 80% der untersuchten Proben das sekretorische Protein nachgewiesen werden (Fleming und Watson, 2000). Aufgrund der Eigenschaften des Mammaglobin 1 (Gewebespezifität und Überexpression in Mammacarcinomen) wird eine mögliche Funktion des Proteins als Tumormarker für das Mammacarcinom diskutiert. Dahingehend ist Mammaglobin 1 nach klinischen Gesichtspunkten betrachtet worden. Die Expression von Mammaglobin 1 in Zellen von Mammacarcinomen scheint unabhängig vom histologischen Typ des Tumors zu

sein. Eine Expression ist sowohl in duktalem, als auch lobulären Mammacarcinomen nachzuweisen (Leygue et al., 1999), (Watson et al., 1999). Zudem konnte Mammaglobin 1 in axillären Lymphknoten bei Patientinnen mit Mammacarcinom nachgewiesen werden (Manzotti et al., 2001), (Ooka et al., 2000), (Zehentner et al., 2002).

Der Nachweis von Mammaglobin 1 im Blut erkrankter Patienten gelang bisher nur auf mRNA-Ebene. Bemerkenswert scheint eine Erhöhung der Nachweisbarkeit in metastasiertem Krankheitsgeschehen (Zach et al., 2000) (Lin et al., 2003).

Material	Anzahl	Nachweis von MG1	Literatur
<i>Primärtumor</i>	237 BC	171/237 (72%)	(Bernstein et al., 2005)
	95 BC	90/95 (95%)	(Brown et al., 2005)
	100 BC	81/100 (81%)	(Watson et al., 1999)
	42 BC	31/42 (74%)	(Houghton et al., 2001)
<i>Axilläre Lymphknoten</i>	89 HE positiv	86/89 (97%)	(Marchetti et al., 2001)
	159 HE negativ	46/159 (29%)	
	13 HE positiv	13/13 (100%)	(Leygue et al., 1999)
	7 HE neg.	0/7 (0%)	
<i>Serum</i>	21 HE positiv	9/21 (43%)	(Fleming und Watson, 2000)
	46 BC-Patienten	37/46 (85%)	(Zehentner und Carter, 2004)
	84 Kontrollen	51/84 (61%)	
	45 BC-Patienten	25/45 (60%)	(Silva et al., 2001)
	25 Kontrollen	3 (12%)	
	10 BC-Patienten	6/10 (60%)	(Gal et al., 2001)
	16 Kontrollen	6/16 (38%)	
	54 BC-Patienten	22/54 (41%)	(Cerveira et al., 2004)
38 Kontrollen	0/38 (0%)		

Tab. 5: Untersuchungen von Mammaglobin 1 beim Mammacarcinom: der Nachweis im Gewebe und axillären Lymphknoten. Ein Nachweis bei erkrankten Patientinnen im Blut zeigt sich v.a. im metastasierten Stadium des Carcinoms. *BC*: Mammacarcinom, *HE*: Histologie.

Die klinische Relevanz der Überexpression von Mammaglobin 1 ist für Prognose und Überlebensdauer der erkrankten Patienten noch nicht abschließend geklärt worden. In verschiedenen Untersuchungen konnte keine statistische Assoziation zwischen hohen

Expressionsleveln von Mammaglobin 1 und Tumorgrad, Lymphknotenmetastasierung und histologischem Subtyp hergestellt werden (Watson et al., 1999), (Leygue et al., 1999).

Hinsichtlich der Prognose ist postuliert worden, dass eine hohe Mammaglobin-Expression mit einer weniger aggressiven Form des Mammacarcinoms einherzugehen scheint (Nunez-Villar et al., 2003). In einer weiteren Studie deuteten ebenso hohe Expressionslevel von Mammaglobin 1 auf eine günstige Prognose der Erkrankung aufgrund einer Assoziation zu Low-Grade Tumoren hin (Span et al., 2004).

Hinsichtlich der Gewebespezifität des Mammaglobin 1 existieren unterschiedliche Meinungen und Veröffentlichungen. In verschiedenen gynäkologischen Geweben und Tumoren konnte eine Expression von Mammaglobin 1-mRNA mittels Nested-PCR gezeigt werden (Grunewald et al., 2002). Zusätzlich konnte der Nachweis von Mammaglobin 1-mRNA für die Speicheldrüse, Haut und des Ösophagus erbracht werden (Houghton et al., 2001). An anderer Stelle konnte keine Expression von Mammaglobin 1 in humanen Malignomen des Gastrointestinaltraktes und der Reproduktionsorgane detektiert werden. (Sasaki et al., 2007).

Neben einer erhöhten Expression von Mammaglobin 1-mRNA in Brustkrebszellen, konnte ebenfalls ein Anstieg des Expressionslevel von Lipophilin B in Mammacarcinomen dokumentiert werden (Culleton et al., 2007; O'Brien et al., 2002). Dabei wird Lipophilin B häufiger in Östrogen-Rezeptor positiven Tumoren nachgewiesen. Jedoch zeigt sich für Lipophilin B eine geringere Gewebespezifität (Carter et al., 2003), so dass auch in Prostata- und Ovarialcarcinomen die Expression von Lipophilin B nachweisbar ist. Hinsichtlich der Gewebespezifität von Mammaglobin 1 und Lipophilin B konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass beide Gene auch in weiteren gynäkologischen Tumoren exprimiert werden (Zafrakas et al., 2006). Zudem war ein konkordantes Expressionsprofil von Mammaglobin und Lipophilin B bemerkenswert.

### *Mammaglobin 2: Vorkommen in verschiedenen Tumoren, u.a. Ovarialcarcinom*

Im Vergleich mit Mammaglobin 1 war eine hohe Sequenzhomologie auffällig, jedoch zeigte sich das Expressionsverhalten von Mammaglobin 2 in malignen und benignen Geweben unterschiedlich. Zunächst war aufgrund der Ähnlichkeit zu Mammaglobin die Betrachtung auf das mamäre Gewebe beschränkt. Dabei konnte eine Expression von Mammaglobin 2 auf mRNA-Ebene in Mammacarcinomen gezeigt werden (Aihara et al.,

1999). Ebenfalls gelang der Nachweis von Mammaglobin 2-mRNA in Sentinel-Lymphknoten bei histologisch nachgewiesener Metastasierung eines Mammacarcinoms. Jedoch scheint die Expression von Mammaglobin 2 nicht gewebespezifisch zu sein; ein Nachweis von Mammaglobin 2 gelang in verschiedenen gynäkologischen Geweben. Im Normalgewebe und Tumoren des Uterus war die Expression von Mammaglobin2-mRNA zu detektieren (Becker et al., 1998). Im ovariellen Gewebe konnte ebenfalls die Expression von Mammaglobin 2 nachgewiesen werden. Bei epithelialen Ovarialcarcinomen zeigt sich gegenüber dem ovariellen Normalgewebe eine erhöhte Expression von Mammaglobin 2 auf mRNA- und Proteinebene (Tassi et al., 2007). Ebenfalls konnte die Expression von Mammaglobin 2 auch in Normal- und Carcinomzellen der Prostata nachgewiesen werden (Tucker et al., 2005). In abdominellen Primärtumoren, u.a. Magen-, Colon- und Pankreas-Carcinomen konnten Transkripte von Mammaglobin 2 detektiert werden (Aihara et al., 2000). Ebenfalls war ein Nachweis in zugehörigen Lymphknoten mit histologisch gesicherter Metastasierung von Mammaglobin 2 möglich.

## **1.4 Ovarialcarcinom**

### **1.4.1 Epidemiologie des Ovarialcarcinoms**

Weltweit steht das Ovarialcarcinom an sechster Stelle der diagnostizierten Tumorerkrankungen bei Frauen (Permuth-Wey und Sellers, 2009) ([http://www-dep.iarc.fr/](http://www.dep.iarc.fr/)). Unter den Tumoren des weiblichen Reproduktionssystems rangiert das Ovarialcarcinom an zweiter Stelle mit der Anzahl an Neuerkrankungen und Todesfällen weltweit (Sankaranarayanan und Ferlay, 2006). Die Mortalität der Erkrankung ist erhöht, aufgrund einer späten Diagnosestellung im fortgeschrittenen Tumorstadium bei 67% der Patientinnen mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 45% (Jemal et al., 2009) ([http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2004/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2004/)). Für die USA sind 2006 knapp 15 000 Todesfälle durch die Erkrankung an einem Ovarialcarcinom dokumentiert; damit liegt das Ovarialcarcinom an fünfter Stelle der Mortalitätsrate von Tumorerkrankungen (Jemal et al., 2007). Für 2009 liegt die geschätzte Zahl von Neuerkrankungen bei 21550 Fällen, ebenso werden 14600 tumorassoziierte Todesfälle erwartet (Jemal et al., 2009).

### **1.4.2 Einteilung nach Histologie und Klinik (FIGO-Stadien)**

Unter den Ovarialcarcinomen tritt der epitheliale Typ mit einer Häufigkeit von ungefähr 90% aller Ovarialcarcinome auf (Soslow, 2008). Diese können in vier Subtypen unterteilt werden (Tab.6). Weitere nicht-epitheliale Tumoren können den restlichen Prozenten als



Keimblatt-Stroma-Tumoren (6%), Keimzelltumoren (3%), sowie Mischtypen (1%) zugeordnet werden (Sankaranarayanan und Ferlay, 2006). Von den nicht-invasiven Ovarialcarcinomen stellen 10% Borderline-oder Low-malignant-Tumoren, die sich durch fehlendes invasives Wachstum von den invasiven epithelialen Ovarialcarcinomen abgrenzen.

<b>Histologischer Subtyp</b>	<b>Häufigkeit (%)</b>
Serös	68
Klarzell	13
Endometrial	9
Muzinös	3
Gemischt epitheliale Carcinome	6
Andere	1

Tab. 6: Histologische Subtypen des epithelialen Ovarialcarcinoms (Ricciardelli und Oehler, 2009)

Problematisch in der Diagnostik des Ovarialcarcinoms gelten die wenigen oder fehlenden Symptome in den frühen Stadien der Erkrankung, so dass die Diagnosestellung häufig erst im fortgeschrittenen Stadium erfolgt. Zudem existiert bis zum jetzigen Zeitpunkt keine geeignete Screening-Untersuchung mit einem spezifischen Tumormarker zur Frühdiagnose der Erkrankung. Das Staging des Ovarialcarcinoms wird erhoben durch ein bildgebendes Verfahren als auch durch die chirurgische Exploration. Entsprechend der Klassifikation des TNM-Systems (Fleming et al., 1997) als auch eines alternativen Systems der International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) wird das Ausmaß der Tumorausbreitung bestimmt (Heintz et al., 2006).

*- Risikofaktoren:*

<b>Gesicherte Risikofaktoren</b>	<b>Eventuelle Risikofaktoren</b>	<b>Diskutierte Risikofaktoren</b>
Alter	Frühe Menarche	Hormonersatztherapie
Positive Familienanamnese	Späte Menopause	Fetteiche Nahrung
Nulliparität	Infertilität	Übergewicht
Orale Kontrazeptiva (schützend)	Stillen (schützend)	Mangelnde körperliche Bewegung
Oophorectomie (schützend)	Sterilisation (schützend)	Nikotinabusus
	Hysterektomie (schützend)	Alkoholkonsum
	vitaminarme Ernährung	

Tab. 7: Zusammenfassung der Risikofaktoren für die Erkrankung des Ovarialcarcinoms nach Evidenzgrad. (Permuth-Wey und Sellers, 2009)

- **Genetisch:** Das Auftreten eines Ovarialcarcinoms scheint in 85% der Fälle zufällig zu sein ohne dass hereditäre Faktoren eine Rolle spielen, während in 10-15% eine genetische Disposition vorhanden ist (Christie und Oehler, 2006). Andere Schätzungen gehen nur bei 5-10% von einer hereditären Erkrankung aus (Lynch et al., 1993). Erkrankungen, die für ein Ovarialcarcinom genetisch disponieren sind zum einen das Lynch-Syndrom II (Aarnio et al., 1999), das Mammacarcinom mit Mutationen im Bereich der BRCA 1/BRCA 2-Gene (Hereditary-Breast-Ovarian Cancer) (Frank et al., 1998; Narod et al., 1995), sowie eine familiäre Häufung an Erkrankungen bei Verwandten I.Grades (Negri et al., 2003; Ziogas et al., 2000). Alle Erkrankungen dieses Komplexes gehen mit einer deutlichen Zunahme der Prävalenz eines Ovarialcarcinoms bei den Betroffenen einher (Stratton et al., 1998), (Easton et al., 1993), (Lynch et al., 1998). Die Inzidenz an einem Ovarialcarcinom zu erkranken liegt bei Frauen mit einer positiven familiären Anamnese/ familiären Häufung des Ovarialcarcinoms bei 9.4%.

- **Alter:** Die Erkrankung tritt vor allem im fortgeschrittenen Alter auf. So treten mehr als 48% aller Ovarialcarcinome nach dem 65. Lebensjahr auf (Yancik, 1993). Bei 1% tritt die Erkrankung vor dem 20. Lebensjahr auf; diese sind zu mehr als 60% den Keimzell-Tumoren zugehörig (Holschneider und Berek, 2000).

- **Hormone:** Es konnte gezeigt werden, dass Nullipara ein erhöhtes Risiko gegenüber Multipara haben an einem Ovarialcarcinom zu erkranken (Negri et al., 1991), (Hankinson et al., 1995). Zusätzlich scheint Infertilität ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung eines Ovarialcarcinoms zu sein (Bristow und Karlan, 1996), (Riman et al., 2002). Über die Risikoabschätzung bei Einnahme von Medikamenten im Rahmen der Hormon-Ersatz-Therapie konnte bis dato keine abschließende Einschätzung getroffen werden. Die Einnahme von oralen Kontrazeptiva führt zu einer Reduktion des Erkrankungsrisikos (Gross und Schlesselman, 1994).

- **Sonstige:** Die Evaluierung von Übergewicht, Alkoholgenuss und Nikotinabusus als mögliche Einflussfaktoren erbrachte ein vermehrtes Risiko für ein Ovarialcarcinom bei Adipositas ( $\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$ ) gegenüber einer Vergleichsgruppe ( $\text{BMI} < 22 \text{ kg/m}^2$ ) zum Ausdruck (Riman et al., 2004).

### *Diagnostische Möglichkeiten:*

Häufig erfolgt die Diagnosestellung der Erkrankung an einem Ovarialcarcinom erst in einem fortgeschrittenen Stadium und bei bereits ausgeprägtem Tumorwachstum. Zum Screening für die Erkrankung gilt neben der Bildgebung die Bestimmung des Tumormarkers CA125 als Standard in der Diagnostik. Die regelmäßige transvaginale Ultraschalluntersuchung ist als Screeningmethode allein nicht ausreichend. (van Nagell et al., 2007; van Nagell et al., 1990).

#### 1.4.3 Tumormarker: CA 125

Als Standard in der Diagnostik des Ovarialcarcinoms gilt neben der bildgebenden Diagnostik die Bestimmung des Tumormarkers CA 125 (Carboanhydrate antigene). Die erstmalige Beschreibung des Antigens erfolgte 1981 als Determinante eines murinen monoklonalen Antikörper mit der Bezeichnung OC 125. In den frühen Untersuchungen zeigten sich jeder der sechs epithelialen, sowie 12 von 20 kryokonservierten Gewebeproben von Ovarialcarcinomen positiv in der Antikörperbindung (Bast et al., 1981). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass bei Patientinnen mit einem Ovarialcarcinom in 80-85% der Fälle ein Anstieg der CA125-Werte zu vermerken ist (Jacobs und Bast, 1989). Problematisch ist das Screening und die Früherkennung eines Ovarialcarcinoms mittels der serologischen Bestimmung des Tumormarkers CA125. In frühen Stadien der Erkrankung sind die erhobenen Werte für CA125 nur eingeschränkt zu verwerten. Bei fast 30% von Patientinnen mit einem Ovarialcarcinom im Stadium I waren die Serumwerte des CA125 nicht signifikant erhöht (Woolas et al., 1993). In einer weiteren Untersuchung war auffällig, dass bei 20% der Ovarialcarcinome keine oder nur eine geringe Expression von CA125 nachzuweisen war (Bast et al., 2005). Weiterführend ergeben sich mehrere Faktoren, die die Expression des Tumormarkers CA125 beeinflussen. So zeigen sich in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp unterschiedliche Expressionslevel des Tumormarkers. Dahingehend zeigen seröse und endometriale Ovarialcarcinome eine höhere Konstanz in der Expression des Antigens. Eine verminderte Expression des CA125 zeigte sich bei muzinösen oder klarzelligen Ovarialcarcinomen (Rosen et al., 2005). Ebenso sind bei verschiedenen anderen Erkrankungen, insbesondere Tumorerkrankungen und auch bei physiologischen Veränderungen, wie z.B. Schwangerschaft, Menstruation erhöhte CA125-Werte messbar (Clarke-Pearson, 2009). Aufgrund der vielen Einschränkungen und Einflussfaktoren auf die Expression des CA125

ist ein Screening nach einer Erkrankung an einem Ovarialcarcinom mit alleiniger Bestimmung der Serumwerte nicht geeignet. Das CA 125 ist eher als ein prognostischer Marker, der das Ansprechen auf Chemotherapie, die mittlere Überlebenszeit und das Outcome der Patientinnen evaluiert, zu bewerten (Nagele et al., 1995). So zeigt sich eine Korrelation zwischen dem Verlauf des CA 125 und dem klinischen Ansprechen des Tumors auf die chemotherapeutische oder operative Behandlung (van der Burg et al., 1988). Aktuell wird als diagnostischer Standard für das Ovarialcarcinom neben der Bestimmung eines prätherapeutischen CA125-Levels zudem ein bildgebendes Verfahren gewählt.

#### 1.4.4 Biomarker in der Diskussion

In der Früherkennung und Prävention des Ovarialcarcinoms sind Screeninguntersuchungen mit Serummarkern derzeit nicht verfügbar. Der Serummarker CA125 ist in 50-60% im Serum von Patienten mit einem Ovarialcarcinom Stadium I erhöht (Rosen et al., 2005). Es wird geschätzt, dass aktuell nur 25% der Tumorerkrankungen an einem Ovarialcarcinom im Stadium I diagnostiziert werden (Bast, 2003). Dabei ist die frühe Diagnosestellung der Tumorerkrankung der stärkste prognostische Faktor und führt zu einem Anstieg der Überlebenszeit (Sant et al., 2003). Unter dem Druck einer Früherkennung des Ovarialcarcinoms ist die Suche nach Screeningmethoden, insbesondere von Biomarkern forciert worden. Dabei wird der Erfolg einer Screeningmethode durch die Klinik und Biologie der Tumorerkrankung bestimmt (Bast, 2003). Die Erkrankung des Ovarialcarcinoms zeigt sich dabei sehr heterogen, die histologischen Subtypen des Ovarialcarcinoms zeigen unterschiedliche Expressionsprofile, die in der serologischen Diagnostik berücksichtigt werden sollten (Kobel et al., 2008). Neben der Eigenschaft eines Tumormarkers anhand von Spezifität und Sensitivität eine frühe Diagnosestellung zu ermöglichen, wird ebenfalls die Aussagekraft des Markers bezüglich Prognose der Erkrankung und Ansprechrate auf die Therapie beurteilt (Boyce und Kohn, 2005). Insgesamt sind in den letzten Jahren über 40 Biomarker auch in Kombination mit CA125 (Bast et al., 2002) evaluiert worden. In Ergänzung des CA125 durch weitere Serummarker ist durchschnittlich eine Zunahme der Sensitivität um 5-10% erreicht worden. Durch den Einsatz von Arrays zur Analyse von Genexpressionen sind eine Vielzahl von potentiellen Biomarkern entdeckt worden, u.a. Osteopontin (Kim et al., 2002), Kallikrein 6 (Diamandis et al., 2003; Diamandis et al., 2000) und Kallikrein 10 (Luo et al., 2001). Bemerkenswert scheint dabei, dass Kallikrein 6 und 10 in 98-100% der Ovarialcarcinome exprimiert werden, die keine Expression von CA125 zeigen (Rosen et al., 2005). In einem weiteren

Array fiel neben der erhöhten Genexpression von Kallikrein auch eine Hochregulation von Mammaglobin 2 in ovariellen Malignomen auf (Adib et al., 2004). Dabei zeigte sich eine erhöhte Expression in primären und metastatischen Adenocarcinomen des Ovars. In einem weiteren Genexpressionsprofil konnte für Mammaglobin 2 die stärkste Hochregulation in serös-papillären Ovarialcarcinomen nachgewiesen werden, Kallikrein 6 und 10 waren ebenfalls unter den hochregulierten Genen zu detektieren (Bignotti et al., 2006). Weiterführend konnte für Mammaglobin 2 eine erhöhte Expression in epithelialen Ovarialcarcinomen gegenüber ovariellm Normalgewebe nachgewiesen werden (Tassi et al., 2007). In der Untersuchung waren in allen untersuchten Proben von Ovarialcarcinomen Transkripte mittels PCR detektierbar. Hinsichtlich der klinischen Relevanz scheint die Überexpression von Mammaglobin 2 in ovariellen Tumoren, mit einer günstigeren Prognose in Bezug auf Fortschreiten der Erkrankung und Rezidivneigung einherzugehen (Tassi et al., 2009). Weiterführend werden Mediatoren der Inflammation als mögliche Marker hinsichtlich der Tumoraktivität mit begleitender Inflammation und Prognose evaluiert. So konnte für die Cyclooxygenase-2 gezeigt werden, dass die Expression mit einer schlechteren Prognose und einem reduzierten Überleben einhergeht (Denkert et al., 2002).

Die Biologie des Ovarialcarcinoms bedingt, dass verschiedene Strategien und Methoden, wie Genexpressionsprofile, Kombinationen von Tumormarkern, Nachweis von Tumoraktivitäten entwickelt werden um eine frühe Diagnosestellung zu ermöglichen. Derzeit ist keine Strategie mit Biomarkern etabliert, die für die Früherkennung oder als Screeningmethode geeignet ist. Perspektivisch wird eine Kombination von verschiedenen Serummarkern in Erwägung gezogen, die aus Kostengründen in ein Screening auf verschiedene Tumorerkrankungen integriert werden (Chatterjee und Zetter, 2005).



## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien und Gebrauchswaren

Die verwendeten Chemikalien und Biochemikalien sind in nachstehender Tabelle mit Bezugsfirma und deren Standort aufgeführt:

Chemikalien	Firma
Agarose	Promega, Mannheim
dNTP	Roth, Karlsruhe
DNA (desoxyribonucleitid acid)	New England Biolabs,
DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)	Life Technologies, Eggenstein
Dulbecco's PBS (phosphate buffered saline)	Life Technologies, Eggenstein
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
Ether	Baker, Deventer (Niederlande)
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Baker, Deventer (Niederlande)
SDS-Ladungspuffer (4xRoti-Load)	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver, Bacto SKIM MILK	Difco, Detroit (USA)
Oligo-dT18 Primer	BioTez, Berlin
Penicillin/ Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
QuantiTect Sybr Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
RNaseOut Ribonuclease	Invitrogen, Groningen
Rnasin	Promega, Madison (USA)
TEMED (Tetramethylethylendiamin, 0,4%)	
Trypsin	BioWhittaker (Belgien)
Trypan Blau	PAA Laboratories (Österreich)

### 2.1.2 Geräte

Gerät	Firma
Blotkammer,Fastblot B44	Biometra Göttingen
Brutschrank	Stuart Scientific,GB
Bunsenbrenner	Integra Biosciences
Elektrophoresekammer	Roth
ElektrophoresekammerHorizon	Gibco BRL
Gelimager	Biometra,Göttingen
Inkubator	COTECH,Berlin
Kühlzentrifuge	Eppendorf
Laminarboxen	Stuart Scientific, GB
Luminometer,Lumat LB9501	Berthold
Magnetrührer	IKALabortechnik
Mikroskop	Olympus
Mikrowelle	Siemens
Quarz Meßküvette	Shimadzu
Stromversorgungsgeräte	Biometra,Göttingen
Thermocycler	Biometra,Göttingen
Ultra Turrax	Janke &Kunkel GmbH
Vortex	Jauke&Kunkel GmbH
Wasserbäder	Haake,Karlsruhe
Zentrifuge SORVALL MC 12V	DuPont

#### *Auflistung der verschiedenen Puffer*

##### **Gelelektrophorese:**

50x TAE-Puffer:	40mM	TRIS
	2mM	EDTA-Na <sub>2</sub> -Salz
	29,6	mM Essigsäure
	pH 7,8	



10xElektrophorese-Ladungspuffer:	20 %	Ficoll
	0,1 %	EDTA pH 8
	1,0 %	SDS
	0,25 %	Bromphenolblau

### **Zelllysate für Western Blot:**

MITO-Puffer:	1M Hepes pH 7,9
	0,1M EGTA
	0,5M EDTA
	250 mM Mannitol
	75mM Sucrose
	Proteinase-Inhibitoren/10ml
Lyse-Puffer:	10 mM Hepes pH 7,9
	10 mM KCl
	1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
	0,1 mM EDTA
	0,35 M Sucrose
	0,5 mM DTT
	Proteaseinhibitoren/10ml

### **Weitere Materialien Western Blot:**

#### **Antikörper:**

1. Antikörper: Monoklonaler anti-GPx4-AK  
gezogen in Maus  
resktiv mit humaner und muriner GPx4  
Firma BIOTEZ GmbH, Berlin
2. Antikörper: Peroxidase markiertes Anti-Maus IgG  
gezogen in Ziege  
Bestellnummer: A-4416  
Firma Sigma, Deisenhofen

**SDS-Elektrophorese:**

Acrylamid-Stammlösung	30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid
Sammel-Gelpuffer	0,5 M Tris, 0,4% SDS, pH 6,7
Trenn-Gelpuffer	1,5 M Tris, 0,6% SDS, pH 8,8
TEMED	
10% Ammoniumpersulfat	
5x Elektrophoresepuffer	125 mM Tris, 100 mM Glycin, 17 mM SDS
Blot:	
Anodenpuffer I	220,3 M Tris, pH 10,4, 20% Methanol
Anodenpuffer II	0,025 M Tris, pH 10,4, 20% Methanol
Kathodenpuffer	0,025 M Tris pH 9,4, 0,040 M 6-Aminocapronsäure

**Weitere Verbrauchsmaterialien Western Blot**

Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Nitrozellulose-Membran	Serva, Heidelberg
Hyperfilm MP 35x43 cm	Amersham Biosciences, Freiburg
Entwickler	Kodak

**2.1.3 Primer**

Für die aufgeführten PCR-Untersuchungen sind die nachstehend aufgeführten Primerkombinationen verwandt worden.

	F-Primer	R-Primer
GAPDH	5' CCA TCA CCA TCT TCC AGG AGC GA 3'	5' GGA TGA CCT TGC CCA CAG CCT TG 3'
GPx4	5' GTG CAT CCC GCG ATG ATT GGC-3'	5' CAG TTT TGC CTC ATT GCG AGG CC-3'
MG 1	5' GAA GTT GCT GAT GGT CCT CAT GCT 3'	5' GAG AAG GTG TGG TTT GCA GCA ATC 3'
Lip B	5' TGA AGC TGT CGG TGT GTC TCC TG 3'	5' GTG TCA TTG AAA GAC AGT GGA AAC C 3'
Hepsin	5' AGG CTC GAG TCC CCA TAA TCA GC 3'	5' CTG GCT TCG GAG TGA GTC TTT ATG 3'
MG 2	5' GAA GCT GCT GAT GGT CCT CAT GC 3'	5' ACC AAA TGC TGT CGT ACA CTG TAT G 3'
UTG	5' GAT CGC CAT CAC AAT CAC TGT GGT 3'	5' TAT CCT GGT CTC TTG TGG GAG GG 3'

### 2.1.4 Enzyme und Kits

Kits	
Invisorb Spin Tissue Kit	Invitex, Berlin
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gel Extractions Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Rnase free Dnase Set	Qiagen, Hilden
Turbo DNA-free	Ambion, Huntingdon
DNeasy Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
Polymerasen	
BD Advantage 2 Polymerase	BD Biosciences
M-MLV-Reverse Transcriptase RNase H minus	Promega, Mannheim
SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
Restriktionsenzyme	
EcoRI	New England Biolabs, Frankfurt/Main
HIND III	New England Biolabs, Frankfurt/Main
HpyCH4 IV	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Mae II	Roche, Mannheim
NE 2 10xPuffer	New England Biolabs, Frankfurt/Main
EcoRI 10xPuffer	New England Biolabs, Frankfurt/Main
HPY CH IV 10xPuffer	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Mae II 10xPuffer	Roche, Mannheim

*Transformation und Plasmidpräparation:*

**LB-Medium:**

1% Bacto-Tryptone	Difco, Detroit (USA)
0,5% Bacto-Hefe-Extrakt	Difco, Detroit (USA)
100mg/l Ampicillin	
0,5% NaCl	
1 mM NaOH	

**LB-Agar:**

1,5% Bacto-Agar	Difco, Detroit (USA)
1% Bacto-Tryptone	Difco, Detroit (USA)
0,5% Bacto- Hefe-Extrakt	Difco, Detroit (USA)
100mg/l Ampicillin	
0,5% NaCl	
1 mM NaOH	

**SOC-Medium:**

2% Bacto-Tryptone	Difco, Detroit (USA)
0,5% Bacto- Hefe-Extrakt	Difco, Detroit (USA)
20 mM Glucose	
2,5 mM KCl	
10 mM MgCl <sub>2</sub>	
10 mM MgSO <sub>4</sub>	
10 mM NaCl	

### 2.1.5 Zelllinien und Gewebe

Zur Untersuchung der verschiedenen Fragestellungen wurden folgende Gewebeproben verwandt:

#### *Untersuchung der Pseudogenexpression:*

Wildtyp: Maus, männlich, B1 6-Stamm, ca. 12 Wochen alt  
 Heterozygoter Knockout: Maus, männlich, N 12 (GPx4 into B6), 20 Wochen alt

#### *Zelllinien:*

COH-BR1: epitheliale Brustkrebszelllinie  
 zur Verfügung gestellt durch Prof. A. Girotti,  
 Department of Biochemistry, Medical College of Wisconsin  
 7G4: stabile GPx4 - Transfektante der COH-BR1-Zellen  
 zur Verfügung gestellt durch Prof. A. Girotti,  
 Department of Biochemistry, Medical College of Wisconsin

#### *Untersuchung der Expression ausgewählter Sekretoglobine*

Ovarialgewebe: humanen Ursprungs, weiblich, Alter variabel  
 Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck  
 Zur Verfügung gestellt durch Frau Prof. Hornung.  
 Auflistung der Gewebeproben mit Ziffern und entsprechender Begleitinformation (siehe nachstehende Tabelle)

Total RNA Survey Panel: RNA aus humanen Geweben  
 AMBION, Huntingdon (Großbritannien)  
 Organe: Fettgewebe, Harnblase, Gehirn, Cervix uteri, Colon, Ösophagus, Herz, Niere, Leber, Lunge, Ovarien, Plazenta, Prostata, Skelettmuskel, Dünndarm, Milz, Testis, Thymus, Thyroidea, Trachea

Gewebe	Histologie	Code No.	Stage (FIGO)	Grade	pTNM	Subtyp
maligne	serös	<b>707</b>	IV	3	pT3, pNx, pM1	Adenocarcinom
		<b>2140</b>	IIIc	3	pT3c, pN0, M0	papilläres Adenocarcinom
		<b>735</b>	IIIb	3	pT3b, pN1, pMx	papilläres Cystadenocarcinom
		<b>2322</b>	IIIc	3	pT3c, pN1, pMx	papilläres Cystadenocarcinom
		<b>713</b>	III	2	pT3c	papilläres Cystadenocarcinom
	muzinös	<b>996</b>	IV	n. a.	n. a.	Cystadenocarcinom
		<b>2132</b>	Ic	3	pT1c, pN0, M0	Adenocarcinom
		<b>2102</b>	IIIc	3	pT3c, pNx, M1, R2	Cystadenocarcinom
		<b>2330</b>	IIIc	3	pT3c, pNx, M1, R2	Cystadenocarcinom
		<b>2063</b>	IIc	3	pT2c, pN0, M0	Adenocarcinom
Metastasen	serös	<b>2261</b>	IV	n. a.	n. a.	Adenocarcinom
		<b>2259</b>	IIIc	3	pT3c, pNx	Cystadenocarcinom
benigne		<b>2250</b>				Dermoidzyste
Normal- gewebe		<b>2287</b>				
		<b>2280</b>				
		<b>2235</b>				
		<b>2255</b>				
		<b>2298</b>				
		<b>2045</b>				
		<b>2233</b>				
	<b>2232</b>					
		<b>2245</b>				

Tab. 8: Aufschlüsselung der ovariellen Gewebeproben nach der Histologie, dem Differenzierungsgrad und dem pTNM – Stadium. Die Informationen sind bei Probengewinnung während der chirurgischen Intervention erhoben und bei Übersendung der ovariellen Gewebeproben übermittelt worden.

*Histologische Klassifizierung der ovariellen Gewebeprobe:*

<b>Stage (FIGO)</b>	<b>n</b>		<b>n</b>
I	1	I	-
		Ia	-
		Ib	-
		Ic	1
II	1	II	-
		IIa	-
		IIb	-
		IIc	1
III	7	III	1
		IIIa	-
		IIIb	1
		IIIc	5
IV	3		
		IV	3
<b>Histologie</b>	<b>n</b>		<b>n</b>
Serous	3	adenocarcinoma	2
		cystadenocarcinoma	1
papillary serous	4	adenocarcinoma	1
		cystadenocarcinoma	3
Muzinous	2	cystadenocarcinoma	2
Squamous	1	adenocarcinoma	1
serous (metastases)	2	adenocarcinoma	1
		cystadenocarcinoma	1
Benign	1	dermoid cyst	1
healthy control	9	ovarian tissue	9
<b>Grade</b>	<b>n</b>	<b>Age*</b>	<b>n</b>
1	-	< 50	4
2	1		
3	9	> 50	8
not available	2		

Tab. 9: Klassifizierung der verschiedenen Eigenschaften der untersuchten Gewebeprobe

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Gewebe**

#### *Murine Gewebe zur Untersuchung der Pseudogenexpression*

Die Gewebe des heterozygoten Knockouts und die Ovarialgewebe wurden zur Verfügung gestellt und waren bereits präpariert. Die Gewebeproben waren bei Erhalt in Eppendorf-Gefäßen abgepackt und tiefgefroren. Die Gewebe sind nach Angabe der Absender sofort nach Entnahme in PBS-Puffer gewaschen und umgehend tiefgekühlt worden um Schädigungen des Gewebes vorzubeugen.

Um die Expressionslevel des Pseudogens im heterozygoten Knockout beurteilen zu können, wurde zunächst die Untersuchung der Pseudogenexpression bei Geweben des Wildtyps vorangestellt. Dazu war zunächst die Entnahme und Präparation von Organen des Wildtyps für weitere Untersuchungen notwendig. Zunächst erfolgte die Tötung der Tiere durch Inhalation von Etherdampf. Im Anschluss wurde die Bauchdecke durch einen Mediansagittalschnitt eröffnet und folgende Organe entnommen: Colon, Gehirn, Herz, Leber, Lunge, Magen, Milz, Niere, Skelettmuskel, Glandula submandibularis, Testis, Haut.

Nach Entnahme wurden die Gewebe in PBS gewaschen um Verunreinigungen durch Blut und Blutzellen zu reduzieren. Anschließend erfolgte die Überführung in Eppendorfgefäße und Gefrieren der Gewebe in flüssigem Stickstoff. Die schnelle Frostung diente zur Minimierung von schnell einsetzenden enzymatischen Prozessen, die die Zellstrukturen schädigen und zerstören.

#### *Humane Ovarialgewebe unterschiedlicher Dignität*

Die aufgeführten 22 ovariellen Gewebeproben sind einzeln verpackt und tiefgefroren übersandt worden. Die Proben sind intraoperativ gewonnen worden in der gynäkologischen Klinik des Universitätsklinikums Kiel. Beiliegend zu den nummerierten Proben waren die ergänzenden Informationen zu Histologie, TNM-Stadium und Alter der Patientin der Gewebe übersendet worden. Nach Erhalt sind die Gewebeproben weiter zur Durchführung weiterer präparativer Massnahmen bei -80° aufbewahrt worden.



## 2.2.2 RNA-Präparation

### *Aufarbeitung der Gewebe*

Zum besseren Zellaufschluss erfolgte zunächst die Zerkleinerung einer definierten Menge (ca. 30mg) jeden Gewebes in Lysepuffer (Qiagen) unter Zuhilfenahme des Ultraturax T25 Rotormesser-Homogenisator (Janke & Kunkel, Staufen). Das Homogenisat wurde mit Hilfe von RNeasy Mini und Midi Kit der Fa. Qiagen anhand des beiliegenden Protokolls weiterverarbeitet. Um Verunreinigungen mit genomischer DNA vorzubeugen erfolgte zudem die Behandlung mit DNase in Form des RNase-freie DNase Set, Qiagen.

### *Quantifizierung der RNA*

Nach Elution der präparierten RNA in einem definierten Volumen erfolgt die Messung der RNA-Konzentration in einer Quarzglasküvette am Fotometer. Dazu werden 2µl des Eluates mit RNase freiem Wasser im Verhältnis 1:40 verdünnt. Die Messung der Extinktion (E) erfolgt bei einer Wellenlänge ( $\lambda$ ) von 260nm und 280 nm. Der Quotient  $A_{260nm}/A_{280nm}$  lässt eine Aussage über die Qualität der RNA-Präparation zu. Ein Quotient  $>1,5$  bestätigt eine suffiziente Aufreinigung. Bevor die Umschreibung der präparierten mRNA mittels RT-PCR in cDNA erfolgt, müssen zunächst Verunreinigungen des RNA-Eluates mit DNA ausgeschlossen werden. Während der Präparation erfolgte bereits ein gründlicher DNase Verdau unter Zuhilfenahme des Qiagen DNase Kits. Um einen unvollständigen Verdau oder Verunreinigungen mit genomischer DNA auszuschliessen, wurde zunächst eine PCR mit den oben angegebenen Primern angesetzt. Als Template diente je 1µl (entsprechend 66ng) der aus den Gewebeproben präparierten RNA. Nach Abschluss der PCR erfolgte die Darstellung mittels Gel-Elektrophorese. Als Ergebnis ist bei nicht verunreinigter RNA keine Signalgebung in der Elektrophorese durch ein PCR-Produkt zu erwarten. Aufgrund der Einsträngigkeit der RNA kann die Bindung der Primer und Amplifikation des Fragmentes nicht erfolgen, so dass sich in der späteren Darstellung mittels Elektrophorese kein Signal darstellt. Bei einer Verunreinigung des Eluates und somit auch des Templates mit genomischer DNA würde die Amplifikation an der doppelsträngigen DNA erfolgen. Dadurch würde sich durch mehrfache Wiederholungen der Synthesezyklen eine Konzentration an Kopien einstellen, die sich in der Elektrophorese als Signal feststellen lässt. Nach dem Verunreinigungen der präparierten mRNA ausgeschlossen wurden, konnten sich weitere Schritte der Untersuchung anschliessen.

### *RT-Reaktion (reverse transcription-PCR)*

Bei der RT-Reaktion wird aus der präparierten RNA mittels einer Reversen Transkriptase cDNA synthetisiert. Dabei werden zunächst 3µg GesamtRNA aus murinen Geweben (oder 2µg GesamtRNA aus ovariellen Geweben) mit 3µl (1,5µg) Oligo-dt18-Primern und 1µl dNTP's (10mM) für 5min bei 65° im Thermoblock der Firma Biometra inkubiert, anschließend im Eisbad gekühlt und abzentrifugiert. Nach erneuter Erwärmung auf 42° wird dem Reaktionsansatz ein zuvor angefertigter Mix aus 4µl 5xFirst-Strand-Buffer, 2µl DTT (0,1M), 40U RNase Out und 200 U SuperScript II Reverse Transkriptase zugesetzt. Nach Abschluss der 50 minütigen Inkubation bei 42° wird die Reaktion durch Erhöhung der Temperatur auf 72° für 15min gestoppt.

#### 2.2.3 Untersuchung der Pseudogen-Expression

##### *Vorüberlegungen*

Zur Analyse von Expressionsmustern des Pseudogens und des GPx4-Gens, war es zunächst nötig eine Strategie zur Unterscheidung beider Strukturen zu entwickeln. Es ist zu erwarten, dass das Protein, das durch die Expression des Pseudogens gebildet wird, identisch zu dem des GPx4-Gens ist. Eine Aussage über die Herkunft des Proteins ist auf dieser Ebene nicht möglich zu treffen.

Auf mRNA-Ebene ist eine Differenzierung anhand von Unterschieden in der Sequenz möglich. Dabei werden Stellen der Sequenz verwandt, die zum einen Punktmutationen, als auch Spaltorte von Restriktionsenzymen aufweisen. Anhand verschiedener Spaltpattern nach Inkubation mit einem entsprechenden Restriktionsenzym lässt sich eine Zuordnung zu ursprünglichen Strukturen/ Genen treffen. Anhand der vergleichenden Analyse von Restriktionskarten zwischen der GPx4-cDNA und dem Pseudogen ergaben sich Unterschiede in der Sequenz. Die Überlegung war dabei, die mRNA des Pseudogens und des GPx4-Gens anhand von Mutationen die zudem auch Restriktionsspaltorte von Enzymen sind gegeneinander abzugrenzen. Bei Analyse der Restriktionskarte des Pseudogens zeigte sich eine Punktmutation bei 121bp, die zu einer Deletion eines Spaltortes der Restriktionsenzyme MAE II und HPYCH IV führt, der hingegen in der GPx4-cDNA vorhanden ist. Um diese Punktmutation nutzen zu können, wurde ein cDNA-Stück der Region zwischen 5bp und 148bp zur Amplifikation mittels PCR gewählt. Mit der im Kapitel 2 angegebenen Primerkombination sollte die Synthese des 143 bp langen Fragmentes erfolgen. Im Anschluss kann das Fragment der Spaltung mit dem

Restriktionsenzym MAE II unterzogen werden. Die erwarteten Spaltfragmente nach der Inkubation mit dem Restriktionsenzym MAE II liegen für die GPx4-cDNA bei 117bp und 26 bp. Das Fragment des Pseudogens bleibt unverändert bei einer Größe von 143bp aufgrund der Punktmutation bei 121bp, die zur Deletion des Spaltortes des Restriktionsenzym führt. Die Ergebnisse der Spaltung kamen in der Elektrophorese zur Darstellung. Zur Trennung der Spaltfragmente wurde ein 4% iges Agarosegel gewählt.

### *Präparation genomischer DNA*

Die Präparation der genomischen DNA erfolgte jeweils aus Lebergewebe (20mg) des Wildtyps und der zwei heterozygoten Knockout-Tiere. Die Präparation erfolgte mit Hilfe des Invisorb Spin Tissue Kits von Invitex. Um Verfälschungen der Ergebnisse durch Verunreinigungen durch RNA zu vermeiden, wurde die präparierte DNA einem Verdau durch RNase von Qiagen unterzogen. Im Anschluß an die Elution erfolgte die Analyse der präparierten DNA durch horizontale Elektrophorese. Dabei konnte sowohl die Fragmentation der DNA durch Scherkräfte während der Zentrifugation als auch RNA-Verunreinigungen ausgeschlossen werden, die in der Darstellung mittels Elektrophorese als Signal detektierbar wären.

### *PCR an genomischer DNA*

Für die PCR wurden jeweils 100ng präparierter genomischer DNA des Wildtyps und der zwei Knockout-Tiere als Template eingesetzt.

<b>Bindungsort</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Fragment</b>
Wildtyp-Allel	GPx4 KO WT	5'-CTA CGG TGA GTA GGT AGA-3'	350 bp
	GPx4 KO W2	5'-GGC CCT GGT TTC TAT GTA-3'	
Knockout-Allel	GPx4 KO MT	5'-GTA GGA TAT GCC CTT GAC T- 3'	800bp
	GPx4 KO W2	5'-GGC CCT GGT TTC TAT GTA-3'	

**Tab. 10:** Primer zur Genosequenzierung von Wildtyp und heterozygoten Knockout

Die PCR an genomischer DNA erfolgte nach unten stehendem tabellarisch dargestelltem Reaktionsablauf. Die anschließende Darstellung erfolgte im 2%igen Agarosegel.

	Denaturierung	99.9°C	10 min
	Abkühlung	4°C	5 min
	Denaturierung	94°C	2min
Zyklus (11 Wiederholungen)	Denaturierung	94°C	20 sec
	Hybridisierung	62°C	30 sec
	Synthese	72°C	1min 10 sec
Zyklus (34 Wiederholungen)	Denaturierung	94°C	20 sec
	Hybridisierung	57°C	30 sec
	Synthese	72°C	1min 10 sec
	Synthese	72°C	7min
	Abkühlung	auf 4°	

**Tab. 11:** Reaktionsschema der PCR an genomischer PCR

### *Zur Untersuchung der mRNA Expression*

In der Vorbereitung der präparativen Spaltung war eine ausreichende Menge an PCR-Produkt nötig. Dafür erfolgte zunächst der mehrfachen Ansatz einer RT-PCR für jedes präparierte murine Organ entsprechend untenstehenden Reaktionsablauf.

	Denaturierung	95°C	1 min 30 sec
Zyklus (29-34 Wiederholungen)	Denaturierung	95°C	30 sec
	Synthese	68°C	1 min
	Synthese	68°C	3 min
	Abkühlung	auf 4°C	

**Tab. 12:** Reaktionsablauf der RT- PCR

Dem Reaktionsansatz der PCR zu 50 µl werden neben 1µl Template aus der RT-Reaktion (entsprechend 66ng RNA) zusätzlich beigefügt: 4µl Primer-Mix (0,2mM), 5µl 10x Advantage Puffer, sowie 1µl Advantage-Polymerase.

Nach Abschluss der PCR-Reaktion wurden die PCR-Ansätze jedes Organs mit Molekulargewichtsmarker in ein 1,5%iges Agarosegel eingebracht. Nach elektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Exzision der solitären Bande bei 143bp. Die einzelnen Gelfragmente der murinen Organe wurden im Anschluss einer Weiterverarbeitung unter Zuhilfenahme des Gelextraktions-Kits von Qiagen unterzogen. Nach Elution der präparierten Fragmente in destilliertem Wasser schloss sich direkt eine Mengenbestimmung im 2%igen Agarosegel an. Die ermittelten Konzentrationen für jede Gewebeprobe lagen im Bereich von 10-25ng/µl.

### *Restriktionsenzymspaltung*

Der Spaltansatz zur Untersuchung der murinen Pseudogenexpression umfasst einen 50µl Ansatz. Dabei werden folgende Organe der Spaltung unterzogen: Colon, Gehirn, Herz, Leber, Lunge, Magen, Muskel, Niere, Testis. Für die Spaltung werden von jedem präparierten murinen Organ 240ng eingesetzt Zur Kontrolle einer suffizienten Spaltung werden im selben Ansatz GPx4 cDNA, sowie GPx4 Pseudogen 1 in selbiger Konzentration gespalten. In der späteren Darstellung ist eine komplette Spaltung der cDNA bei existenter Spaltstelle in zwei Fragmente der Größe 117bp und 26bp zu erwarten. . Das Restriktionsenzym MAEII (bzw. HPY CHIV 4) wird dem Spaltansatz in zehnfachem Überschuss zugefügt. Die Spaltung erfolgt entsprechend dem Manual des Herstellers bei 37° über Nacht. Am Morgen erfolgt eine Nachspaltung mit 1µl des verwandten Restriktionsenzym.

### *Darstellung der Spaltprodukte*

Zur Darstellung der Spaltprodukte wird der gesamte Spaltansatz in ein 4%iges Agarosegel eingebracht. Zuvor werden die Proben mit 5µl Ladungspuffer versetzt. Unter Anlage von elektrischer Spannung und Zugabe von 1fachem Ladungspuffer erfolgt die Auftrennung der entstandenen Produkte. Aufgrund des geringen Größenunterschiedes der einzelnen Fragmente ist ein höherprozentiges Agarosegel gewählt worden. Nach Ablauf der Gelelektrophorese erfolgt die Begutachtung unter UV-Licht und Dokumentation durch den Gel Imager von Biometra.

### *Sequenzierung des Spaltproduktes*

Zur Bestätigung der Spaltstrategie und Dokumentation der Expression eines murinen Pseudogens erfolgte ebenfalls die Sequenzierung der Spaltprodukte nach Aufarbeitung des Agarosegels. Nach Auftragung des Spaltansatzes im 4%igen Agarosegel und Auftrennung der Spaltfragmente schloss sich unmittelbar die Exzision des ungespaltenen Fragmentes von 143bp an. Unter Berücksichtigung der zuvor angestellten Überlegungen zu den erwarteten Spaltfragmenten war keine Spaltung des Pseudogens bei fehlendem Spaltort aufgrund einer Punktmutation zu erwarten. Für die cDNA sind bei existentem Spaltort unter Spaltung mit dem entsprechenden Spaltenzym Fragmente der Größen 117bp und 26 bp. Zum Ausschluss eines methodischen Fehlers sollte nun die Bestimmung der Sequenz aus dem oberen Fragment bei 143bp erfolgen. In der späteren Sequenz sollte eine Punktmutation bei 121bp von Cytosin zu Tyrosin nachweisbar sein. Nach Exzision des Fragmentes wurde das Gelstück unter Zuhilfenahme des Gelextraktions-Kit von Qiagen weiterverarbeitet. Nach vorliegendem Protokoll erfolgte die schrittweise Aufarbeitung des Gelfragmentes. Nach Elution schloss sich eine Tailing Prozedur vor weiteren Schritten an die Gelextraktion an. Die Idee ist eine Bestückung des PCR-Fragmentes mit Poly-A-Enden unter der Annahme, dass diese während der Prozedur der Aufarbeitung verlustig gewesen sind. Für die weiteren Schritte ist die Struktur eines frisch synthetisierten PCR-Produktes, die ebenfalls das Vorhandensein von Poly-A-Enden beinhaltet, essentiell. Dabei umfasste der Ansatz neben 21µl Eluat zudem 0,5µl dNTPs, 1µl PCR-Polymerase mit 2,5 µl entsprechenden Puffers. Der Ansatz ist einer Inkubation bei 72° für 15min unterzogen worden.

### *Klonierung:*

Nach Abschluss der Tailing-Prozedur erfolgte die Klonierung des suspizierten Pseudogen-Fragmentes. Dabei besteht die Möglichkeit geringe Mengen der Pseudogen-DNA, die aus der Gelextraktion gewonnen wurden, zu amplifizieren. Mittels des TOPO TA Cloning – Kits von Invitrogen erfolgte die Klonierung des Pseudogen-Fragmentes in den Vektor mit anschließender Transformation in One Shot® TOP 10 kompetente Zellen von Invitrogen. Entsprechend des Protokolls erfolgte die Inokulation der Bakterien auf eine LB-Agar Platte und mit anschließender Inkubation für 12-16 Stunden bei 37°.

Die Bakterienkolonien, die später der Testung auf das Plasmid zugeführt werden sollen, werden einzeln aufgenommen und in LB-Selektionsmedium vermehrt. Nach erneuter

Inkubation von 12 Stunden unter konstanter horizontaler Bewegung erfolgt die Plasmidpräparation mit Hilfe des Qiaprep Spin Miniprep Kit von Qiagen.

### *Kontrollspaltung*

Der Plasmidpräparation folgte in der weiteren Prozedur eine Kontrollspaltung. Zuvor wurden unter Berücksichtigung des Spaltorte für das entsprechende Restriktionsenzym die Größe der erwarteten Spaltfragmente ermittelt. Hinsichtlich der Spaltorte von Pseudogen und GPx4-cDNA waren nach Spaltung mit dem Restriktionsenzym HpyCH4 IV elf verschiedene Spaltfragmente zu erwarten. Für die GPx4 cDNA waren zusätzlich zwei Fragmente der Größe 140bp und 234bp zu erwarten.

Zur Kontrollspaltung wurden je 500ng präparierter Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym HpyCH4 IV im zehnfachen Überschuss und zugehörigem Puffer für 2 Stunden bei 37° inkubiert. Zum Ende der Spaltung erfolgte die Hitzeinaktivierung für 10 min bei 65°. Im Anschluss wurden die Spaltansätze in ein 2,5%iges Agarosegel eingebracht und die einzelnen Spaltfragmente kamen nach Auftrennung zur Darstellung. Entsprechend der Größe der Spaltfragmente konnten einzelne Plasmide ausgewählt werden, die zur Sequenzierung eingeschickt wurden an MWG Biotech. In unten stehender Abbildung zeigt sich die Sequenz der ausgewählten Klone zur Dokumentation des Spaltergebnisses.

<b>Spleen PSE1 Clon6</b>	1	GTGCATCCCGCGATGATTGGCGCTGTGCGCGCTCCATGCACGAA	44
<b>Spleen PSE1 Clon25</b>	1	GTGCATCCCGCGATGATTGGCGCTGTGCGCGCTCCATGCACGAA	44
<b>Spleen PSE1 Clon17</b>	1	GTGCATCCCGCGATGATTGGCGCTGTGCGCGCTCCATGCACGAA	44
<b>cDNA GPx4</b>	1	GTGCATCCCGCGATGATTGGCGCTGTGCGCGCTCCATGCACGAA	44
<b>Spleen PSE1 Clon6</b>	45	TTCTCAGCCAAGGACATCGACGGGCACATGGTCTGCCTGGATAA	88
<b>Spleen PSE1 Clon25</b>	45	TTCTCAGCCAAGGACATCGACGGGCACATGGTCTGCCTGGATAA	88
<b>Spleen PSE1 Clon17</b>	45	TTCTCAGCCAAGGACATCGACGGGCACATGGTCTGCCTGGATAA	88
<b>cDNA GPx4</b>	45	TTCTCAGCCAAGGACATCGACGGGCACATGGTCTGCCTGGATAA	88
<b>Spleen PSE1 Clon6</b>	89	GTACAGGGGTTTCGTGTGCATCGTCACCAA	132
<b>Spleen PSE1 Clon25</b>	89	GTACAGGGGTTTCGTGTGCATCGTCACCAA	132
<b>Spleen PSE1 Clon17</b>	89	GTACAGGGGTTTCGTGTGCATCGTCACCAA	132
<b>cDNA GPx4</b>	89	GTACAGGGGTTTCGTGTGCATCGTCACCAA	132
		<b>T</b>	<b>C</b>
		GTGGCCTCGCAAT	132
		GTGGCCTCGCAAT	132
		GTGGCCTCGCAAT	132
		GTGGCCTCGCAAT	132
<b>Spleen PSE1 Clon6</b>	133	GAGGCAAACTG	144
<b>Spleen PSE1 Clon25</b>	133	GAGGCAAACTG	144
<b>Spleen PSE1 Clon17</b>	133	GAGGCAAACTG	144
<b>cDNA GPx4</b>	133	GAGGCAAACTG	144

Abb. 4: Sequenzalignment zu den ausgewählten Klonen zum Nachweis des Pseudogen 1 im murinen Gewebe. Dabei ist der entscheidende Unterschied zwischen cDNA und Pseudogen 1 in Form einer Punktmutation an Position 119 markiert. An dieser Position ist die Base Thyrosin (cDNA der GPx4) gegen die Base Cytosin beim Pseudogen 1 ausgetauscht.

## 2.2.4 Herstellung von Zelllysaten

Ziel der Herstellung von Zelllysaten ist die Gewinnung von Proteinen der einzelnen Zellkompartimente. Damit können in der weiteren Aufarbeitung Aussagen zur Höhe von expression insbesondere auf Proteinebene entsprechend des Kompartimentaentes getroffen werden. In der angewendeten Methode werden Lysate aus dem Zytosol, den Mitochondrien und dem Nucleus der untersuchten Zellen gewonnen werden. Zur Untersuchung werden COH-BR-1-Zellen (Brustkrebszelllinie) in Form des Wildtyps und der stabilen Transfektante 7G4 herangezogen. Dem weiteren Procedere wird die Gewinnung der Zellen im Ablauf nach folgender Methode vorangestellt:

Zunächst wurden die COH-BR1-Zellen nach Erreichen eines präkonfluenten Zustandes einer zweifachen Waschprozedur mit DPBS-Lösung unterzogen. Im Anschluss erfolgte die Zellernte mit Überführung des Zelllysates in ein 50ml Falcon-Tube und abschließender Zentrifugation für die Dauer von fünf Minuten bei 1000rpm. Das entstandende Zellpellet diente als Ausgangsmaterial für den weiteren Aufschluss in nukleäre, mitochondriale und zytosolische Extrakte. Zur Einleitung der weiteren Präparation erfolgte nun die Resuspension des Zellpellets mit dem vierfachen Volumen an MITO-Puffer und anschließender Zerkleinerung im Glas-Homogenisator. Ein erneuter Zentrifugationsschritt unter 4° bei 600rpm für 10min führt erneut zum Entstehen eines Pellets mit dem Hauptbestandteil von Zellkernen. Der Überstand mit zytosolischen und mitochondrialen Proteinen wird in ein neues Eppendorfgefäss überführt. Das Eppendorfgefäss mit den Zellkernen im Pellet wird erneut der oben beschriebenen Präparation mit Resuspension in MITO-Puffer und Zentrifugation unterzogen. Erneut wird der Überstand in das bereits vorhandene Eppendorfgefäss überführt. Eine erneute Zentrifugation bei 14000 rpm für 20 Minuten führt zur Bildung eines weiteren Pellets, das nunmehr die Mitochondrien der homogenisierten Zellen enthält. Nach Abnahme des Überstandes, der die zytosolischen Proteine enthält, in ein weiteres Eppendorfgefäss, sind nun die drei Zellkompartimente in drei verschiedenen Eppendorfgefässen aufgeschlossen.

### *Lyse von Kern- und Mitochondrienmembran*

In den nun gewonnenen Extrakten liegen Mitochondrien und Nuclei jeweils in Pelletform aktuell vor. Zum weiteren Aufschluss, insbesondere der Lyse der Membran werden beide Pellets in entsprechendem Lysepuffer resuspendiert. Im nachfolgenden Schritt werden die resuspendierten Pellets durch Schockfrieren und erneutes Auftauen lysiert. Nach Abschluss



der sich anschließenden Zentrifugation für 5min bei 10 000rpm werden die einzelnen Lysate in neue Eppendorfgläser überführt. Zur Bestimmung des Proteingehaltes in den präparierten Lysaten wird die Methode nach Bradford hinzugezogen, Dabei wird für alle Fraktionen die Proteinmenge bestimmt.

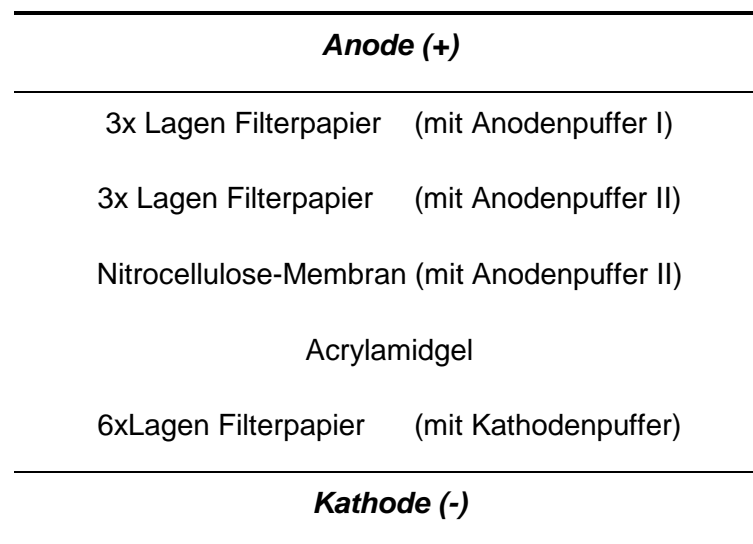
### 2.2.5 SDS-Gelelektrophorese

Das Auftrennen der präparierten Proteingemische nach Molekulargewichten wird unter Zuhilfenahme der SDS-Gelelektrophorese vollzogen. Dazu werden die Proteinextrakte mit einfachem Volumen an Ladungspuffer versetzt und für 7 min bei 95° der Denaturierung zugeführt. Die Proteinextrakte werden im Anschluss ins Acrylamidgel (4%iges Sammelgel, 12,5%iges Trenngel) eingebracht und unter Anlage von elektrischer Spannung und Zugabe von Elektrophoresepuffer aufgetrennt. Nach Durchführung der Elektrophorese werden die Proteinbanden mit Coomassie-Blau angefärbt.

### 2.2.6 Western Blot

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteingemische werden die Proteine auf Nitrozellulose als Trägermembran übertragen. Die Position der aufgetrennten Proteine bleibt dabei erhalten, nur werden diese zugänglich für die weitere Inkubation mit Antikörpern.

Die Anordnung der einzelnen Schichten erfolgt nach folgendem Schema:



Der Vorgang der Proteinübertragung wird unter einer elektrischen Spannung von 10 Volt für 1h vorgenommen. Nach Abschluss der Prozedur folgt das Anfärben der Trägermembran mit Ponceaurot-Lösung zur Kontrolle des Prozedur-Erfolges. Ein

Waschschrift schließt sich dem Färbeschrift zum Entfernen überschüssiger färbender Lösung an.

### *Behandlung der Trägermembran*

Nach abgeschlossenem Transfer der Proteine auf die Trägermembran schließt sich ein Schritt zum Blockieren freier Proteinbindungsstellen an. Dafür wird 5%ige Magermilchlösung (PBS/0,1%Tween20) verwandt und unter horizontalen Bewegungen mit der Blotmembran für 1h inkubiert. Nach Abschluss des Inkubationsvorgangs fügt sich ein Waschschrift mit PBS/Tween-Lösung für 3-5min ein. In der weiteren Prozedur folgt nun die Inkubation der Membran mit dem 1. Antikörper für erneut 60 min. Nach vollzogenem Waschschrift zur Entfernung von überschüssigen Anteilen erfolgt die Inkubation mit dem 2. Antikörper, der zudem Peroxidase-markiert ist, für eine weitere Stunde. Nach erneutem Waschen der Membran mit PBS/Tween-Lösung für weitere 5 min, folgt ein ausschließlicher Waschschrift mit PBS.

Im Anschluss erfolgt nun die Sichtbarmachung der einzelnen reaktiven Banden durch Chemolumineszenz. Unter Zuhilfenahme einer Luminol-Substratlösung katalysiert Enzym, das an den 2. Antikörper gekoppelt ist, die Umsetzung des Luminol, so dass ein entstehendes Signal auf einem Film konserviert werden kann.

### 2.2.7 FACS-Analysen

Zur Einsaat kamen dabei 500 000 Zellen pro Ansatz, die bis zu einem präkomfluenten Wachstum kultiviert wurden. Dem schließt sich ein zweifacher Waschschrift mit PBS an. Weiterführend werden die Zellen mit 1ml 5 $\mu$ M DCFH-DA-PBS-Lösung für 30 min inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation erfolgt ein erneuter Waschschrift mit 2ml PBS. Zur weiteren Präparation werden die Zellen für 5-10 min mit Trypsin inkubiert bei 37°. Der lysierende Schritt wird durch die Zugabe von 3 ml Medium gestoppt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1000rpm wird der Überstand verworfen und das entstandene Pellet in 1-2ml PBS resuspendiert. Eine erneute Zentrifugation bei 1300 rpm für 5 min trennt die korpuskulären Anteile durch Ausbildung eines Zellpellets. Dieses wird in 500 $\mu$ l PBS aufgenommen und der FACS-Messung zugeführt.

Zur Darstellung der Ergebnisse kommen Histogramme, der statistischen Auswertung wird der GeoMean (geometrischer Mittelwert einer Fluoreszenz) herangezogen (Watson, 1992).

### 2.2.8 Microarray-Untersuchungen

Zur Untersuchung von Expressionen von Genen erfolgte die Auswertung mittels Gene-Chip Human Genome U133A 2.0 Array von Affymetrix. Dieser Chip umfasst die Analyse von 18 400 Transkripten und weiteren Varianten. Darin eingeschlossen sind 14.500 bereits bekannte und charakterisierte Gene humanen Ursprungs. Für die Untersuchung ist die epitheliale Brustkrebszelllinie COH-BR1 verwandt worden. Ziel der Analyse ist die Transkription von Genen in der stabilen Transfektante 7G4 der Zelllinie und im Vergleich zu der Vektorkontrolle der Zelllinie zu messen. Mögliche Veränderungen wie die Hoch- oder Herabregulation, als auch das An- und Abschalten von Genen in diesem Zellmodell werden durch den Microarray-Chip dokumentiert. Das Probenmaterial, das zur Microarray-Untersuchung verwandt wurde, musste zunächst präpariert werden. Zur Untersuchung wurde die Zelllinie COH-BR1 (epitheliale Brustkrebszelllinie) mit den einzelnen Subtypen Wildtyp, Vektorkontrolle und 7G4 herangezogen.

Zunächst wurden die Zellen bis Erreichen des Stadiums der Präkonfluenz kultiviert. In diesem Stadium wurden die Zellen mit Trypsinlösung für 7min bei 37° inkubiert. Nach Abschluss dieses Schrittes erfolgte die Resuspension in 10 ml DPBS Medium mit anschließender Zentrifugation für 5min bei 1000rpm. Zur weiteren Präparation von RNA kam der RNeasy Mini Kit von Qiagen entsprechend des Protokolls zur RNA-Extraktion zur Anwendung. Nach Abschluss der Prozedur und photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes konnte die isolierte RNA der Zelllinie COH-.BR1 der weiteren Microarray Untersuchung zugeführt werden. Dabei sind 20µl mit 800ng/µl zur Micro-Array-Analyse versandt worden.

### 2.2.9 Untersuchung der ovariellen Gewebeproben

Die Proben des ovariellen Gewebes sind durch Frau Prof. Hornung zur weiteren molekularbiologischen Untersuchung zur Verfügung gestellt worden. Direkt nach Entnahme der Gewebe im Rahmen der chirurgischen Intervention sind die Gewebeproben mit flüssigem Stickstoff schockgefroren worden. Eine Übersendung nach Berlin erfolgte weiterhin im gefrorenen Zustand unter Zuhilfenahme von Trockeneis. Zur weiteren molekularbiologischen Untersuchung der Gewebe war zunächst die Präparation von RNA aus den Zellen indiziert. Gemäß der bereits oben beschriebenen Methodik (Kapitel 2.1.3) wurde die Präparation von RNA durchgeführt unter Zuhilfennahme der kommerziell verfügbaren Kits RNeasy Mini Kit, Qiagen, sowie RNase-free DNase-Set, Qiagen.

### 2.2.10 Untersuchungen RNA-Panel

Zur Untersuchung von verschiedenen humanen Geweben ist das AMBION First Choice Human Total RNA Survey Panel herangezogen worden. Dabei handelt es sich um bereits kommerziell verfügbare RNA-Lysate, die 20 verschiedene humane Normalgewebe abbilden.

#### *Quantitative Real-Time PCR*

Bei der Real-Time PCR lässt sich neben der Amplifikation von Fragmenten unter anderem auch eine quantitative Bestimmung der synthetisierten Transkripte vornehmen. Zudem lässt sich auch eine Aussage über die Homogenität von Syntheseprodukten durch die Analyse der zugehörigen Schmelzkurve treffen. Zur Durchführung der Real-Time PCR wurde das Gerät Rotor Gene 3000 der Firma CORBETT-Research verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels der zugehörigen Software Rotor Gene 3000 Version 4.6. Die Reaktion wird in einem Volumen von 10 µl angesetzt und entspricht folgender Zusammensetzung: 1 µl cDNA, 1,2 µl Primer-Mix (0,1 mM), 5 µl 2x QuantiTect Sybr-Green PCR Kit. Der Reaktionsablauf der Real-Time-PCR ist in nachstehender Tabelle aufgeführt.

Denaturierung		95°C	15 min
40 Zyklen	Denaturierung	94°C	30sec
	Annealing	65°C	30 sec
	Synthese	72°C	30sec

Tab. 13: Reaktionsablauf der Real-Time-PCR

Zur Berechnung der Genexpressionshöhen der untersuchten Gene wurde die Anzahl von synthetisierten Transkripten aus der gemessenen Extinktion und den Ct-Werten (cycle threshold) verwandt. Als Grundlage erfolgte eine Standardpräparation bei der zunächst Standardkurven mit Amplikons spezifisch für jedes PCR-Produkt erstellt wurden. Die Standardkurve wird als Eichkurve innerhalb der programmgestützten Auswertung durch Rotor-Gene in das abgeschlossene Experiment importiert. Bezüglich des PCR-Produktes erfolgte die Überprüfung der Homogenität durch Analyse der Schmelzkurve des amplifizierten Produktes. Die Erstellung der Schmelzkurve erfolgt durch schrittweises Erwärmen der Proben von 60° auf 99° mit Analyse des Schmelzverhaltens des PCR-Produktes.

### *Aspekte zur Homogenität des PCR-Produktes*

Im Rahmen der Auswertung der Real-Time PCR, wurde ebenso eine Analyse der Schmelzkurven jeden PCR-Ansatzes vorgenommen. Dabei konnte jeder ermittelten Schmelzkurve ein entsprechender PCR-Ansatz zugeordnet werden. Die Analyse der Schmelzkurven der Real-Time PCR erfolgte zum Ausschluss möglicher Misch- oder Nebenprodukte, die während Synthese entstanden sein könnten. Die Amplifikation weiterer Fragmente würde zu einer Verfälschung der aus den Daten ermittelten Ergebnisse führen. In nachstehender Abbildung sind die computergestützt ermittelten Schmelzkurven der amplifizierten Fragmente ersichtlich. Die Schmelzkurven zeigen je ein Maximum, das für jedes PCR-Produkt bei einer spezifischen Temperatur liegt. Aufgründdessen sollten die Schmelzkurven aller PCR-Ansätze für das entsprechende Fragment ihr Maximum bei dieser Temperatur haben und sich symmetrisch im Verlauf zeigen. Durch die Abbildung eines Maximums in der Schmelzkurve lassen sich Rückschlüsse auf ein homogenes, singuläres PCR-Produkt erheben.

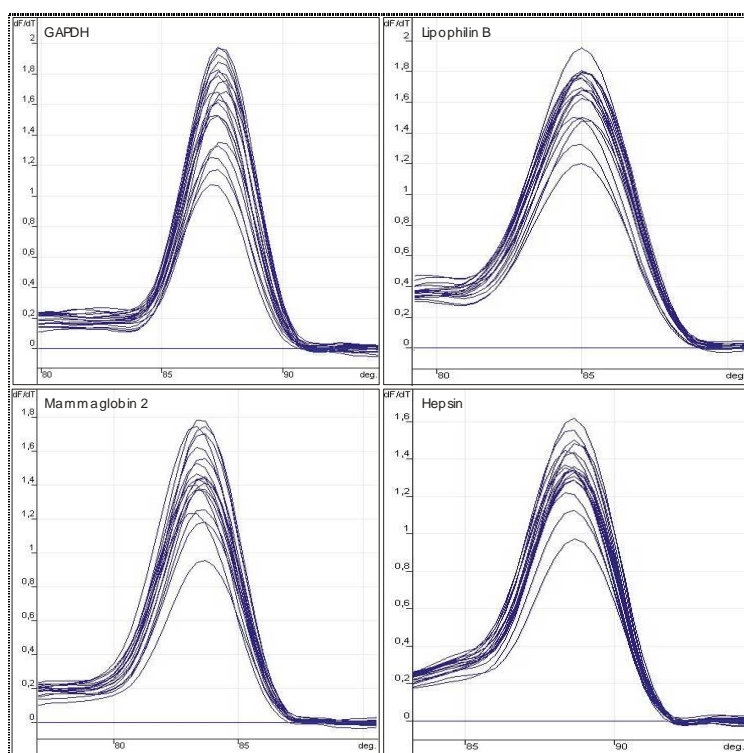


Abb. 5: Darstellung der Schmelzkurven der einzelnen untersuchten Parameter. Die Ermittlung der Schmelzkurven erfolgte während der Durchführung der Real Time-PCR. Neben der Auftragung des PCR-Produktes in der Gelelektrophorese zur Beurteilung der Reinheit des Amplifikates wurden ebenso die Schmelzkurven in die Untersuchung miteinbezogen um die Bildung von Nebenprodukten während der Synthese ausschließen zu können. Jede Kurve repräsentiert jeweils ein PCR-Ansatz. In der obigen Abbildung finden die Schmelzkurven aus der Untersuchung des RNA-Panels ihre Darstellung.

Abweichend zeigen die Schmelzkurven des amplifizierten MG 1-Fragmentes in Abb. 6 eine Doppelgipfligkeit mit zwei Maxima in ihrem Verlauf. Die Ausbildung von zwei Maxima zeigte sich konsequent unabhängig des Substrates bei der Real-Time PCR.

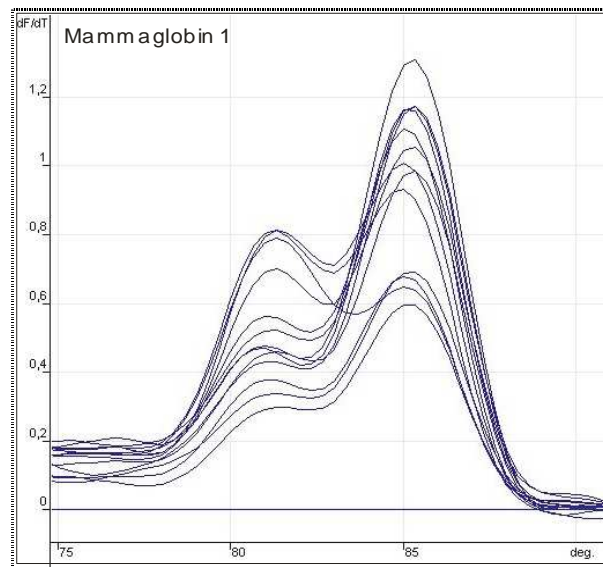


Abb. 6: Darstellung der Schmelzkurve des Parameters Mammaglobin 1. Die Schmelzkurve zeigt die Ausbildung von zwei Maxima im Gegensatz zu den Schmelzkurven der anderen untersuchten Parameter. Die Bildung von Misch- und Nebenprodukten bei dieser PCR konnte durch Sequenzierung des PCR-Produktes und die Abbildung einer singulären Bande in der Gelelektrophorese ausgeschlossen werden. Als mögliche Ursache einer doppelgipfligen Schmelzkurve kommt die Ausbildung von sekundären RNA-Strukturen in Betracht.

Demnach musste aufgrund dieser Doppelgipfligkeit der Schmelzkurve vor der Erhebung von Ergebnissen aus den Untersuchungen der Real-Time PCR, die Amplifikation von weiteren Fragmenten, z.B. durch unspezifische Primerbindung ausgeschlossen werden. Dazu erfolgte die Sequenzierung der PCR-Produkte, die ausschließlich eine Amplifikation des Mammaglobin 1-Fragmentes in der Real-Time PCR bestätigte. Neben der Beurteilung der ermittelten Schmelzkurven der PCR-Fragmente erfolgt zudem eine Auftragung und Darstellung des PCR-Ansatzes nach Abschluss der Real-Time PCR im 1,5% igen Agarosegel. Diese Methode diente zur Bestätigung eines singulären PCR-Produktes. Die aufgetragenen PCR-Ansätze für die Untersuchungen am RNA- Panel zeigt die Abb. 23. In der Abbildung ist für jeden untersuchten Parameter eine einzelne Bande gezeigt, so dass weitere Syntheseprodukte ausgeschlossen werden können. Insbesondere für das Mammaglobin 1-Fragment stellt sich eine einzelne Bande dar, so dass trotz der Doppelgipfligkeit in der Schmelzkurve nicht von der Bildung von Nebenprodukten ausgegangen werden kann. Zudem bilden sich die einzelnen Fragmentgrößen entsprechend der zuvor bestimmten Primerbindungsstelle und errechneten Größe.

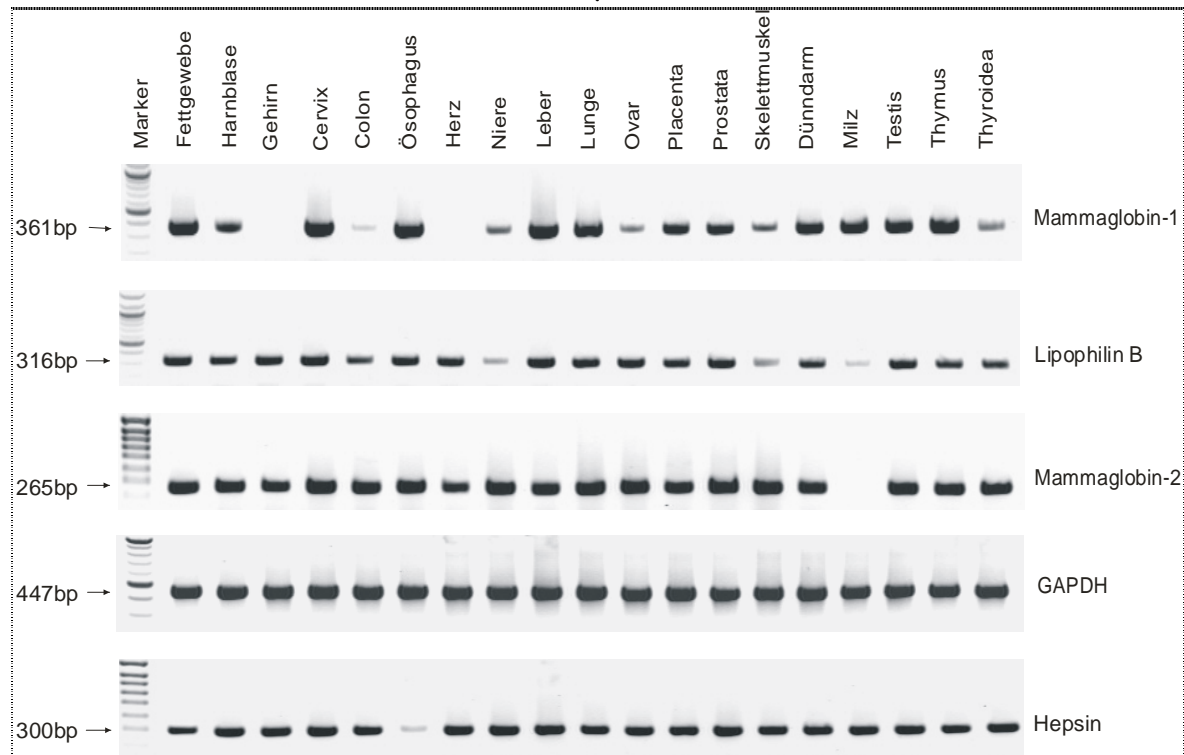


Abb. 7: Darstellung der amplifizierten Fragmente zur Dokumentation eines singulären PCR-Produktes ohne Nebenprodukte. Die PCR-Ansätze stammen aus der Real-Time PCR und fanden ihre Abbildung nach Ablauf der Reaktion mittels Gelelektrophorese.

### 2.2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde anhand der Daten, die aus den Expressionsuntersuchungen der Sekretoglobine in ovariellen Gewebeproben ermittelt wurden, vorgenommen. Die statistische Analyse erfolgte unter Zuhilfenahme des Programms SPSS 12.0 für Windows.

Zunächst wurden die Werte mittels der deskriptiven Statistik abgebildet. Dabei wurden der arithmetische Mittelwert, die Standardabweichung und der Median, sowie Minimum und Maximum bestimmt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit erfahren die Ergebnisse überwiegend Abbildung in Form von Tabellen, Balkendiagrammen und Boxplots. In der Darstellung der Boxplots ist sowohl der Median als auch Minimum und Maximum ersichtlich. Weiterhin finden Ausreißer, die um mehr als anderthalb Boxlängen außerhalb liegen in der Abbildung, ihre Darstellung in Form eines Kreises. Extremwerte, die um mehr als drei Boxlängen außerhalb liegen werden mit einem Stern gekennzeichnet. Zur Ermittlung von Signifikanzen sind aufgrund des geringen Stoffmengenumfangs nichtparametrische Tests insbesondere der Signifikanztest nach Mann-Whitney-U-Test (für

zwei unabhängige Stichproben) zur Anwendung gekommen. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p \leq 0,05$  festgelegt. Tab. 14 zeigt dabei die unterschiedlichen Signifikanzniveaus.

<b>P</b>	<b>Signifikanz</b>	<b>Kennzeichnung</b>
$\leq 0,05$	signifikant	*
$\leq 0,005$	sehr signifikant	**
$p \leq 0,001$	hoch signifikant	***

Tab. 14: Signifikanzniveaus in der statistischen Auswertung

Zur weiteren statistischen Analyse sind zwischen den untersuchten Parametern bivariate Korrelationen angewendet und der Korrelationskoeffizient nach Pearson bestimmt worden. Der Durchführung der bivariaten Korrelationen der einzelnen Parameter ist zunächst die Darstellung der zugehörigen Werte im Streudiagramm vorangestellt worden. Im Streudiagramm konnte durch Ermittlung einer linearen Projektionslinie der Determinationskoeffizient  $r^2$  bestimmt werden. Dieser bildet den Anteil der gemeinsamen Varianz der untersuchten Größen ab. Die Interpretation des Korrelationskoeffizienten  $r$  erfolgt nach folgendem Schema:

$< 0,2$	sehr geringe Korrelation
$0,2 < r < 0,5$	geringe Korrelation
$0,5 < r < 0,7$	mittlere Korrelation
$0,7 < r < 0,9$	hohe Korrelation
$0,9 < r < 1$	sehr hohe Korrelation

Tab. 15: Auswertung des Korrelationskoeffizienten  $r$  für Korrelationsanalysen nach Pearson entsprechend der Interpretation nach Bühl & Zöfel, 1995.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Expression von GPx4-Pseudogenen in Wildtyp- und heterozygoten Knockout-Mäusen

Pseudogene gelten als nicht funktionelle Gene, die im Zuge der Evolution Mutationen akquirieren. Die gehäuften Mutationen führen vor allem zu einem Austausch von Aminosäuren, die zu einer fehlerhaften Translation führen (Vanin, 1985). Für das Enzym GPx4 ist jedoch ein funktionelles Pseudogen im murinen Wildtyp beschrieben, das als intronloses Retrotransposon charakterisiert wurde (Boschan et al., 2002). Das GPx4-Pseudogen zeigt eine hohe Sequenzhomologie zur mRNA des GPx4-Gens; es finden sich im Vergleich zwei stille Mutationen in der kodierenden Sequenz des Pseudogens. Auf Protein-Ebene kann das Genprodukt aufgrund der einheitlichen Primärstruktur des entstandenen Proteins nicht mehr dem Gen oder dem Pseudogen zugeordnet werden.

Die biologische Funktion des Enzyms GPx4 ist bereits in Knockout-Modellen untersucht worden. Dabei zeigte sich im homozygoten GPx4-Knockout, dass das Ausschalten beider Allele der GPx4 mit einer frühen Letalität des Embryos in utero einhergeht und die homozygot GPx4-defiziente Maus nicht lebensfähig ist (Yant et al., 2003).

Beim heterozygoten GPx4-Knockout waren phänotypisch keine Unterschiede bezüglich Entwicklung und Wachstum zu beobachten (Yant et al., 2003). Auf molekularbiologischer Ebene konnte eine Reduktion der mRNA-Level der GPx4 in murinen Organen (Imai et al., 2003), sowie eine prozentuale Abnahme der Enzymaktivität nachgewiesen werden (Scimeca et al., 2005).

In den nachstehenden Untersuchungen lag der Schwerpunkt in der vergleichenden Betrachtung der GPx4-Expression in Wildtyp- und Knockout-Maus. Ziel der Analysen war es, durch Untersuchungen am GPx4-Knockout-Modell mögliche regulative Prozesse hinsichtlich der Expression des Pseudogens herauszufinden. Aufgrund der frühen Letalität von homozygot defizienten GPx4-Mäusen wurde der heterozygote Knockout als Modell für die Untersuchungen gewählt.

#### 3.1.1 Genotypisierung des heterozygoten Knockout

Zur Interpretation späterer Ergebnisse aus Untersuchungen der Gewebe des Wildtyps und des heterozygoten Knockouts, war zunächst sicherzustellen, dass es sich bei den zur

Untersuchung eingesetzten Gewebeproben tatsächlich um Organe eines heterozygoten GPx4-Knockouts der Maus handelt.

Dazu wurde eine PCR-Strategie zur Genotypisierung angewendet, die es ermöglichte Wildtyp von heterozygotem Knockout zu unterscheiden. Dabei wurden die Bindungsorte der Primer so gewählt, dass sich anhand der verschiedenen Syntheseprodukte eine Zuordnung des untersuchten Gewebes vornehmen ließ.

Dabei wurden die Primer wie folgt in den einzelnen Reaktionen eingesetzt:

PCR	Up-Primer	Down-Primer	Fragmentgröße	Bindungsort
1.	WT	W 2	350 bp	Wildtyp-Allel
2.	MT	W 2	800 bp	Knockout-Allel

Tab. 16: PCR-Ansätze zur Unterscheidung von heterozygotem Knockout und Wildtyp.

Als Template zur PCR wurden je 100ng genomische DNA aus Lebergewebe des Wildtyps und der zwei heterozygoten Knockout-Tiere eingesetzt.

Der W 2-Primer bindet konstant am Wildtyp- und am Knockout-Allel als Down-Primer, während der WT-Primer nur am Wildtyp-Allel bindet. Bei der cDNA des Wildtyps kann die Bindung an beiden Allelen erfolgen und es wird ein PCR-Produkt mit einer Größe von 350 bp erwartet.

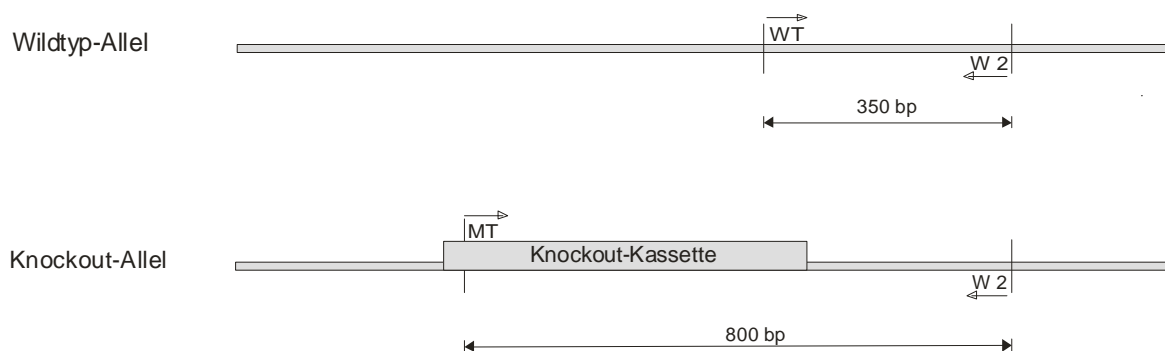


Abb. 8: Darstellung der Primerbindung am Wildtyp- und am mutierten Allel. Das Design der Primer dient zur Unterscheidung zwischen Wildtyp und heterozygotem Knockout.

Bei der cDNA des heterozygoten Knockouts bindet der WT-Primer am bestehenden originären Wildtyp-Allel, während der Bindungsort am mutierten Allel durch das Einfügen einer Knockout-Kassette ausgelöscht wurde. Nachdem das cDNA-Fragment des einen Wildtyp-Allels amplifiziert wurde, war ebenso ein Syntheseprodukt von 350 bp aus der ersten PCR nachweisbar.

Die zweite PCR erfolgte in Kombination mit dem MT-Primer, der ausschließlich im Bereich der integrierten Knockoutkassette des Knockout-Allels bindet. Das erwartete PCR-Produkt lag bei einer Fragmentgröße von 800bp. Aufgrund der fehlenden Möglichkeit zur Bindung des MT-Primers an den Allelen des Wildtyps konnte kein Syntheseprodukt aus der PCR entstehen. Beim heterozygoten Knockout konnte ein synthetisiertes Fragment von 800bp Größe aufgrund des mutierten Allels nachgewiesen werden. Anhand der selektiven Bindung des MT-Primers und der entstandenen PCR-Produkte ließ sich abschließend eine Unterscheidung bezüglich Gewebe des Wildtyp und des heterozygoten Knockouts vornehmen.

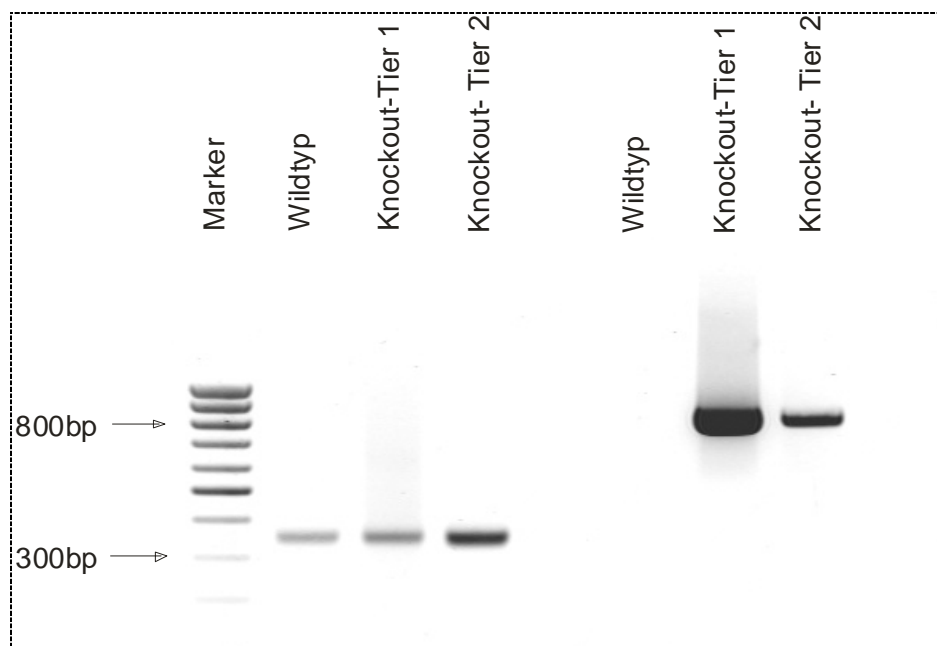


Abb. 9: Produkte aus der PCR zur Genotypisierung von Wildtyp und heterozygotem Knockout. Die Syntheseprodukte aus der ersten PCR mit Bindungen der Primer am Wildtypallel zeigen eine Fragmentgröße von 350bp. Aufgrund der Heterozygotie des Knockout kann eine Bindung der Primer am Wildtyp-Allel und die Synthese eines Produktes erfolgen. Das größere Fragment bei 800bp kann nur aufgrund eines artifiziell erstellten Bindungsortes in der integrierten Knockoutkassette synthetisiert werden.

### *RNA-Qualität*

Im Anschluss an die RNA-Präparation aus murinen Geweben sind verschiedene Aspekte zur Qualität der RNA überprüft worden.

Zunächst erfolgte die Bestimmung der RNA-Konzentration durch die Messung der UV-Absorption des Eluates bei verschiedenen Wellenlängen. Über die Bildung des Quotienten  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  ließ sich eine Aussage über die Qualität der RNA-Präparation treffen. Ein Quotient  $> 1,5$  spricht für eine suffiziente Aufreinigung der Präparate. Dieses Kriterium ist in den Analysen berücksichtigt und erfüllt worden.

Unter Verwendung von 66 ng der präparierten RNA schloss sich die PCR zur Detektion eventueller Verunreinigungen mit genomischer DNA an. Dabei wurde als Template präparierte RNA dem PCR-Ansatz zugesetzt. Es war zu erwarten, dass die einsträngige RNA nicht amplifiziert wird, sodass in der späteren Darstellung im Agarosegel kein Signal nachweisbar ist. Bei Verunreinigungen des RNA-Eluates mit DNA kann diese aufgrund der Doppelsträngigkeit während der PCR amplifiziert werden und das Syntheseprodukt wäre in der Gelelektrophorese signalgebend. Die Kontroll-PCR ist an jeder Gewebeprobe durchgeführt worden. Dabei konnte für alle präparierten Proben der Nachweis erbracht werden, dass keine Verunreinigungen vorlagen (Daten nicht gezeigt).

Für die nachfolgende Untersuchung ist zunächst die Umschreibung der isolierten mRNA in cDNA notwendig. Um eine Aussage über die erfolgreiche Umschreibung von präparierter mRNA in cDNA treffen zu können, wurde als Standard die PCR eines 420bp langen Fragmentes des GAPDH-Gens durchgeführt. Dabei wurden 66ng (entsprechend 1µl) des Ansatzes aus der RT-Reaktion mit den erwähnten Primern zur PCR eingesetzt. Die Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase kommt physiologisch als ein Enzym der Glykolyse vor. Zudem gilt die GAPDH als „Housekeeping-Enzym“, d.h. das Enzym wird in den meisten Zellen konstitutiv exprimiert und unterliegt keiner Regulation. Die Durchführung dieser PCR gilt als Standard zur Beurteilung der Qualität der aus mRNA synthetisierten cDNA. Die PCR-Produkte zeigten in der Gelelektrophorese für jede Probe ein positives Signal und im Vergleich auch eine ähnliche Signalintensität, so dass eine suffiziente Umschreibung der präparierten RNA in cDNA angenommen werden kann.

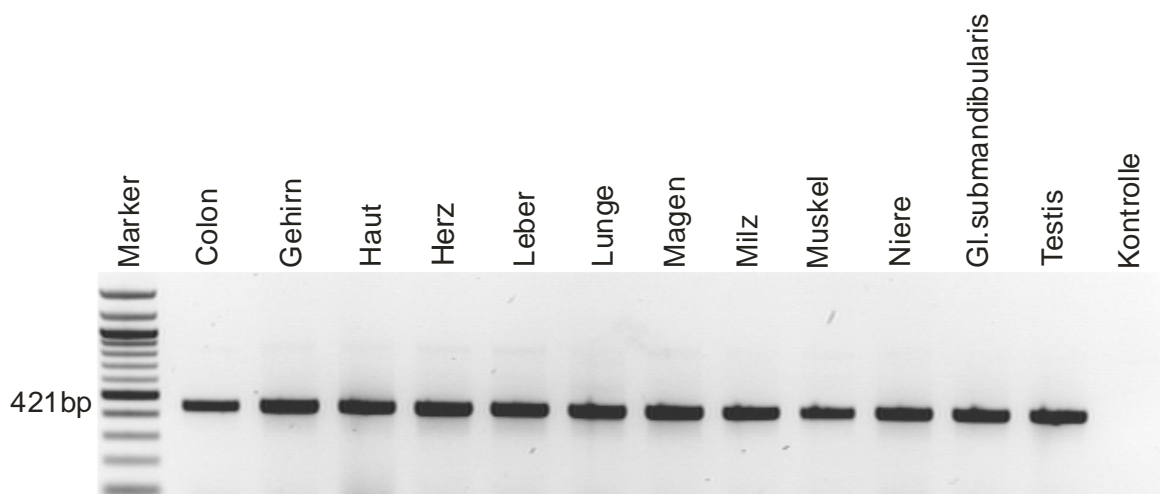


Abb. 10: Darstellung der Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase in murinen Geweben. Die GAPDH-PCR an der aus mRNA synthetisierten cDNA dient als Voruntersuchung für weitere Analysen zur Expression. Es läßt sich in allen Proben der präparierten Gewebe ein Signal detektieren, so dass die Synthese von cDNA aus mRNA als erfolgreich einzuschätzen ist.

### 3.1.2 Restriktionsstrategie

Zunächst erfolgte die Synthese eines 143bp langen PCR-Fragmentes, das die Region von 5bp-148bp repräsentiert. Als Template für den PCR-Ansatz dienten die synthetisierten cDNAs. Im Anschluss erfolgte eine Spaltung mittels des Restriktionsenzym MAE II (HPYCH IV). Die Spaltstrategie basiert auf einer stummen Punktmutation des Pseudogens. Innerhalb des synthetisierten 143bp langen Fragmentes besteht ein Spaltort des Restriktionsenzym MAE II bei 117 bp. An dieser Stelle findet sich in der Sequenz des Pseudogens eine stille Punktmutation, die zur Auslöschung der Erkennungsregion des MAE II-Enzyms führt. Nach dem Restriktionsverdau erwarteten wir für die GPx4-cDNA Spaltfragmente der Größe 117bp und 26 bp und für das Pseudogen 1 bei fehlendem Spaltort ein bestehendes 143bp langes Fragment.

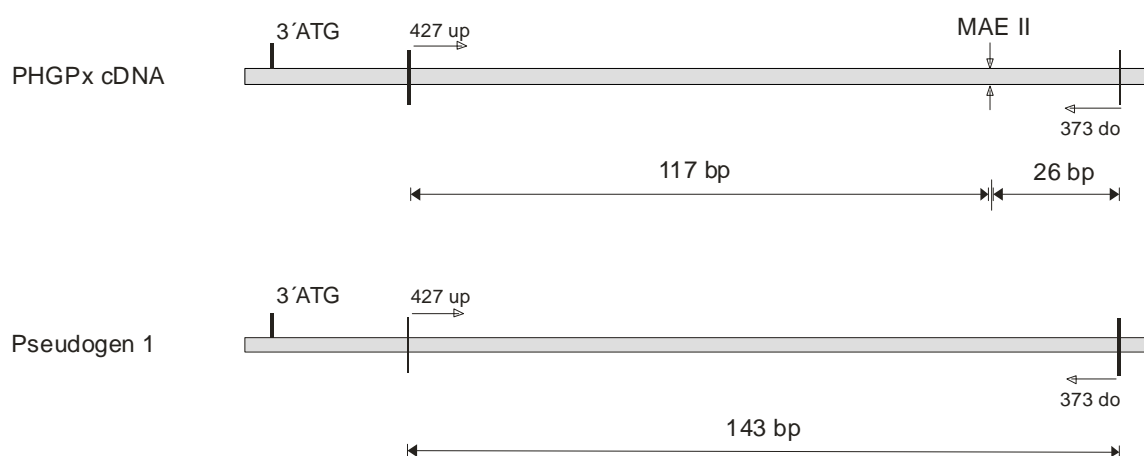


Abb. 11: Darstellung des 143bp langen PCR-Fragmentes mit Angabe des Restriktionsschnittstelle für das Spaltenzym MAE II. Die Spaltung der GPx4 cDNA erfolgt in zwei Spaltfragmente der Größe 26bp und 117bp. Die Punktmutation des Pseudogens an selbiger Stelle führt zur Deletion des Spaltortes. Nach Inkubation mit dem Spaltenzym liegt das Pseudogen-Fragment weiterhin unverändert vor. Nach Ablauf der Spaltung mit dem Restriktionsenzym erfolgt die Darstellung der Spaltprodukte im 4% igen Agarosegel.

Zunächst erfolgte die Synthese eines 143bp langen Fragmentes mittels PCR, das im Verlauf zum Restriktionsverdau eingesetzt werden sollte. Die Bindungsorte der Primer lagen in der Region von 5bp-148bp. Nach Abschluss der Synthese wurden die PCR-Ansätze im 1,5%igen Agarosegel zur Darstellung und Ausschneiden des synthetisierten Fragmentes aus dem Agarosegel aufgetragen. Die ausgeschnittenen Gelfragmente wurden einer Reinigung und Aufarbeitung mit Hilfe des Gelextraktions-Kits von Qiagen unterzogen. Die Prozedur diente hauptsächlich zur Entfernung von Primerdimeren. Die nachstehende Abbildung zeigt die Bande des 143bp langen Fragmentes im Agarosegel. Mittels halbquantitativer Mengenbestimmung konnte die Konzentration an Transkripten im Eluat ermittelt werden. Ziel war es, möglichst gleiche Mengen für den Restriktionsverdau,

sowie eine ausreichende Menge an Restriktionsenzym für eine vollständige Spaltung einsetzen zu können.

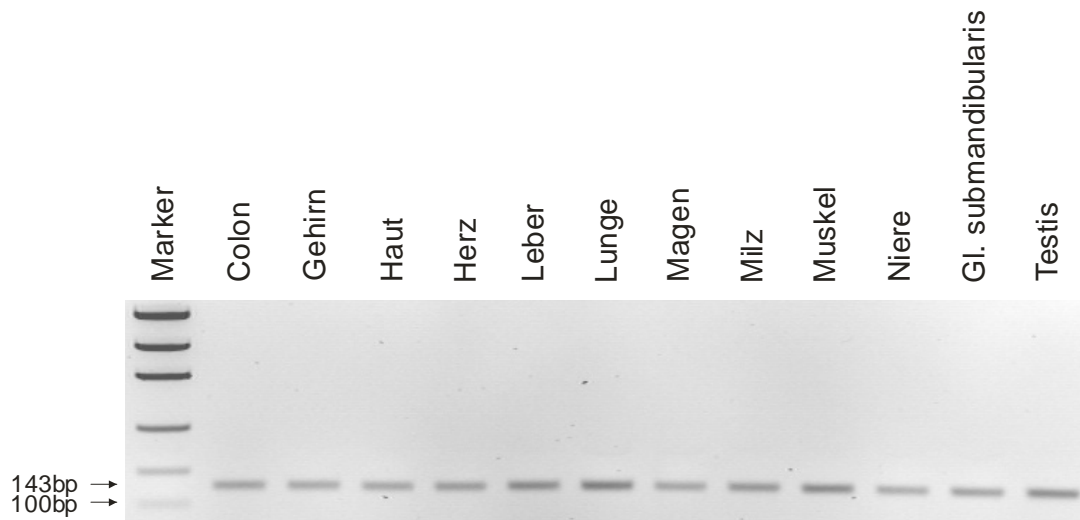


Abb. 12: Darstellung des 143bp langen synthetisierten Fragmentes für jedes untersuchte Organ der Maus. Als Template fungierte cDNA der einzelnen murinen Organe. Die Auftragung im Agarosegel erfolgt zur halbquantitativen Bestimmung der Konzentration an cDNA für den Ansatz der Spaltung.

### *Strategieoptimierung*

Vor der eigentlichen Spaltung der aus cDNA synthetisierten PCR-Fragmente der murinen Gewebe ist eine Probespaltung zur Überprüfung der optimalen Bedingungen für die Spaltung und der Funktionsfähigkeit des Restriktionsenzym MAE II durchgeführt worden. Zur Auswertung der Spaltung musste zunächst ein vollständiger Verdau der eingesetzten Probenmenge gewährleistet werden. Hierfür wurde zunächst das PCR-Fragment ausgehend von der GPx4-cDNA, bzw. PSE 1-cDNA synthetisiert und gereinigt. Anschließend wurden je 240ng der PCR-Produkte für eine Probespaltung eingesetzt. Nach Abschluss der Inkubation erfolgte die Darstellung im 4%igen Agarosegel um eine möglichst differenzierte Auftrennung der Spaltfragmente zu erreichen, da sich diese mit den erwarteten 143 bp für den heterozygoten Knockout und 117bp für den Wildtyp nur in 26bp unterschieden. Damit ein Größenunterschied der Fragmente bei so geringer Differenz der Größe festgestellt werden konnte, war die Analyse in einem höherprozentigen Agarosegel wichtig.

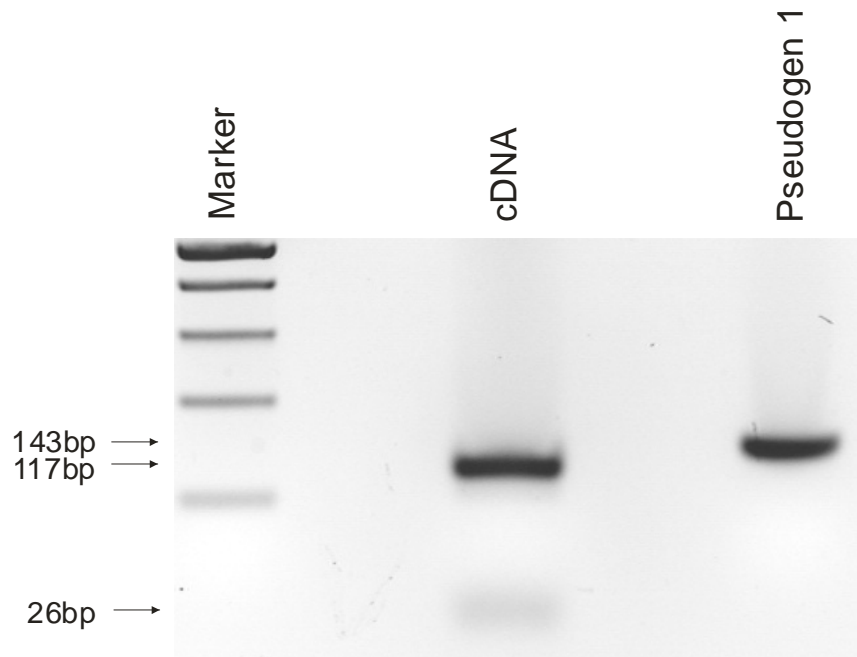


Abb. 13: Darstellung der Spaltprodukte nach Inkubation mit MAE II. Die Spaltfragmente der GPx4 cDNA liegen wie erwartet bei 26bp und 117bp, während das Pseudogen 1 aufgrund fehlenden Spaltortes keine Spaltung erfährt und weiterhin als 143bp langes PCR-Produkt vorliegt.

### *Spaltmuster von Wildtyp und heterozygotem Knockout*

Nach erfolgreicher Durchführung der Probespaltung erfolgte nun der Restriktionsverdau der aus cDNA amplifizierten PCR-Fragmente der murinen Organe des Wildtyps und des heterozygoten Knockout-Tieres. Zur Spaltung wurden 240ng des synthetisierten Fragmentes eingesetzt. Als Referenzen sind die GPx4-cDNA und das Pseudogen 1 in gleicher Konzentration im gleichen Ansatz der Spaltung unterzogen worden. Um später die Spaltmuster der Proben zu beurteilen, musste gewährleistet sein, dass ein vollständiger Verdau durch das Restriktionsenzym stattgefunden hatte.

Anhand der Größenreduktion der cDNA im Vergleich zur unveränderten Größe des Pseudogens 1 konnte die Vollständigkeit der Spaltung überprüft werden. Dadurch ließ sich sicherstellen, dass Signale auf Höhe der 143bp Bande bei den Geweben nicht in einem unvollständigen Verdau durch das Restriktionsenzym während der Spaltung begründet liegen.

In der Darstellung der Spaltmuster war ein deutliches Signal bei allen untersuchten Geweben auf Höhe der 117bp Bande nachweisbar. Im Vergleich fand sich auf Höhe der 143bp Bande bei fast allen Organen ein Signal von deutlich schwächerer Intensität.

Es war anzunehmen, dass die Expression der 143bp Bande durch das Pseudogen 1 bedingt war, während der überwiegende Anteil der cDNA durch das GPx4-Gen gestellt wurde, ersichtlich an der wesentlich intensiveren Bande. Die einzige Ausnahme bildete die Probe der Milz, die das deutlichste Signal aller Proben auf Höhe der 143bp Bande zeigte. Dennoch zeigte auch diese Probe eine mehrheitliche Expression durch das GPx4-Gen mit einem stärkeren Signal auf Höhe der 117bp Bande.

### Spaltung des Wildtyps

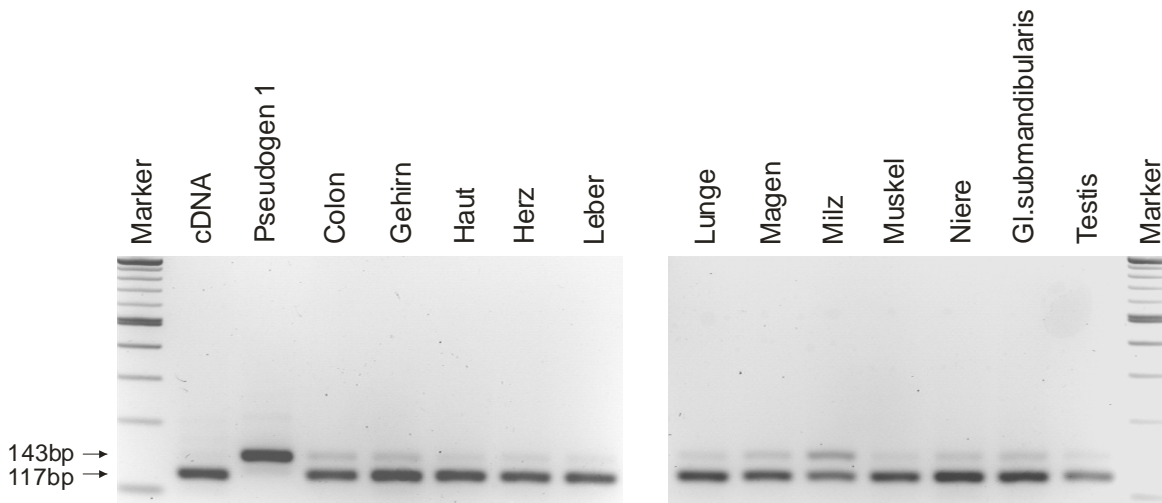


Abb. 14: Darstellung der Spaltfragmente nach Inkubation mit dem Restriktionsenzym MAE II bei Geweben des Kontrolltieres/ Wildtyp. Zur Kontrolle, dass die Spaltung erfolgreich war, wird das synthetisierte Fragment aus GPx4 cDNA ebenfalls dem Restriktionsverdau unterzogen. Die erfolgreiche und komplette Abspaltung des 26bp Fragmentes wird durch den Größenunterschied in der horizontalen Auftragung zum Pseudogen 1 unmittelbar daneben evident. Die Auftragung der Proben erfolgt im 4%igen Agarosegel um auch geringe Größenunterschiede der Spaltfragmente darstellen zu können.

Vergleichend dazu erfolgte die Spaltung von synthetisierter cDNA aus Geweben des heterozygoten Knockouts. Die Spaltung erfolgte unter gleichen Bedingungen wie die zuvor durchgeführte Spaltung bei Proben des Wildtyps.

Hintergrund der Untersuchung waren mögliche Veränderungen der Expression des GPx4-Gens und des Pseudogens 1 bei heterozygoten Knockout-Tieren. Das Spaltmuster zeigte eine deutliche Bande bei 117bp, die durch die Expression des GPx4-Gens generiert wurde. Auf Höhe der 143bp Bande konnte nur ein sehr diskretes Signal bei den Spaltmustern der murinen Organe festgestellt werden. Gänzlich fehlte in der Übersicht der Spaltung des heterozygoten Knockouts gegenüber dem Wildtyp ein Spaltmuster zur GI. submandibularis. Dieses Gewebe wurde beim heterozygoten Knockout-Tier nicht mit in die Untersuchung aufgenommen, so dass bei der Organpräparation auf die Entnahme der GI. submandibularis verzichtet wurde.



### Spaltung des heterozygoten Knockout

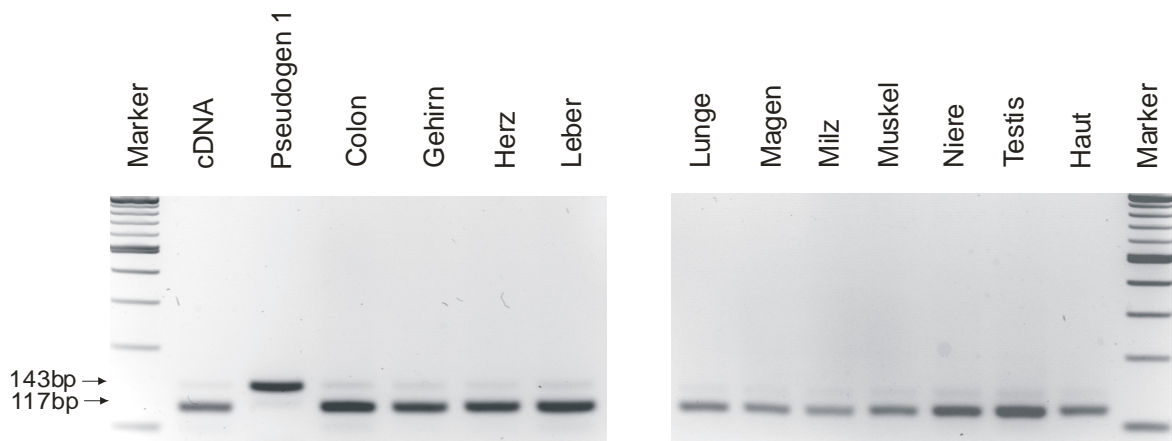


Abb. 15: Darstellung der Spaltfragmente nach Inkubation mit dem Restriktionsenzym MAE II bei Geweben des heterozygoten Knockout-Tiers. Als Referenzproben wurden cDNA und Pseudogen 1 ebenfalls der Spaltung unterzogen. Zur Analyse der Proben wird ein 4%iges Gel gewählt um eine möglichst differenzierte Trennung der Spaltfragmente zu ermöglichen. In dem Organscreen ist kein Spaltprodukt der Gl. submandibularis aufgeführt aufgrund von fehlendem Gewebe.

#### **Zusammenfassung:**

Die durchgeführten Experimente belegen, dass der heterozygote GPx-Knockout keine regulativen Einflüsse auf die Expression des Pseudogen 1 ausübt. Eine kompensatorische Erhöhung der Genexpression bei Ausfall eines GPx4-Gens erfolgt nicht.

### 3.2 Zellphysiologische Rolle der GPx4

Die GPx4 gehört zu der Familie der Selenoglutathionperoxidase, denen als Eigenschaft gemein ist, intrazelluläre Hydroperoxide zu reduzieren. Eine charakteristische Besonderheit der GPx4 ist die Fähigkeit zur Reduktion von membrangebundenen, komplexen Hydroperoxiden, u.a. von Lipoproteinen und Cholesterolestern. Generell können durch die Überexpression oder Inaktivierung von Enzymen wesentliche Aussagen über die biologische Rolle gemacht werden. In verschiedenen Untersuchungen konnte z.B. eine erhöhte Resistenz der mitochondrialen Form der GPx4 (mGPX4) überexprimierenden Zellen gegenüber verschiedenen Formen von oxidativem Stress beobachtet werden (Kriska et al., 2002). Ziel der nachstehenden Untersuchungen war es, die Auswirkungen einer Überexpression des GPx4-Proteins auf das Transkriptom zu untersuchen, um Zusammenhänge und Bedeutung der GPx4 in der Zelle darzustellen. Aufgrund dessen ist für die weiteren Untersuchungen eine humane Brustkrebszelllinie als Zellmodell gewählt

worden, die die mitochondriale GPx4 in einer stabilen Transfektante überexprimiert (siehe Material und Methoden-Teil).

### *Nachweis der Überexpression der mGPx4 auf mRNA-Ebene*

In die Untersuchung wurden sowohl der Wildtyp und die Vektorkontrolle der Zelllinie, als auch die stabile Transfektante mit der Bezeichnung 7G4 einbezogen. Ein Kennzeichen der Transfektante ist die Überexpression der mitochondrialen Form der GPx4. Nach Gewinnung der Gesamt-RNA aus der epithelialen Zelllinie und anschließender Reverser Transkription der mRNA folgte die Amplifikation mit Primern für die GAPDH, sowie für die GPx4 in der Real-Time-PCR. Die absoluten Kopienzahlen der mGPx4 sowie der GAPDH sind zueinander ins Verhältnis gesetzt und nachstehend abgebildet worden. Ergänzend ist die Darstellung der PCR-Produkte im Agarosegel (2%) abgebildet, so dass korrelierend zu den relativen Kopienzahlen im Säulendiagramm ein Unterschied in der Signalintensität in der Gelelektrophorese aufgezeigt wurde.

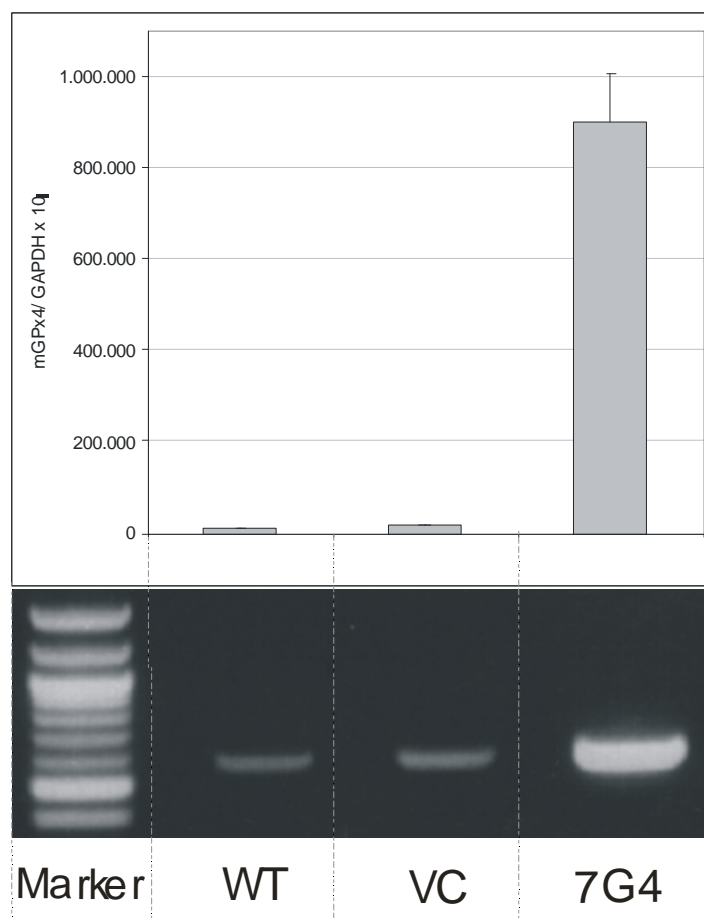


Abb. 16: Expression der mitochondrialen Form der GPx4 in der epithelialen BrustkrebsZelllinie COH-BR1 in den Untergruppen Wildtyp (WT), Vektorkontrolle (VC), und der stabilen Transfektante (7G4). Die ermittelten Kopienzahlen sind zu den Kopien der GAPDH für jeden Wert in Relation gesetzt worden. Dabei zeigt die stabile Transfektante eine 67fach höhere Expression der mGPx4 gegenüber der Vektorkontrolle.

Für die stabile GPx4-Transfektante konnte ein Verhältnis von 897.257 Kopien mGPx4 mRNA/ GAPDH mRNA  $\times 10^6$  bestimmt werden. Hinsichtlich des Expressionsniveaus der mGPx4 in der Vektorkontrolle (13 363 Kopien GPx4 mRNA / GAPDH mRNA  $\times 10^6$ ) konnte die unterschiedliche Expressionshöhe mit einem Quotienten von 67 errechnet werden. Damit wurde die mGPx4 mRNA in der GPx4-Transfektante ca. 70fach höher exprimiert als in der entsprechenden Kontrollzelle.

### *Nachweis der Überexpression der mGPx4 auf Proteinebene*

In den bisherigen Untersuchungen konnte die Überexpression der mitochondrialen Form der GPx4 auf mRNA-Ebene gezeigt werden. Zur Untersuchung des Expressionslevel auf Protein-Ebene wurde die Methode des Western-Blot angewendet. Die Zelllysate sind aus Zellen der Vektorkontrolle (VC), sowie der stabilen Transfektante (7G4) der epithelialen Brustkrebs- Zelllinie präpariert worden. Ein Aufschluss der Lysate wurde bis zur Trennung in die einzelnen Kompartimente Nucleus, Mitochondrien und Zytosol vollzogen um in der Auswertung entsprechende Zuordnungen zu einem Zellkompartiment treffen zu können.

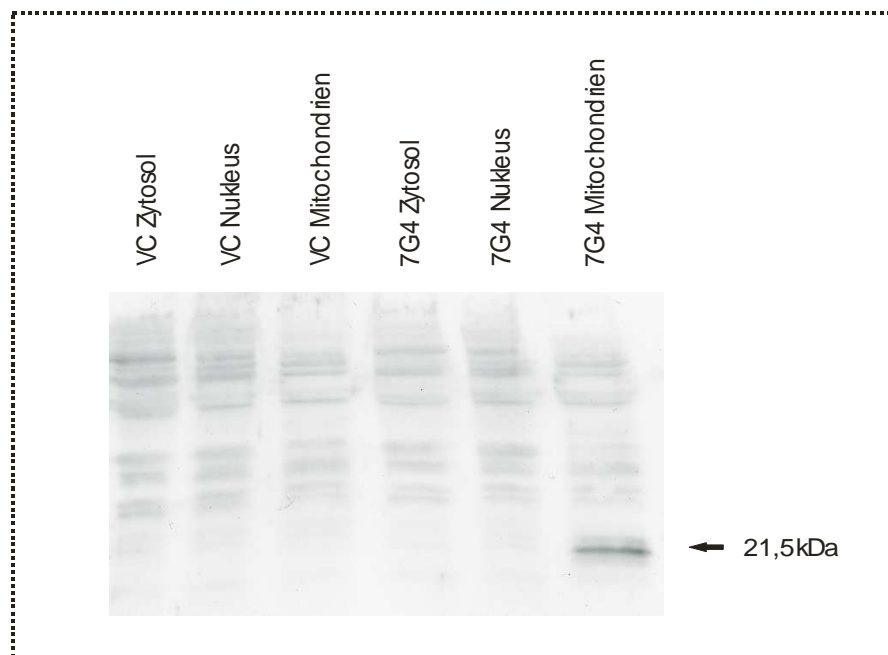


Abb. 17: Darstellung im Western Blot. Der Antikörper detektiert in den Extrakten des Zellkompartimentes Mitochondrien der epithelialen BrustkrebsZelllinie ein passendes Protein. Anhand eines Markers konnte eine Grösse von ca. 20 kDa bestimmt werden; diese entspricht dem erwarteten Signal von 21,5kDa für die mGPx4.

Im Ergebnis zeigte sich eine einzelne Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 20kDa im Lysat der präparierten Mitochondrien der 7G4-Zellen. Das Molekulargewicht entspricht dem erwarteten der mitochondrialen GPx4.

### Nachweis der Überexpression der GPx4 auf Aktivitätsebene

Um die zellprotektiven Eigenschaften der GPx4 zu charakterisieren, schlossen sich weitere Untersuchungen zur biologischen Funktion des Enzyms an. Als Ausgangspunkt dient die kennzeichnende Eigenschaft des Enzyms intrazelluläre zellschädliche Peroxide reduzieren zu können. Dabei konnte unter Anwendung der Durchflusszytometrie der intrazelluläre Peroxidgehalt gemessen werden. Als Oxidationsreportermolekül kommt 2',7'-Dichlorfluorescein-diacetat (DCFH-DA) zum Einsatz. Diese Verbindung wird in die Zelle aufgenommen und intrazellulär zu DCFH deacetyliert. Durch intrazelluläre Peroxide erfolgt danach eine Oxidation des Dichlorfluorescein (DCFH) zu dem fluoreszierenden Dichlorofluorescein (DCF). Die emittierte Fluoreszenz verhält sich proportional zum Peroxidstatus der Zelle, so dass anhand der Intensität der Fluoreszenz Rückschlüsse auf die Aktivität der GPx4 gemacht werden können. In die Untersuchung wurden vergleichend die stabile mGPx4-Transfektante, sowie die Vektorkontrolle der epithelialen Brustkrebszelllinie COH-BR1 einbezogen. Nach Präparation der Zellen und Durchführung der FACS-Messung kamen die Daten nachstehend als Histogramm zur Abbildung.

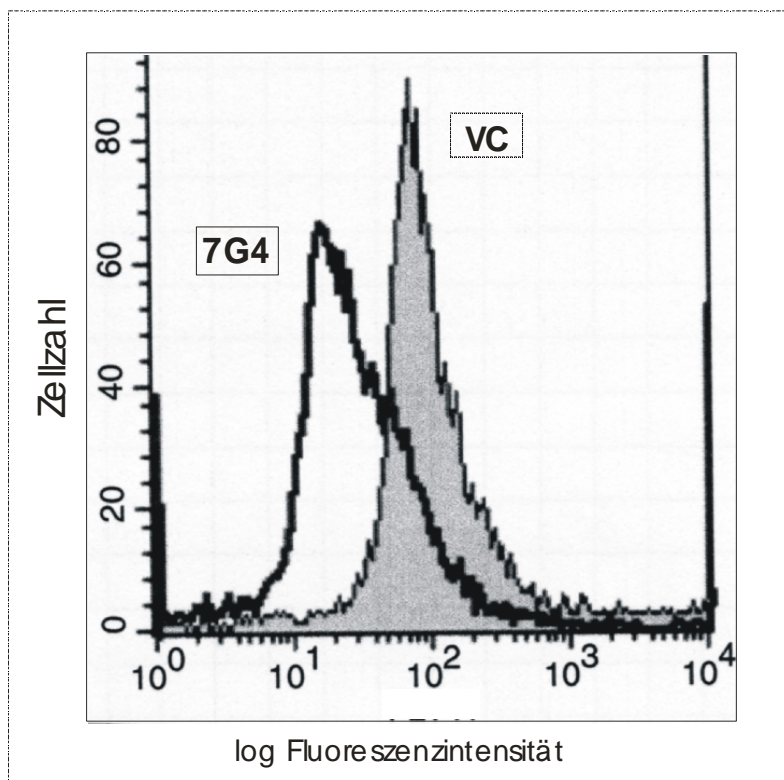


Abb. 18: Detektion der intrazellulären Peroxide mittels FACS-Analyse. Die Kontrollzellen (VC) und die mGPx4-überexprimierende Zelle (7G4) wurden mit DCFH-DA inkubiert und die resultierende Fluoreszenz-Intensität des gebildeten DCF gemessen. Die gemessene Fluoreszenzintensität wurde gegen die Zellzahl der Kontrollzellen (graue Fläche) und der Zellzahl der mGPx4-überexprimierenden Zellen (weiße Fläche) aufgetragen.

Die Untersuchung ergab eine höhere Fluoreszenzintensität für die Kontrollzellen im Vergleich zur mGPx4-Transfektante. Das bedeutet, dass der intrazelluläre Peroxidlevel in den mGPx4-überexprimierenden Zellen deutlich niedriger liegt als in den Kontrollzellen. In der quantitativen Auswertung der FACS-Analyse zeigte die mGPx4-Transfektante nur 36% des Peroxidgehaltes der Kontrollzelle. Damit liegt der intrazelluläre Peroxidlevel in der Kontrollzelle ca. 3fach höher als in der mGPx4-überexprimierenden Zelle.

#### **Zusammenfassung:**

Die Überexpression der mGPx4 konnte in Zellen der stabilen GPx4-Transfektante der epithelialen Brustkrebs- Zelllinie auf mRNA- und Proteinebene gezeigt werden. Auf mRNA-Ebene zeigte sich der GPx4-Messenger in der Transfektante um den Faktor 67 gegenüber den Kontrollzellen erhöht. Auf Proteinebene war die Überexpression der mGPx4 in Mitochondrien der stabilen Transfektante nachweisbar und ein deutlich niedriger Peroxidstatus in den Zellen der Transfektante belegt die Funktionalität des Proteins.

#### 3.2.1 Microarray-Daten

Der Phänotyp einer Zelle wird wesentlich durch differentielle Expression des Genprofils bestimmt. Deshalb lassen sich aus der Quantifizierung der Genexpressionsmuster Rückschlüsse auf Phänotypenanlage der Zellen ziehen. Ziel der nachfolgenden Untersuchungen war es durch Quantifizierung des Genexpressionsmuster der stabilen mGPx4-Transfektante und der Kontrollzellen Schlussfolgerungen über Eigenschaften der Zellen zu ziehen.

Für die GPx4 wird neben den komplexen zellprotektiven Eigenschaften als antioxidierendes Enzyms, auch eine regulierende Funktion des Enzyms in der Tumorgenese und der Apoptose diskutiert (Nomura et al., 1999), (Nakagawa, 2004). So konnte in verschiedenen malignen Zelllinien eine verminderte Expression der GPx4 auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden (Liu et al., 2006). Zum Teil war ein proportionaler Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad des Malignoms und der Expressionslevel der GPx4 herzustellen (Cejas et al., 2007).

Besondere Aufmerksamkeit kommt signifikant regulierten Genen zu, von denen bekannt ist, dass sie eine Rolle in der Tumorgenese einnehmen. In die Untersuchungen gehen die

stabile Transfektante, der Wildtyp und die Vektorkontrolle der epithelialen Brustkrebszelllinie ein. In den Vergleich werden die ermittelten Expressionsniveaus der Transfektante und der Vektorkontrolle einbezogen.

In der Analyse des Microarray sind 14 500 Gene durch den verwendeten Chip erfasst worden. Unter den untersuchten Genen zeigen 96% keine regulatorische Veränderung durch die Überexpression der mitochondrialen GPx4. Innerhalb der Gruppe der regulierten Gene zeigen 2% (296 Gene) eine mindestens zweifache Hochregulation, während 2% (334 Gene) eine negative Regulation in ähnlicher Höhe erfahren. Den stärksten regulatorischen Effekt zeigt Lipophilin B mit einer 30fachen Hochregulation. Ein weiterer Vertreter aus derselben Familie, das Mammaglobin 1 zeigt ebenfalls eine positive Regulation mit einer fünffach erhöhten Transkriptionsrate.

Affimetrix-Nr.	NCBI-Nr.	Genbezeichnung	Faktor
<i>hochreguliert</i>			
206799_at	NM_006551.2	Lipophilin B	30,3
206315_at	NM_004750.1	Cytokine receptor-like factor 1 (CRLF1)	15,7
209792_s_at	BC002710.1	Kallikrein 10	7,4
217966_s_at	NM_022083.1	Niban protein (NIBAN)	6,3
205119_s_at	NM_002029.1	Formyl peptide receptor 1 (FPR1)	5,8
206002_at	NM_005756.1	G protein-coupled receptor 64 (GPR64)	5,6
204915_s_at	AB028641.1	mRNA for SOX11	5,3
206378_at	NM_002411.1	Mammaglobin 1 (MGB1)	5,1
200762_at	NM_001386.1	Dihydropyrimidinase-like 2 (DPYSL2)	4,1
204971_at	NM_005213.1	Cystatin A (stefin A) (CSTA)	4,0
<i>runterreguliert</i>			
200665_s_at	NM_003118.1	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin) (SPARC)	26,1
211573_x_at	M98478.1	Human transglutaminase	15,3
203875_at	NM_003069.1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1 (SMARCA1)	11,1
201163_s_at	NM_001553.1	Insulin-like growth factor binding protein 7 (IGFBP7)	11,0
206858_s_at	NM_004503.1	Homeo box C6 (HOXC6)	7,8
202833_s_at	NM_000295.1	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 1 (SERPINA1)	6,5
208129_x_at	NM_001754.1	Runt-related transcription factor 1 (RUNX1)	6,3
219508_at	NM_004751.1	Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3, mucin type (GCNT3)	6,2
204421_s_at	M27968.1	Human basic fibroblast growth factor (FGF)	5,9
211064_at	BC006408.1	Similar to zinc finger protein 254, clone MGC:10544	5,9
219832_s_at	NM_017410.1	Homeo box C13 (HOXC13)	5,5

Tab. 17: Auflistung der stärksten Regulationen anhand der Microarray-Daten

### 3.2.2 MG1 und LP-B Expression in der stabilen Transfektante

Bei Hinweisen aus den Microarray-Daten über positive regulative Einflüsse der GPx4-Expression auf andere Gene, wurden zwei Gene (Mammaglobin 1 und Lipophilin B), die einer Genfamilie angehören, weiteren Betrachtungen unterzogen. Beide Gene haben bisher

vermehrt Erwähnung in Zusammenhang mit Malignomkrankungen gefunden. Für das Mammaglobin 1 ist eine höhere Expression in Malignomen der Brust gegenüber Normalgewebe nachgewiesen worden. Mehrfach ist das Enzym auch als gewebespezifisch für das adulte Mammagewebe beschrieben worden. Aufgrund dessen steht das Protein Mammaglobin 1 ergänzend als neuer Tumormarker für die Erkrankung des Mammacarcinoms in der Diskussion (Watson et al., 1999; Watson und Fleming, 1996).

Das Lipophilin B ist ein weiteres Mitglied der Sekretoglobinfamilie, dessen physiologische Funktion noch unbekannt ist. Ebenfalls ist die höhere Expression von Lipophilin B in malignen Zelllinien und Malignomen beschrieben worden (Culleton et al., 2007).

Für die Microarray-Untersuchungen sind Zellen einer epithelialen Brustkrebszelllinie verwendet worden. Dieses Modell ist für die zwei ausgesuchten Vertreter der Sekretoglobine und die mitochondriale Form der GPx4 erneut angewandt worden. Nach Präparation von RNA aus Zellen des Wildtyps und der stabilen Transfektante (7G4) und anschließender Umschreibung in cDNA, wurden die Proben der Real-Time-PCR für weitere Betrachtungen zugeführt.

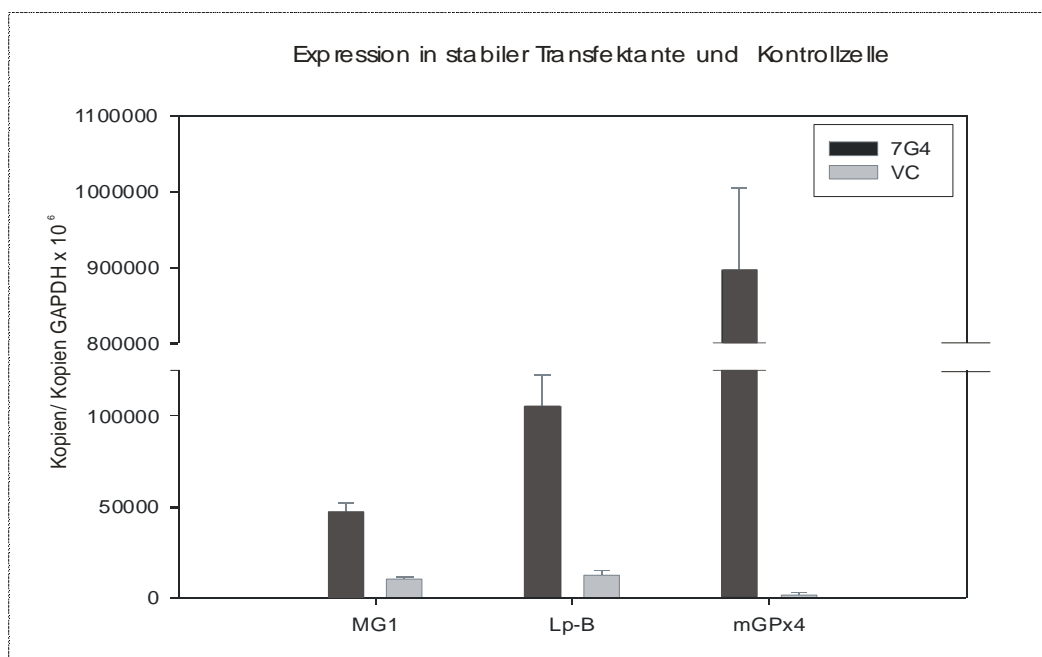


Abb. 19: Expression der mitochondrialen GPx4, Mammaglobin 1 und Lipophilin B im Wildtyp (hellgrau) und der 7G4-Zellen (dunkelgrau). Dabei bemerkenswert ist die unterbrochene Darstellung aufgrund der weiten Spanne an erhobenen Werten. Die absoluten Kopienzahlen sind in Relation zu den bestimmten GAPDH-Kopien aufgetragen.

Im Ergebnis ließ sich ein 150-fach höheres relatives Expressionsniveau der mitochondrialen Form der GPx4 in der Transfektante (897.257 Kopien mGPx4 mRNA/Kopien GAPDH mRNA  $\times 10^6$ ) gegenüber der Vektorkontrolle (5901 Kopien mGPx4 mRNA/Kopien GAPDH mRNA  $\times 10^6$ ) demonstrieren. In der Untersuchung der Marker Mammaglobin 1, sowie Lipophilin B ließ sich ein erhöhtes Expressionsniveau in der stabilen Transfektante nachweisen. Dabei war eine 5-fach höhere Expression für Mammaglobin 1 in der stabilen Transfektante (47.244 Kopien MG 1 mRNA/Kopien GAPDH mRNA  $\times 10^6$  vs. 10.231 Kopien MG1 mRNA/Kopien GAPDH mRNA  $\times 10^6$ ), sowie eine 9fache Erhöhung für Lipophilin B im Vergleich der stabilen Transfektante (105.123 Kopien Lp-B mRNA/Kopien GAPDH mRNA  $\times 10^6$ ) zur Vektorkontrolle (12.090 Kopien Lp-B mRNA/Kopien GAPDH mRNA  $\times 10^6$ ) zu dokumentieren.

### **3.3 Genexpression der Sekretoglobine im Ovarialcarcinom**

Nachdem eine Überexpression der mRNA von Mammaglobin 1 und Lipophilin B in einer epithelialen Brustkrebszelllinie gezeigt werden konnte, ist die Betrachtung des Expressionverhalten beider Parameter in einem weiteren gynäkologischen Carcinom angeschlossen worden. Bisher ist die Expression von Mammaglobin 1 als gewebespezifisch für das adulte Mammagewebe beschrieben worden. Bei Mammacarcinomen käme es dabei zu einer Überexpression von Mammaglobin 1. Insbesondere die beschriebene Gewebespezifität für Mammagewebe bringt Mammaglobin 1 immer wieder in die Diskussion als ein neuer Biomarker für das Mammacarcinom ein.

Zur Betrachtung kommen in nachstehenden Untersuchungen ovarielle Gewebeproben unterschiedlicher Dignität. In die Untersuchung werden die Parameter Mammaglobin 1, Lipophilin B und Mammaglobin 2 einbezogen.

#### **3.3.1 Quantifizierungsregime**

In nachstehender Abbildung ist die Expression der GAPDH für alle untersuchten ovariellen Gewebeproben aufgezeigt. Dabei ließ sich für jede Probe anhand einer Eichkurve eine absolute Kopienzahl bestimmen. Eine Auflistung der unten stehenden Kennzeichnungen der untersuchten Proben entsprechend der Histologie findet sich im Material- und Methoden-Teil.



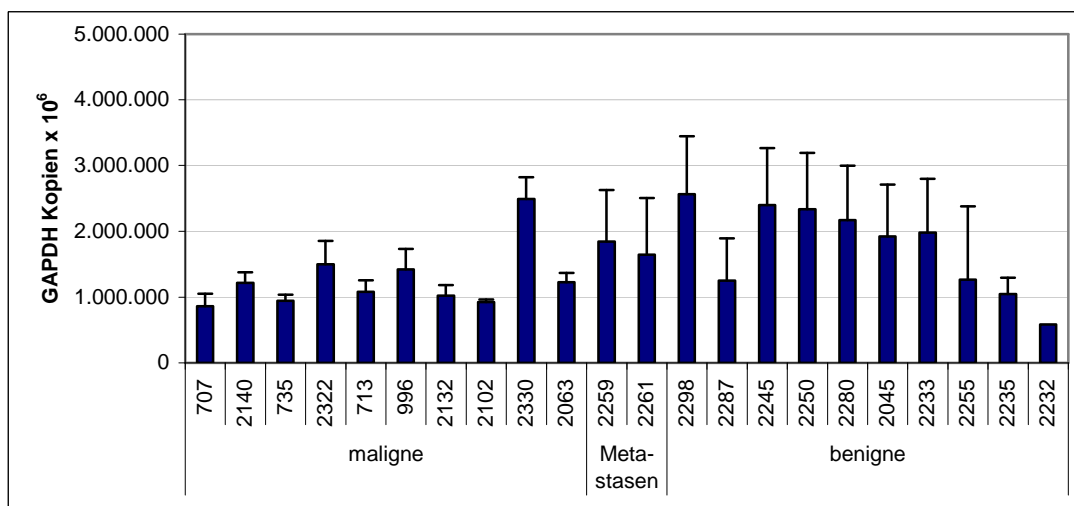


Abb. 20: Expression von Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase bei den in die Untersuchung einbezogenen ovariellen Gewebeproben. Dabei ist bemerkenswert, dass in allen Proben die Expression der GAPDH bestimmt werden konnte.

Die Untersuchung der Expression von ausgewählten Sekretoglobinen erfolgte auf mRNA-Ebene. Nach Erhalt der ovariellen Gewebeproben erfolgte nach RNA-Präparation die Umschreibung von 2µg mRNA in cDNA mittels RT-PCR.

Die Untersuchung erfolgte mittels Real-Time PCR mit je 1µl des Ansatzes der RT-PCR der jeweiligen Probe und den im Materialteil angegebenen entsprechenden Primern für die Parameter GAPDH, Mammaglobin 1, Mammaglobin 2 und Lipophilin B. Insgesamt wurden für jeden Parameter jeweils drei Real-Time PCR-Läufe durchgeführt, um eine statistische Aussage erheben zu können. Die Ermittlung von absoluten Kopienzahlen der untersuchten Parameter basierte auf der Erstellung von spezifischen Eichkurven. Diese Eichkurven wurden für jeden zu untersuchenden Parameter im Rahmen der Vorarbeiten zur Real-Time PCR erstellt. Die so ermittelte Anzahl an synthetisierten Kopien der einzelnen Proben wurde zu den probenspezifischen Kopienzahlen der GAPDH ins Verhältnis gesetzt. Durch die Bildung eines Verhältnisses von ermittelten Kopien der Sekretoglobine zu den Kopien der GAPDH für die entsprechenden Proben erfolgt eine Normierung und Ausgleich unterschiedlicher mRNA-Level der einzelnen Proben untereinander. Zudem sind mögliche Verfälschungen der Ergebnisse durch während der PCR entstandene Nebenprodukte unterschiedlicher Größe durch die Analyse der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese und der Schmelzkurven ausgeschlossen worden.

### 3.3.2 Mammaglobin 1

Die Expression der einzelnen untersuchten Parameter in verschiedenen Proben ovarieller Gewebe findet im Folgenden ihre Abbildung. Für den Parameter Mammaglobin 1 ergab sich ein differentes Expressionsmuster. In nachstehender Abbildung zeigte sich eine relativ geringe oder keine Expression für die Vertreter der Kategorie „benigne“. Diese zeigen eine Expressionshöhe  $<400.000$  Kopien MG1 mRNA/GAPDH mRNA  $\times 10^6$ . Für die Kategorie „maligne“ zeigten sich einzelne Proben in ähnlicher Expressionshöhe, jedoch waren auch einzelne Vertreter mit deutlich höheren Werten zu bestimmen. Für eine Probe (Nr.2102) ließ sich keine Expression von Mammaglobin 1 detektieren. Der Mittelwert lag für die Kategorie „maligne“ bei 491.591 Kopien MG 1 mRNA/GAPDH mRNA  $\times 10^6$ , während sich der Mittelwert für die Kategorie der Normalgewebe bei 76.591 Kopien MG 1 mRNA/ Kopien GAPDH mRNA  $\times 10^6$  einstellte. Somit ließ sich arithmetisch ein Quotient von 6,4 bestimmen.

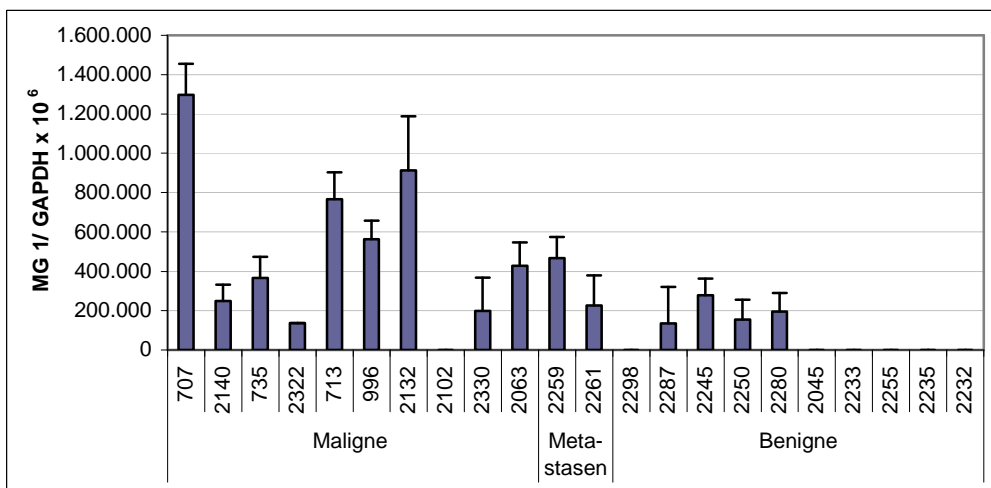


Abb. 21: Expression von Mammaglobin 1 in den untersuchten Proben der Ovarialgewebe. Die absoluten ermittelten Werte werden ins Verhältnis zu den entsprechenden GAPDH-Werten gesetzt. In der Abbildung der Ergebnisse zeigt sich ein inhomogenes Expressionsmuster für Mammaglobin 1.

In nachstehender Abbildung sind die Ergebnisse aus den Untersuchungen der ovariellen Gewebeproben für Mammaglobin 1 dargestellt, wobei die Proben entsprechend ihrer Dignität in Kategorien zusammengefasst wurden. Insgesamt wurden Werte von jeweils zehn Gewebeproben maligner Ovarialtumoren und Proben von ovariellem Normalgewebe in die Untersuchung eingebracht.

Die Darstellung im Boxplot wurde gewählt aus Gründen der Abbildung und Zusammenfassung der Werte in Gruppen. Dabei wurden die untersuchten Proben nach ihrer Dignität unterschieden und in drei Kategorien unterteilt, nämlich maligne, benigne

und Metastasen. Die Signifikanzen sind ausschließlich zwischen maligner und benigner Entität bestimmt worden.

Die Gruppe „Metastasen“ konnte aufgrund eines zu geringen Stoffgruppenumfanges mit  $n=2$  nicht berücksichtigt werden. Die Abbildung dieser Entität erfolgte aus Gründen der Vollständigkeit, jedoch ohne Berücksichtigung in der Datenanalyse und der Signifikanzprüfungen. In den Voruntersuchungen sind Häufigkeiten und Normalverteilung der erhobenen Daten berücksichtigt worden. Zur Untersuchung von Signifikanzen zwischen den Kategorien kam der Mann-Whithney-U-Test zur Anwendung. Bei Feststellung von Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau in der Abbildung mit einem  $p$  gekennzeichnet. Zudem ist der Median, Minimum und Maximum der einzelnen Gruppen in den Abbildungen ersichtlich.

Die Durchführung des Mann-Whithney-U-Tests ergab zwischen den zwei untersuchten Kategorien „maligne“ und „benigne“ einen sehr signifikanten Unterschied (\*\*) mit einer Signifikanz von  $p=0,003$ .

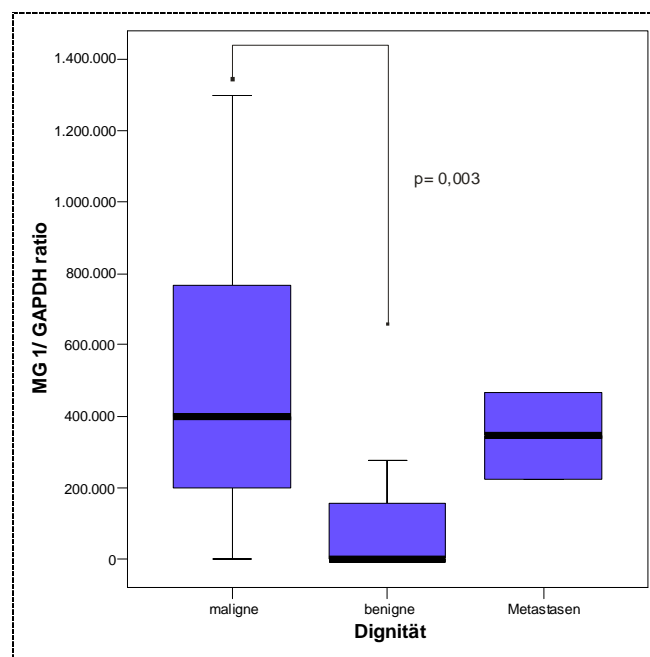


Abb. 22: Darstellung der Expressionslevel von Mammaglobin 1 im Verhältnis zur GAPDH (MG1 / GAPDH  $\times 10^6$ ). Die Einzelproben sind jeweils zusammengefasst zu einer Kategorie entsprechend ihrer Dignität.. Untersucht wurden 10 Gewebeprobe von malignen und 10 benignen Ovarialtumoren, sowie Material von 2 Metastasen, die als Primärtumor einen malignen Ovarialtumor besaßen.

### 3.3.3 Lipophilin B

In den Analysen der ovariellen Gewebe zeigt sich ein heterogenes Expressionsniveau für den Parameter Lipophilin B. Die Ergebnisse zu den Untersuchungen der ovariellen Normalgewebe zeigen ein relativ niedriges Expressionsniveau für Lipophilin B. Der Mittelwert liegt für diese Entität bei  $377.477$  Kopien Lp-B mRNA /GAPDH mRNA  $\times 10^6$ . Die Gruppe der Gewebe von maligner Dignität zeigt dabei deutlich höhere Werte in der Expression. Die Ausnahme dazu bildet eine einzelne Probe mit der Nr. 2102, die keine Expression von Lipophilin B erkennen lässt. Der Mittelwert liegt in dieser Kategorie bei  $1.202.578$  Kopien Lp-B mRNA/GAPDH mRNA  $\times 10^6$ . Rechnerisch ergibt sich ein Quotient von 3 im Vergleich der Mittelwerte beider Kategorien. Die zwei Proben an Metastasen zeigen ein Expressionsniveau ähnlich zu dem der carcinomatösen Gewebe.

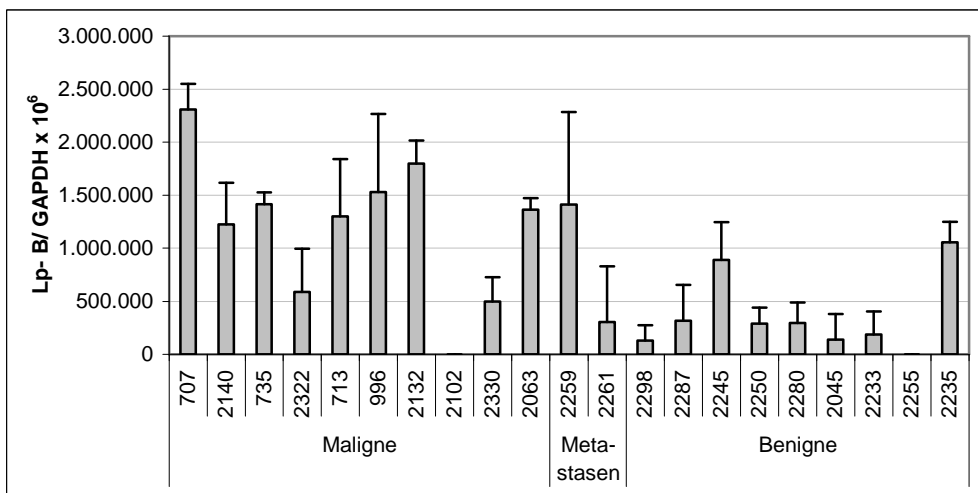


Abb. 23: Expression von Lipophilin B in den untersuchten Gewebeproben. Die absoluten Kopienzahlen wurden im Verhältnis zu den Kopienzahlen der GAPDH abgebildet. Die Abbildung zeigt ein heterogenes Expressionsmuster. In der Tendenz lässt sich eine erhöhte Expression in den Proben der Kategorie „maligne“ gegenüber der Kategorie „benigne“ postulieren. Bei zwei Proben (Nr. 2102 und 2255) ist dabei keine Expression des Lipophilin B feststellbar.

Basierend auf den ermittelten Expressionsleveln für den Parameter Lipophilin B zeigt die nachstehende Abbildung die Ergebnisdarstellung in Form eines Boxplots. In die Untersuchung sind jeweils zehn Proben maligner Ovarialtumoren und zehn Proben ovariellen Normalgewebes neben zwei Proben von metastatischem Gewebe eingegangen. Die Signifikanz des Unterschiedes von maligner und benigner Entität ist nach Durchführung des Mann-Whitney-U-Tests mit  $p = 0,005$  ermittelt worden und ist ebenfalls als sehr signifikant (\*\*) einzuordnen.

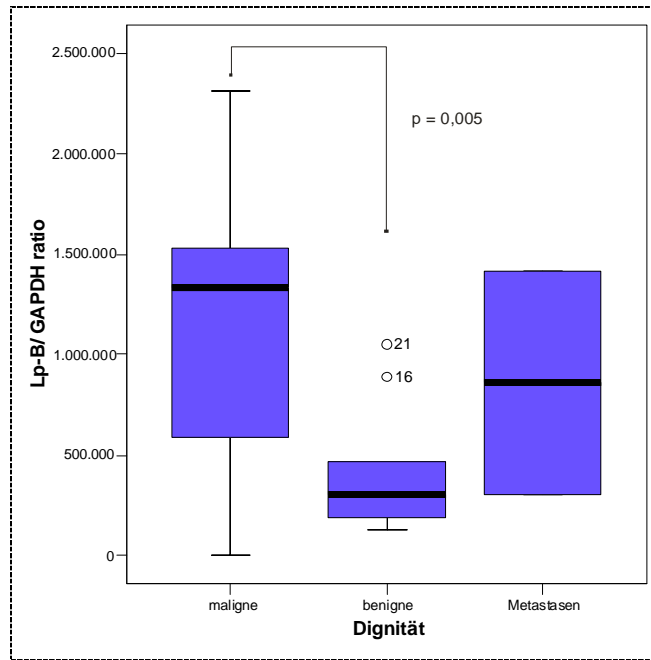


Abb. 24: Abbildung von Expression von Lipophilin B/GAPDH\* $10^6$ . Die einzelnen Proben sind in Gruppen entsprechend ihrer Dignität zusammengefasst. In die Untersuchung wurden 10 maligne Ovarialtumoren und 10 Proben benignen Ovarialgewebes einbezogen.

### 3.3.4 Mammaglobin 2

Die Untersuchungen des Parameters Mammaglobin 2 ergaben keine oder sehr geringe Expressionsniveaus für die Gruppe der Normalgewebe. Der Mittelwert dieser untersuchten Proben liegt bei 5.382 Kopien MG 2 mRNA/GAPDH mRNA x  $10^6$ .

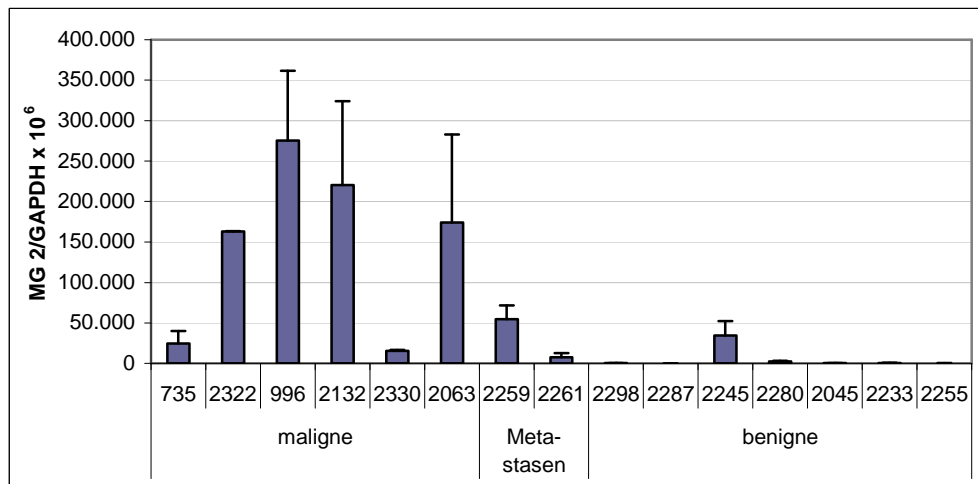


Abb. 25: Expression von Mammaglobin 2 in ausgewählten Proben aus ovariellen Gewebe. Die Darstellung erfolgt durch die Bildung einer Ratio der absoluten Kopienzahlen mit der den Kopienzahlen der GAPDH. Auffällig ist die geringe Expression von Mammaglobin 2 im ovariellen Normalgewebe gegenüber der Expression bei Proben von Ovarialcarcinomen.

Dem gegenüberzustellen ist die Kategorie der Carcinome, die im Mittel einen Wert von 145.295 Kopien MG 2 mRNA/GAPDH mRNA x  $10^6$  zeigt. Der Quotient ergibt einen Wert

von 27 beim Vergleich beider Kategorien zugunsten der Entität der Carcinome. Auch in der nachstehenden Abbildung lassen sich verschiedene Expressionshöhen zwischen diesen zwei Kategorien dokumentieren. Anhand des Mann-Whitney-U-Tests konnte ein Signifikanzunterschied von  $p=0,005$  bestimmt werden, die als sehr signifikant (\*\*) gilt.

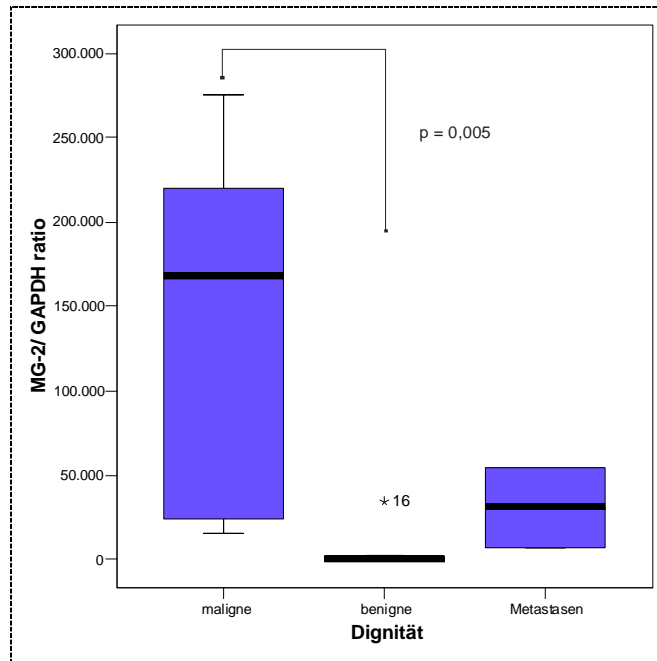


Abb. 26: Darstellung der Expressionslevel von Mammaglobin 2 in den ovariellen Gewebeproben. Untersucht wurden sechs der 10 malignen, 7 der 10 benignen Gewebeproben und zwei Gewebeproben der Metastasen von Ovarialcarcinomen.

Zur Dokumentation signifikanter Unterschiede in den Expressionsleveln der einzelnen Parameter sind jeweils die arithmetischen Mittelwerte der untersuchten Kategorien verglichen und ein Quotient ermittelt worden. Dieser gibt den numerischen Unterschied zwischen den Expressionshöhen der Gruppe der Carcinome und des Normalgewebes an.

Parameter	Normalgewebe (Kopien/ GAPDH x 10 <sup>6</sup> )	Carcinom (Kopien/ GAPDH x 10 <sup>6</sup> )	Signifikanz als p-Wert	Quotient (Carcinom/ Normalgewebe)
<b>Mammaglobin 1</b>	76.591	491.591	0,003 (**)	<b>6,4</b>
<b>Lipophilin B</b>	377.477	1.202.578	0,005 (**)	<b>3,2</b>
<b>Mammaglobin 2</b>	5.382	145.295	0,005 (**)	<b>27</b>

Tab. 18: Berechnung der Quotienten anhand der errechneten Mittelwerte der Kategorien „maligne“ und „benigne“. Ergänzend ist die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen beiden Kategorien ermittelt worden.

### 3.3.5 CA 125 im Serum

In der Diagnostik und Therapie des Ovarialcarcinoms gilt die Bestimmung des Tumormarkers CA 125 (Carboanhydrate antigene) als Standard. Die Expression von CA 125 erfolgt in vielen Geweben des adulten Organismus, v.a. auch in gynäkologischen Geweben (Nouwen et al., 1987). Zudem unterliegt die Expression von CA 125 verschiedenen physiologischen Einflüssen, wie etwa Schwangerschaft oder dem Menstruationszyklus (Bon et al., 1996; Gocze et al., 1988). Aufgrund der fehlenden Spezifität und einer geringen Sensitivität v.a. in Frühstadien der Erkrankung erfolgt die Bestimmung von CA 125 um das Ansprechen auf eine Therapie und den Verlauf der Erkrankung an einem Ovarialcarcinom zu beurteilen (Nagele et al., 1995). Im Zuge der Gewinnung der ovariellen Gewebeproben sind routinemäßig die Werte des Tumormarkers CA 125 im Serum für jeden Kasus bestimmt worden. Die Werte dienen neben den pTNM-Stadien und der histologischen Untersuchung zur Charakterisierung der Gewebeproben. In der folgenden Abbildung kommen die ermittelten Daten für den Tumormarker CA 125 (U/l) entsprechend der Probe zur Darstellung. Dabei lagen alle erhobenen CA 125-Werte für die Kontrollgruppe im Normbereich (<30U/l). Die Werte in der Gruppe der Malignitäten zeigten eine starke Variationsbreite. Dabei waren 6 von 10 deutlich erhöht, während zwei der Proben nur eine grenzwertige Erhöhung zeigen. Auffällig sind dabei die zwei untersuchten Gewebe der Metastasen, die eine überdurchschnittliche Erhöhung, vor allem im Vergleich zu der Gruppe der Malignitäten zeigen.

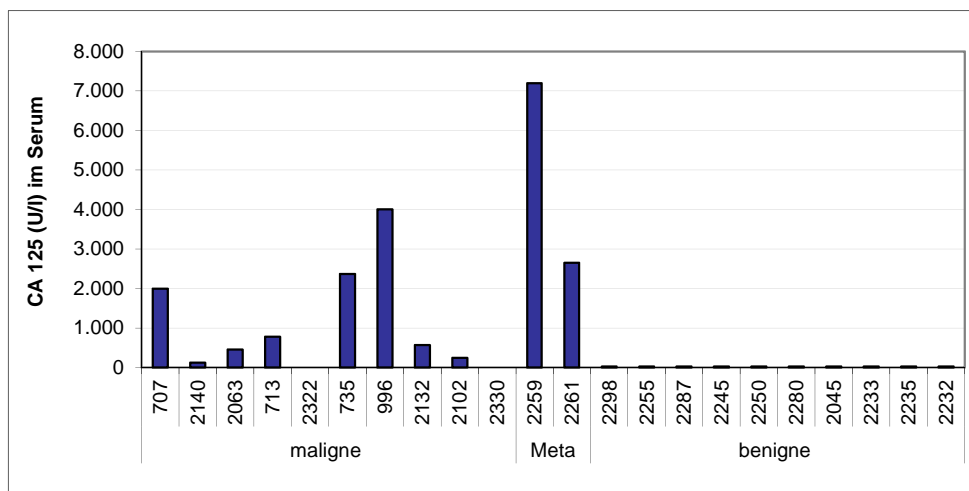


Abb. 27: Darstellung der gemessenen CA 125 Werte im Serum. Die Bestimmung des Tumormarkers erfolgte durch Blutentnahme präoperativ im Universitätsklinikum Kiel. Die Werte wurden im Rahmen der Untersuchung der übersandten Gewebeproben übermittelt. Dabei zeigen sich alle Proben der Kontrollgruppe normwertig, jedoch ergaben die Analysen der Vertreter der malignen Gruppe ein heterogenes Expressionsmuster.

Der Tumormarker CA 125, der im Zuge der Probengewinnung im Serum bestimmt wurde, ist ebenso in die statistische Analyse eingegangen. Zwischen den beiden Kategorien „maligne“ und „benigne“ besteht ein hoch signifikanter Unterschied im Expressionsniveau mit  $p < 0,001$ . Auffällig sind die hohen Werte, die für die zwei Gewebeproben der Metastasen ermittelt wurden. Bei geringem Umfang dieser Gruppe mit zwei Proben eines metastasierten Mammacarcinoms sind Interpretationen und Auswertungen nur eingeschränkt möglich.

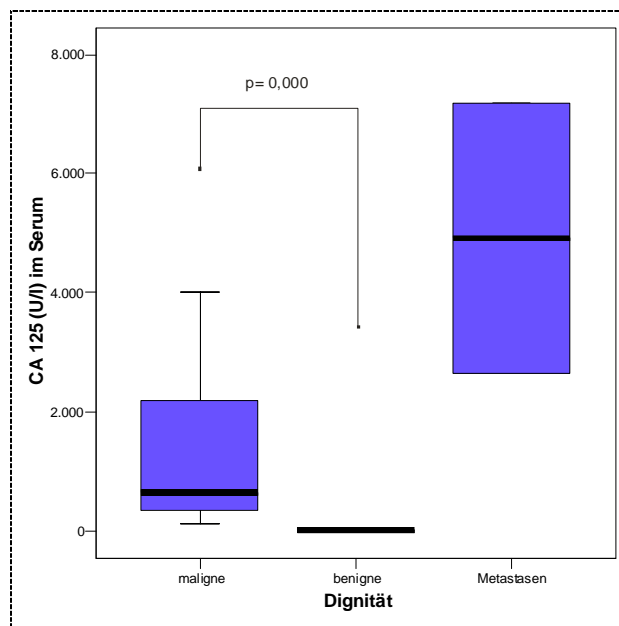


Abb. 28: Abbildung der angegebenen CA 125-Werte im Serum aller oben genannten Gewebeproben. Die Werte sind prätherapeutisch im Blut der Patientinnen bestimmt worden.

### *Korrelationsanalytik zu Untersuchungen im Ovarialcarcinom*

Aufgrund der bemerkenswerten Korrelationen zwischen den einzelnen Vertretern der Sekretoglobine hinsichtlich der Daten aus den Analysen des RNA Panel, schlossen sich die Anfertigung von Korrelationen aus den Expressionsmuster der Sekretoglobine in den ovariellen Geweben an.

Die stärkste Korrelation ergab sich für die Werte von Mammaglobin 1 und Lipophilin B. Der Korrelationskoeffizient  $r$  erbrachte einen Wert von 0,874 aus der Analyse der beiden Parameter. Für die Expressionsniveaus der beiden Parameter zeigte sich eine hohe Korrelation basierend auf Tab.17 im Methoden-Teil. Bezüglich des ermittelten Determinationskoeffizienten mit  $r^2 = 0,763$  ergab sich somit eine gemeinsame Varianz von 76 % für beide Parameter.



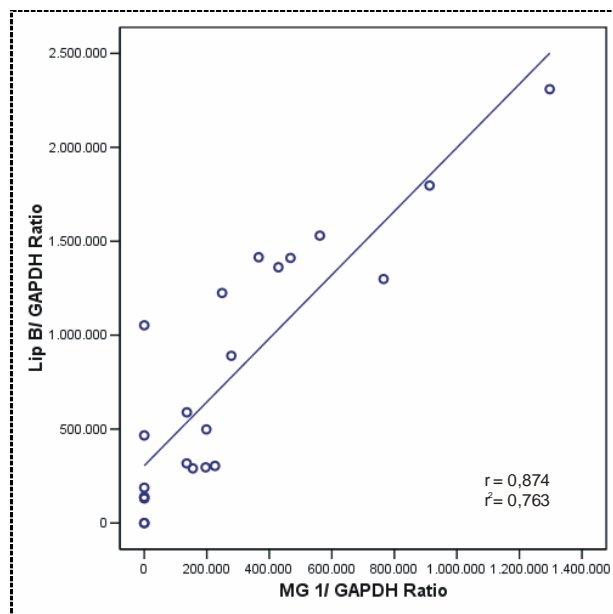


Abb. 29: Darstellung der Einzelwerte im Streudiagramm von Mammaglobin 1/ GAPDH\*10<sup>6</sup> zu Lipophilin B/GAPDH\*10<sup>6</sup> aus den untersuchten Geweben der ovariellen Tumore. Die Korrelation nach Pearson ergibt einen Korrelationskoeffizienten von 0,874, der eine sehr signifikante Korrelation (\*\*) bei  $p < 0,01$  zwischen den zwei Parametern anzeigt.

Die Korrelationsanalyse der ermittelten Daten von Mammaglobin 2 und Mammaglobin 1 ergab eine Korrelationskoeffizienten  $r=0,742$ . Basierend auf der vorherbeschriebenen Einteilung ergab sich ebenfalls eine hohe Korrelation für die Expressionslevel beider Größen. Der Determinationskoeffizient mit  $r^2=0,551$  für den Zusammenhang Mammaglobin 1 und Mammaglobin 2 zeigte eine gemeinsame Varianz von 55%.

Parameter 1	Parameter 2	Korrelationskoeffizient $r$	Korrelation	Varianz
MG 1	Lip B	0,874	Hoch	76%
MG 1	MG 2	0,742	Hoch	55%
Lip B	MG 2	0,742	Hoch	55%
MG 1	CA 125	0,566	Mittel	32%
Lip B	CA 125	0,581	Mittel	33%

Tab. 19: Korrelationsanalysen mit Bestimmung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson. In die Analyse finden die Daten aus den Untersuchungen der ovariellen Gewebeproben Eingang. Aufgezeigt sind die beiden zum Vergleich bestimmten Parameter, die nach Stärke der Zusammenhänge gruppiert werden.

Die Korrelation nach Pearson ergab für die Daten der beiden Parameter Lipophilin B und Mammaglobin 2 einen Koeffizienten von  $r=0,742$ . Nach Einteilung der Ergebnisse der Korrelation ergab sich für die beiden Größen eine hohe Korrelation. Die gemeinsame Varianz lag bei 55% durch einen ermittelten Determinationskoeffizienten  $r^2=0,551$ .

Für die Korrelationsanalyse der ermittelten Daten für Mammaglobin 1, bzw. Lipophilin B und CA 125 war eine mittlere Korrelation von  $r=0,566$ , bzw.  $r=0,581$  nachweisbar.

**Zusammenfassung:**

In den Untersuchungen der ovariellen Gewebe konnte eine Expression von Mammaglobin 1 und 2, sowie Lipophilin B gezeigt werden. Wesentliche Unterschiede in den Expressionsniveaus ergaben sich in Abhängigkeit von der Dignität des Gewebes. Das Expressionslevel in der Entität der malignen Gewebe im Vergleich zu den benignen/Normal-Ovarialgeweben lag bei allen drei Parametern signifikant höher.

In den Korrelationsanalysen zu den untersuchten Parametern bestätigte sich der Eindruck, dass Zusammenhänge in der Expression zwischen den Parametern nachzuweisen sind. So zeigen die Parameter Mammaglobin 1, Lipophilin B und Mammaglobin 2 hohe Korrelationen hinsichtlich der Expression auf mRNA- Ebene.

### 3.3.6 Expression von MG1, LP-B und GPx4 in humanen Geweben

Die Expression von Mammaglobin 1 und 2 und von Lipophilin B konnte zuvor in Untersuchungen von ovariellen Gewebeproben gezeigt werden. Bislang war eine Gewebespezifität, die als Grundlage für die Eigenschaft als Biomarker besteht, für das Mammaglobin 1 postuliert worden. Für Lipophilin B und Mammaglobin 2 war bereits auch in anderen Geweben eine Expression gezeigt worden. Zudem ergaben sich in den bisherigen Untersuchungen auch Hinweise über Zusammenhänge der Expression von mGPx4 und Mammaglobin 1 und Lipophilin B. Unter Berücksichtigung der möglichen Rolle der GPx4 in der Tumorbilogie und evidenten regulativen Zusammenhängen mit zwei Proteinen einer Familie, die in der Diskussion als mögliche Tumormarker stehen, erweiterten wir die Betrachtung hinsichtlich des Expressionsmusters und der Gewebeverteilung in 20 verschiedenen Geweben. Als Ausgangsmaterial diente kommerziell zu erwerbende humane RNA von zwanzig verschiedenen Geweben, gepoolt aus drei Spendern. Zunächst erfolgte die Umschreibung von zwei  $\mu\text{g}$  RNA in cDNA mittels RT-PCR. Mittels Real-Time PCR und spezifischen Primern der o.g. Parameter wurden die relativen Verhältnisse der mRNA für mGPx4, Mammaglobin 1, Mammaglobin 2 und Lipophilin B für die verschiedenen Gewebe bestimmt. Die Real-Time PCR wurde für jedes Gewebe zu jedem untersuchten Parameter dreimal wiederholt.

Um Aussagen über die Expressionslevel innerhalb des gesamten RNA-Panels treffen zu können, wurden zunächst die Expressionsniveaus normiert durch die Bildung eines Verhältnisses der ermittelten Kopienzahlen der mRNA der Sekretoglobine zu den entsprechenden Kopienzahlen der GAPDH mRNA. Die ermittelten Verhältnisse sind als Balkendiagramm dargestellt.

Als Standardprozedur ist die Bestimmung der Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase in den erworbenen RNA-Proben erfolgt (nachstehende Abbildung). Dabei zeigte sich ebenfalls für jede untersuchte Probe eine messbare Expression des sog. „house-keeping-enzyme“. Damit ließ sich auch hier eine erfolgreiche Synthese und Amplifikation der cDNA darlegen.

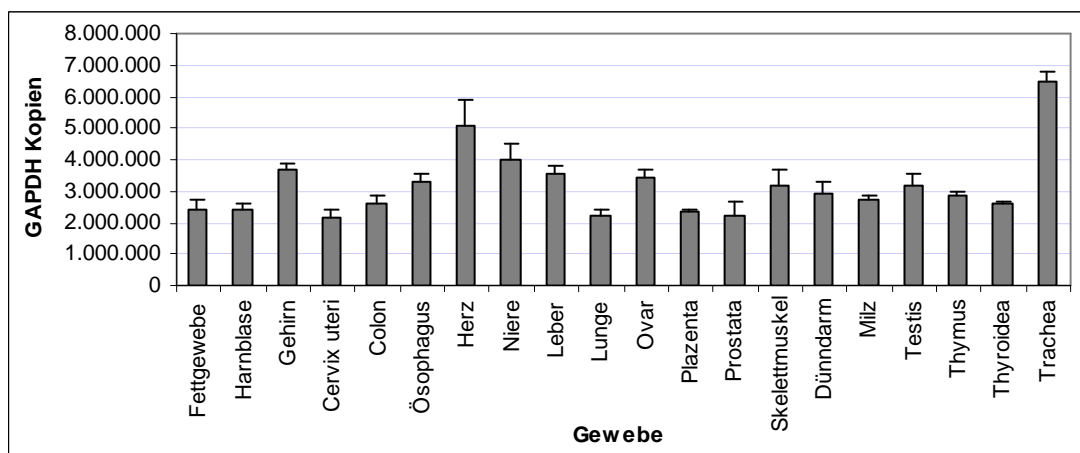


Abb. 30: Expressionsniveaus der Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase in den Geweben des RNA-Panels. Die Höhe der Expression für die Mehrheit der Proben liegen in ähnlichen Bereichen, bis auf die mRNA der Trachea und des Herzes, die auf eine höhere Zahl an Amplifikaten den Rückschluss erlauben.

Die relativen Ergebnisse der humanen Gewebe der Real-Time-PCR eröffneten für die mitochondriale Form der GPx4 ein einheitliches Muster in der Darstellung im Säulendiagramm. Bemerkenswert war die hohe Expression in der Probe Testes, die mehr als 10fach über den Expressionslevel der mGPx4 in den anderen Geweben lag.

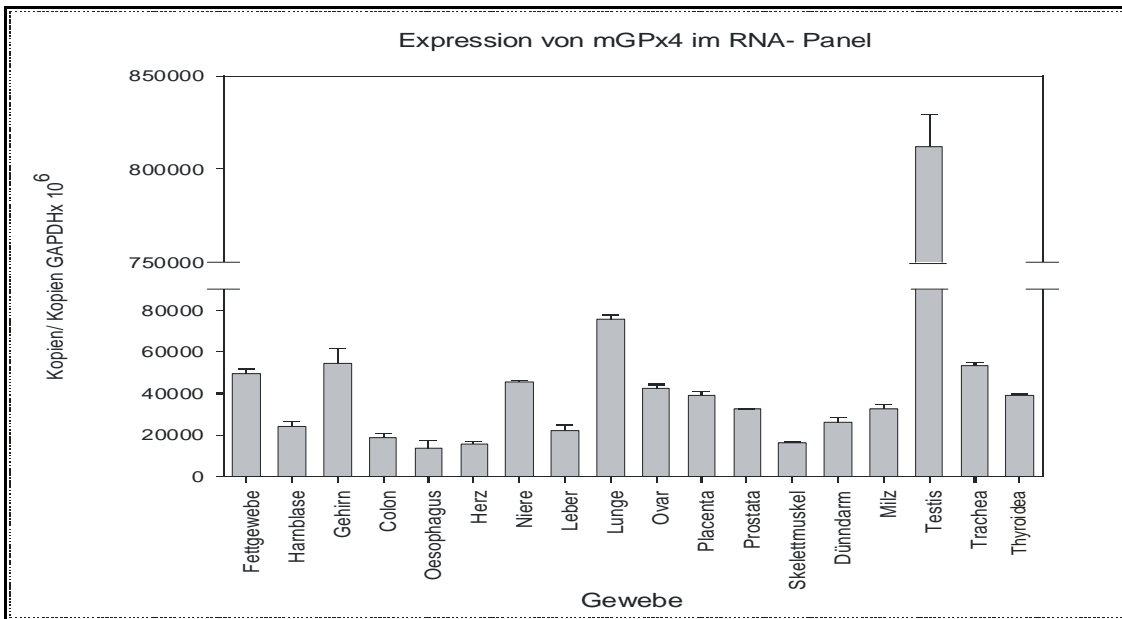


Abb. 31: Expression der mitochondrialen GPx4 in ausgewählten Geweben. Die Darstellung erfolgt in Relation zu den ebenfalls erhobenen Kopienzahlen für die GAPDH.

Für Mammaglobin 1 ergaben sich folgende Verhältnisse (Abb.32): Während sich in den Proben von Gehirn und Colon keine Expression von Mammaglobin 1 feststellen ließ, wurden im Fettgewebe, Cervix uteri und Lunge überdurchschnittlich hohe Expressionsniveaus von Mammaglobin 1 bestimmt. Für die übrigen Gewebe ergab sich eine basale Expression von Mammaglobin 1, die in ähnlicher Höhe lag.

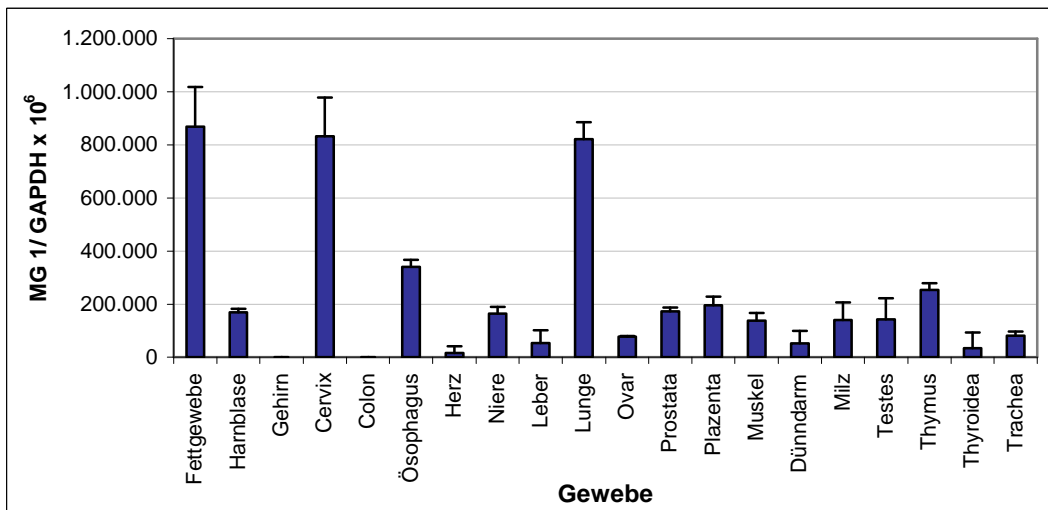


Abb. 32: Expression von Mammaglobin 1 (Kopien) in humanen Geweben, angegeben im Verhältnis zu ermittelten Kopien der GAPDH.

Die in der folgenden Abbildung aufgeführten Expressionsniveaus repräsentierten die ermittelten Verhältnisse von Lipophilin B-mRNA in humanen Geweben. Besonders hohe Expressionen zeigten sich für die Proben der Cervix uteri und der Lunge. Eine erhöhte

Expression ließ sich auch für das Fettgewebe feststellen. Für die verbleibenden Gewebe zeigte sich eine gleichmäßig niedrige Expression. Das Expressionsmuster des RNA-Panels für Lipophilin B zeigte sich ähnlich zu dem von Mammaglobin 1 in Abb. 33.

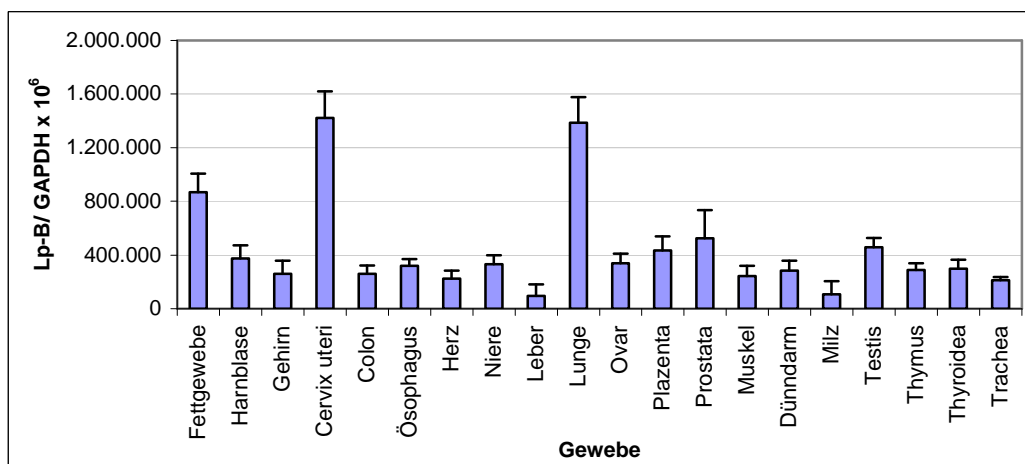


Abb. 33: Darstellung der Expression von Lipophilin B. Die ermittelten Kopienzahlen für Lipophilin B sind im Verhältnis zu entsprechenden Werten der GAPDH angegeben. Eine erhöhte Expression von Lipophilin B zeigt sich für Cervix uteri und Lunge.

Als weiteren Vertreter der Sekretoglobine ist Mammaglobin 2 untersucht und das entsprechende Expressionsmuster in nachstehender Abbildung aufgezeigt worden. In dem RNA-Panel ließ sich ein überdurchschnittlich hohes Expressionsniveau für Proben der Cervix uteri und der Lunge feststellen. In der Präparation von Herz, Milz und Trachea konnte keine Expression von Mammaglobin 2 gefunden werden. In der Mehrzahl der verbleibenden Gewebeproben waren niedrige Expressionen von Mammaglobin 2-mRNA zu dokumentieren.

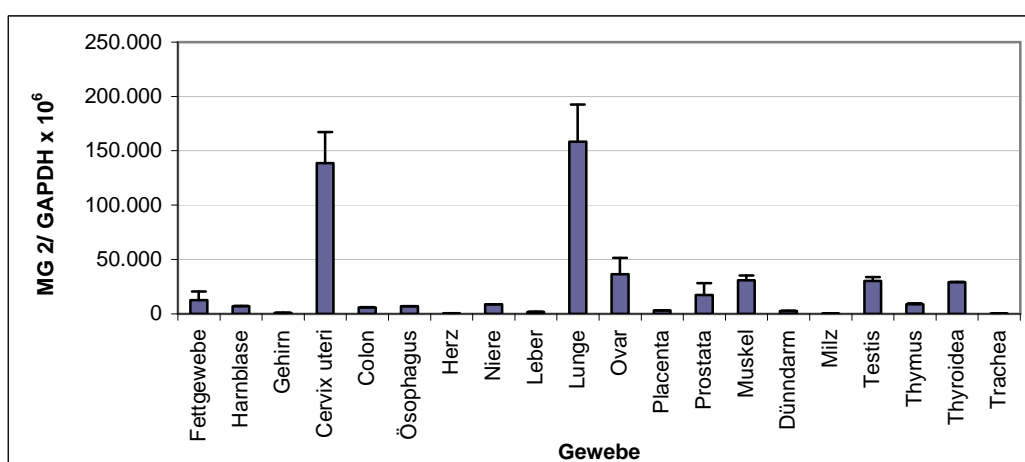


Abb. 34: Expression von Mammaglobin 2 in verschiedenen Geweben. Deutlich treten die Expressionsniveaus von Cervix uteri und Lunge aufgrund ihrer Höhe hervor. In Proben der Gewebe Herz, Milz und Trachea kann keine Expression von Mammaglobin 2 bestimmt werden.

### *Korrelationsanalytik zu Untersuchungen im RNA-Panel*

Zur Untersuchung von Zusammenhängen bezüglich des Expressionsverhalten der untersuchten Parameter sind aus den erhobenen Daten Korrelationsanalysen nach Pearson durchgeführt worden. In die Untersuchungen sind die Werte aller Gewebe einbezogen worden. Dabei sind mögliche Korrelationen für alle Parameter untersucht worden. Der ermittelte Korrelationskoeffizient  $r$  gibt dabei die Stärke der Zusammenhänge für die untersuchten Parameter wieder. Zur Erwähnung kamen dabei nur Zusammenhänge, die mit  $r > 0,5$ , also einer mittleren Korrelation bestimmt wurden. Die Korrelationsanalyse bezieht sich an dieser Stelle ausschließlich auf die Daten, die aus den Untersuchungen der RNA-Proben erhoben wurden. Die Darstellung dieser Werte erfolgt im Streudiagramm. Durch die Ermittlung einer linearen Projektionslinie erfolgte zudem die Angabe des Determinationskoeffizienten  $r^2$ .

Parameter	Parameter 2	Korrelation	Korrelationskoeffizient	Signifikanz
Mammaglobin 1	Mammaglobin 2	hoch	0,596	**
Mammaglobin 1	Lipophilin B	hoch	0,867	**
Lipophilin B	Mammaglobin 2	hoch	0,828	**
mGPx4	Mammaglobin 1	keine	0,003	-
mGPx4	Mammaglobin 2	keine	0,130	-
mGPx4	Lipophilin B	keine	0,120	-

Tab. 20: Übersicht zu den erhobenen Ergebnissen und Bestimmung der Korrelationskoeffizienten aus den Analysen des RNA-Panels. Signifikant sind die Zusammenhänge zwischen den Vertretern der Sekretoglobine. Keine Korrelation ist in den Analysen mit der mitochondrialen Form der GPx4 festzustellen.

Für die Parameter Mammaglobin 1 und Lipophilin B ergibt sich hinsichtlich der Ergebnisse der Auswertungen des RNA-Panels eine Korrelation von 0,867. In diese Höhe ist der Korrelationskoeffizient nach Pearson als signifikant (\*\*) einzustufen. Hinsichtlich der Korrelationsanalyse von Mammaglobin 1 und 2 konnte ebenfalls ein hoher Zusammenhang dokumentiert werden. Nach Pearson beträgt die Korrelation 0,596 ist wird ebenfalls als ein signifikanter (\*\*) Zusammenhang benannt. Konsekutiv erfolgte anschließend die Ermittlung eines möglichen Zusammenhanges zwischen Mammaglobin 2 und Lipophilin B. Mit einem Koeffizienten von 0,828 korrelieren diese beiden Parameter ebenfalls auf hohem und signifikanten Niveau (\*\*). Hinsichtlich der mitochondrialen

GPx4 konnte für keinen Vertreter der Sekretoglobine ein signifikanter Zusammenhang ermittelt werden.

**Zusammenfassung:**

In den Analysen zu den Expressionsmustern der einzelnen Parameter kann eine basale Expression für Mammaglobin 1, Lipophilin B und Mammaglobin 2 gezeigt werden. Hinsichtlich des Korrelationsverhaltens kann keine signifikante Korrelation im Expressionsverhalten zwischen der GPx4 und Vertretern der Sekretoglobine nachgewiesen werden. Es zeigt sich jedoch eine hohe Korrelation der Expressionsmuster der einzelnen Vertreter der Sekretoglobine.





## 4 Diskussion

### 4.1 Glutathionperoxidase 4

Die Glutathionperoxidase gehört zur Familie der selenabhängigen Glutathionperoxidasen (Ursini et al., 1985). Als Substrat des Enzyms GPx4 fungieren neben Hydroperoxiden und Lipidhydroperoxiden auch Phospholipidhydroperoxide (Ursini et al., 1985). Das Gen der GPx4 liegt auf dem humanen Chromosom 19 und codiert aufgrund von alternativen Transkriptionsstarts für drei verschiedene Isoformen: die zytosolische, die mitochondriale (Arai et al., 1996; Pushpa-Rekha et al., 1995) und die spermienkern-spezifische Form (Pfeifer et al., 2001).

#### 4.1.1 Expression des GPx4-Pseudogens

Ausgangspunkt für die durchgeführten Untersuchungen war die Beschreibung eines funktionellen Pseudogens für die GPx4 (Boschan et al., 2002). Dabei konnten für das GPx4-Gen zwei prozessierte Pseudogene beschrieben werden. Pseudogen 1 liegt wie das paraloge Gen auf dem Chromosom 10 und enthält zwei stille Punktmutationen. Das Pseudogen 2 enthält über 40 Mutationen in der codierenden Sequenz, zudem liegt dieses Pseudogen auf dem Chromosom 17. Die Expression des Pseudogen 1 konnte auf mRNA-Ebene in verschiedenen murinen Organen nachgewiesen werden. Es ist vermutet worden, dass bei einem Ausfall des paralogen Gens die Übernahme und Sicherung der biologischen Funktion durch dieses Pseudogen der GPx4 erfolgen könnte. Die Klärung von möglichen regulatorischen Zusammenhängen zwischen GPx4-Gen und Pseudogen war ein wesentlicher Bestandteil der Fragestellung.

Pseudogene sind als infunktionelle Kopien von Genen beschrieben, denen keine biologische Funktion zukommt (Vanin, 1985). Erstmals wurde der Begriff Pseudogen im Zusammenhang mit Publikationen zum Genom einer Froschunterart verwendet (Jacq et al., 1977). Nachfolgend konnten Pseudogene auch in anderen Spezies nachgewiesen werden, wie z.B. Insekten (Ramos-Onsins und Aguade, 1998), Säugetiere (Vanin et al., 1980). Ebenfalls wurden Pseudogene in weiteren Organismen, wie Pflanzen (Loguercio und Wilkins, 1998) und Bakterien (Fsihi et al., 1996) beschrieben. Ein häufiges Vorkommen von Pseudogenen ist für „house-keeping“- Enzyme n (Lee et al., 1983), sowie auch für Antikörper beschrieben worden (Hollis et al., 1982). Auch für verschiedene Selenoproteine sind bereits prozessierte Pseudogene beschrieben worden. Für die Glutathionperoxidase 2

(gastrointestinale Glutathionperoxidase) als einen weiteren Vertreter der Glutathionperoxidasen konnte ein prozessiertes Pseudogen im murinen Organismus gezeigt werden (Chu et al., 1996). Das funktionelle Gen ist auf Chromosom 12 lokalisiert worden, während das Pseudogen auf Chromosom 7 beschrieben wurde (Tsuji et al., 1998). Auch anderen Selenproteinen, wie z.B. dem humanen Selenoprotein W konnten prozessierte Pseudogene zugeordnet werden (Bellingham et al., 2003).

### *GPx4-Pseudogen in Normalgeweben*

Die Definition von Pseudogenen beinhaltet, dass Pseudogene nicht codierende Gensequenzen sind, die nicht transkribiert werden (Vanin, 1985). In der vorliegenden Arbeit konnte eine Expression des GPx4-Pseudogens auf mRNA-Ebene in allen untersuchten murinen Geweben gezeigt werden. Der Nachweis des GPx4-Pseudogens gelang durch eine kombinierte PCR-und Restriktionsstrategie. Neben einer Darstellung in der Gelelektrophorese anhand unterschiedlicher Spaltprodukte, konnte die Existenz des GPx4-Pseudogens auch durch den Nachweis der Sequenz mit der kennzeichnenden Punktmutation erbracht werden. Die Expressionshöhe des GPx4-Pseudogens war in allen untersuchten Geweben ähnlich messbar. Das zeigt, dass das GPx4-Pseudogen entgegen der Definition transkribiert wird. Inzwischen sind mehrere Beispiele in der Literatur veröffentlicht worden, die eine Expression von prozessierten Pseudogenen beschreiben. Erstmals wurde die Transkription von Pseudogenen anhand des Preproinsulin-Gens I beschrieben worden (Soares et al., 1985). Für das Cytochrom P21A1 konnte ebenfalls ein Transkript des Pseudogens gezeigt werden (Bristow et al., 1993). Weiterführend konnte im humanen Organismus mRNA des 5-HT7-Rezeptors nachgewiesen werden (Olsen und Schechter, 1999). Bemerkenswert zeigt sich dabei, dass das Transkript des Pseudogens auch in Organen gefunden wurde, die das 5-HT7-Rezeptor-Protein sonst nicht exprimieren. Angesichts der vielen Beispiele für biologisch aktive Pseudogene muss sicherlich die bisherige Definition für ein Pseudogen als infunktionelle Kopien von Genen überdacht werden. Darüberhinaus kann die funktionelle, biologische Bedeutung von Pseudogenen Gegenstand weiterer Untersuchung sein Ebenfalls ist bisher wenig bekannt über regulatorische Mechanismen zwischen paralogem Gen und Pseudogen oder ob biologische aktive Pseudogene überhaupt einer Regulation unterliegen.

### *Expression von Pseudogenen auf Proteinebene*

Weiterführend steht in der Diskussion, ob Pseudogene für funktionelle oder auch verkürzte Proteinsequenzen kodieren können. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Transkription des prozessierten Pseudogens der GPx4 durch Nachweis der Sequenz auf mRNA-Ebene gezeigt werden. Ein Nachweis auf Proteinebene für das Pseudogen 1 der GPx4 war nicht möglich, aufgrund einer fehlenden Differenzierungsmöglichkeit zwischen dem Produkt des paralogen Gens und dem Produkt des Pseudogens. Die zwei stillen Punktmutationen führen zu keiner Änderung der Proteinsequenz, so dass das Protein als Genprodukt hinsichtlich des Ursprungsortes nicht zu unterscheiden ist. In der Literatur existieren wenige Beispiele von prozessierten Pseudogenen mit erhaltener biologischer Funktion. So wird vermutet, dass eine Untereinheit des Ferritin L im murinen Organismus von einem intronlosen Gen kodiert wird (Renaudie et al., 1992). An anderer Stelle konnte gezeigt werden, dass das Transkript des Connexin43-Pseudogens durch in vitro Translation zu einem 43kDa großen Protein führt. Das Protein des Pseudogens besitzt die Eigenschaft das Zellwachstum zu inhibieren und damit die Funktion des Wildtypgens negativ reguliert (Kandouz et al., 2004). Aufgründessen werden auch bei biologisch aktiven Pseudogenen mögliche regulatorische Zusammenhänge zwischen Pseudogen und paralogem Gen vermutet. Für das Pseudogen PTEN wird ebenfalls eine mögliche Funktion diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass das Pseudogen transkribiert wird und in manchen Geweben einen Anteil von 70% der Gesamt-RNA stellt (Fujii et al., 1999). Nach in-vitro-Translation war eine erhaltene katalytische Aktivität der codierten Phosphatase nachweisbar.

Zwischen Gen und Pseudogen kann es zu Interaktionen kommen, die wiederum zu gegenseitigen Veränderungen und Regulationen führen. Einige Pseudogensequenzen scheinen über einen Positionseffekt die Expression von benachbarten Genen zu regulieren (Lee, 2003). Ein Merkmal von Pseudogenen ist, dass sie Mutationen aufgrund von fehlendem Selektionsdruck akkumulieren und dadurch inaktiv werden. Im Gegenzug ist beschrieben worden, dass Pseudogene auch durch Mutationen aktiviert werden können (Harris et al., 1984). Ebenfalls kann es auch über DNA-Interaktionen zu einem Austausch mit dem paralogem Gen kommen (Wu und Morris, 1999).

### *GPx4-Pseudogen in heterozygotem Knockout*

In der weiteren Bearbeitung der Aufgabenstellung dieser Arbeit waren neben der Expression des Pseudogen 1 der GPx4 im murinen Organismus auch Einflussfaktoren auf die Expression des Pseudogens von Interesse. Um mögliche regulatorische Einflüsse auf die Expression des Pseudogens aufdecken zu können, ist ein murines, heterozygotes Knockoutmodell der GPx4 gewählt worden. Dabei war insbesondere die Expressionshöhe des GPx4-Pseudogens im murinen heterozygoten Knockouttier von Interesse. Knockout-Modelle dienen zur Erforschung von biologischen Funktionen von Enzymen. Das Prinzip kennzeichnet sich durch Demaskieren von funktionellen Defiziten nach Ausschaltung eines Gens. In dieser Arbeit ist hinsichtlich einer Expression des GPx4-Pseudogens ein heterozygotes murines GPx4-Knockoutmodell angewendet worden. Im Ergebnis konnte in allen untersuchten Organen des heterozygoten GPx4-Knockouttieres die Expression des GPx4-Pseudogens gezeigt werden. Im Vergleich zum Kontrolltier zeigte sich eine ähnliche Expressionshöhe des GPx4-Pseudogens im Knockoutmodell. Aufgrund ähnlicher Expressionshöhen von Pseudogen und paralogem Gen im heterozygoten Knockoutmodell, lässt sich vermuten, dass der Ausfall eines paralogen Gens keine regulativen Auswirkungen auf die Expression des Pseudogens hat. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint das GPx4-Pseudogen eine eher untergeordnete Rolle in der biologischen Funktion der GPx4 einzunehmen.

In der Literatur ist die Bedeutung von Pseudogenen weiterhin umstritten. Es wird vermutet, dass der Organismus Strategien entwickelt hat um auf Umwelteinflüsse reagieren zu können. Dazu gehört auch die Generierung von Pseudogenen (Harrison und Gerstein, 2002). Unter anderem konnte ein vermehrtes Auftreten von Pseudogenen für Immunglobuline (Harrison et al., 2002), sowie für olfaktorische Rezeptoren (Glusman et al., 2001) beschrieben werden. Es wird vermutet, dass Pseudogene neben einer evolutionären Bedeutung zudem bei Ausfall des paralogen Gens als Ersatz in bestimmten Situationen wie Umweltstress dienen (Harrison et al., 2002). Jedoch ist für das Enzym GPx4 gezeigt worden, dass bei Ausfall von beiden GPx4-Allelen der Organismus nicht lebensfähig ist und bereits in der frühen embryonalen Entwicklung in utero abstirbt (Imai et al., 2003; Yant et al., 2003). Damit scheint die GPx4 essentiell für die embryonale Entwicklung zu sein. Bisher ist jedoch nicht geklärt aufgrund welcher Umstände es zu einem Abbruch der embryonalen Entwicklung kommt. In der Diskussion steht dabei ein vermehrter Anfall von Peroxiden in der Embryonalentwicklung oder eine direkte

Enzymfunktion. Bemerkenswert scheint, dass homozygote Knockouttiere anderer Selenoproteine, z.B. GPx1 (Ho et al., 1997), GPx2 (Esworthy et al., 2001) und Selenoprotein P (Schomburg et al., 2003) keine Auffälligkeiten in Wachstum und Entwicklung des Organismus zeigen. Die GPx4 ist als wesentlicher Bestandteil des Antioxidativen Schutzsystems der Zelle etabliert. Glutathion existiert als Reduktionsäquivalent in der Zelle und dient der GPx4 als Substrat. Ein weiteres Enzym des Redox-Stoffwechsels zeigt in Knockout-Embryonen Ähnlichkeiten mit der GPx4. Das Enzym  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase ( $\gamma$ -GCS) katalysiert den ersten Schritt in der Glutathionsynthese. Bei murinen homozygoten  $\gamma$ -GCS-Knockouttieren kommt es zu einem Absterben der Frucht in utero am 8.5 Tag (Shi et al., 2000). Dabei führte man den Abbruch der embryonalen Entwicklung auf eine erhöhte Apoptoserate zurück. Für weitere antioxidative Enzyme sind Knockoutmodelle angewendet worden. Für das Enzym Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD) zeigt sich an homozygoten Knockout-Mäusen eine dilatative Kardiomyopathie und eine frühe Mortalität aufgrund neurodegenerativer Prozesse am 10. Lebenstag (Li et al., 1995). Homozygot defiziente Mäuse der Enzyme extrazelluläre Superoxid-Dismutase (Carlsson et al., 1995) und Katalase (Takahara, 1952) waren keine Einschränkungen in der postnatalen Entwicklung ersichtlich.

Anhand der Letalität von homozygot GPx4-defizienten Mäusen lässt sich vermuten, dass dem GPx4-Pseudogen keine entscheidende Rolle in der Aktivität des Enzyms zukommt. Andernfalls wäre es zu erwarten, dass ein Teil der biologischen Funktion des Enzyms durch das GPx4-Pseudogen übernommen würde und sich die Entwicklung des Organismus zwar eingeschränkt, jedoch grundsätzlich vollziehen könnte. Ebenfalls scheint es auch in dieser Konstellation zu keiner entscheidenden kompensatorischen Erhöhung der GPx4-Pseudogenexpression zu kommen, die zu einer Erhöhung des Transkripts führt. Diese Vermutungen würden sich mit den hiesigen Ergebnissen decken, dass die Expression des Pseudogens keinen entscheidenden Anteil an der Gesamtaktivität des GPx4-Enzyms wahrnimmt.

### *Pathologie der Pseudogen-Expression*

Ein weiterer Gesichtspunkt zum Vorhandensein von Pseudogenen ist die medizinische Relevanz, die sich aus der Existenz von Pseudogenen ergibt. Für das Enzym Rac1, eine Rho-GTPase, die wichtige Funktionen des Zellzyklus und der intrazellulären Signaltransduktion übernimmt (Olson et al., 1995), konnten mehrere Pseudogene im

humanen Organismus beschrieben werden (Kugler et al., 2004). In weiteren Untersuchungen des Rac1-Pseudogens konnte die Expression in verschiedenen humanen Geweben gezeigt werden. Interessanterweise war eine Expression des Pseudogens in Gehirngewebe nicht nachweisbar, jedoch konnten in 77% der untersuchten Neoplasien des Gehirns eine Überexpression des Rac1-Pseudogens im Vergleich zum paralogen Gen nachgewiesen werden (Hwang et al., 2005). In einer weiteren Untersuchung wird die Expression eines Pseudogens in cerebralen Tumoren als pathologisch eingeschätzt (Zhang et al., 2000). Für das Tumorsuppressorgen P-TEN war zuvor in ein Drittel der untersuchten Glioblastome eine somatische Mutation des Tumorsuppressor-Gens nachweisbar (Bostrom et al., 1998). In der nachfolgenden Analyse konnte gezeigt werden, dass in allen untersuchten Glioblastomen entweder eine Mutation des Tumorsuppressorgens P-TEN oder die Expression des P-TEN-Pseudogens vorliegt (Zhang et al., 2000). Aufgrund der Expression des Pseudogens alternativ zur Mutation des Tumorsuppressorgens mit Ausbildung eines malignen Tumors ist eine mögliche Rolle des Pseudogens in der Tumorgenese postuliert worden. Weiterhin steht in der Diskussion, ob transkribierte Pseudogene auch biologisch aktiv sind. Dafür finden sich in der Literatur bislang wenige Beispiele. An einem *in vitro*-Modell konnte jedoch gezeigt werden, dass die Funktion von Pseudogenen über Regulationsmechanismen erhalten sein kann. Für das papilläre Schilddrüsenkarzinom war eine vermehrte Mutationsrate im BRAF-Gen gezeigt worden (Kimura et al., 2003). Das BRAF-Gen besitzt zudem ein prozessiertes Pseudogen, das ebenfalls in papillären Schilddrüsentumoren exprimiert wird (Zou et al., 2009). Bemerkenswert ist, dass die Expression des BRAF-Pseudogens *in vitro* über eine Kinaseaktivierung (MAP-Kinase) zu einer Induktion von Schilddrüsenneoplasien bei Mäusen führt. In der gleichen Arbeit konnte zudem eine inverse Korrelation zwischen der Expression des BRAF-Pseudogens und dem Auftreten einer Mutation im BRAF-Gen in Tumoren gezeigt werden. Für das Protein Connexin43 muss ebenfalls eine mögliche Rolle in der Tumorgenese thematisiert werden. Neben einer erhaltenen biologischen Funktion, charakterisiert sich das Connexin43-Pseudogen durch ein auffälliges Expressionsverhalten (Kandouz et al., 2004). Dabei kann eine Expression des Pseudogens in verschiedenen Tumorzelllinien nachgewiesen werden, jedoch ist eine Expression nicht im Normalgewebe detektierbar. Angesichts einer ausschließlichen Expression verschiedener Pseudogene in malignen Zellen, sowie einer möglichen erhaltenen biologischen Funktion von transkribierten Pseudogenen, ist eine Rolle von Pseudogenen in der Tumorgenese sicherlich zu diskutieren und kann möglicher Ausgangspunkt für neue Analysen sein.

Ein weiterer Gesichtspunkt ist, dass nicht die eigentliche Expression des Pseudogens pathologisch ist, sondern aufgrund der Sequenzhomologie zum paralogen Gen die Diagnostik von Erkrankungen erschweren oder verfälschen können. Ein Enzymdefekt der Glucocerebrosidase führt zum Auftreten der Speicherkrankheit M.Gaucher. Für das Enzym ist ein transkribiertes Pseudogen beschrieben worden (Sorge et al., 1990), das aufgrund seiner Nähe und Sequenzhomologie in der Genotypisierung bei Patienten mit dem paralogen Gen interferieren kann. Im Bereich der molekularbiologischen Diagnostik von bestimmten Erkrankungen sollte die Existenz von Pseudogenen berücksichtigt werden, da aufgrund der Sequenzhomologie zum paralogen Gen das Auftreten von falsch-negativen Resultaten begünstigt wird.

## **4.2 Zellphysiologische Rolle der GPx4**

### **4.2.1 Funktionelle Aspekte**

Das Enzym GPx4 charakterisiert sich durch die Fähigkeit, intrazellulär entstandene Peroxide reduzieren zu können. Besondere Bedeutung kommt dabei der mitochondrialen Form der GPx4 zu. Diese ist in der Lage, die Schäden durch oxidativen Stress in einer Zelle insbesondere im Mitochondrium, zu minimieren und damit zelluläre Funktionen aufrechtzuerhalten. Zudem bewahrt die Expression der GPx4 die Zelle vor Schädigungen, die durch vermehrten Anfall von Peroxiden im Mitochondrium entstehen. Für die embryonale Entwicklung scheint der GPx4 eine entscheidende Rolle zuzukommen, da homozygot GPx4-defiziente Mäuse nicht lebensfähig sind und bereits in utero absterben (Yant et al., 2003). Dabei scheint die zytosolische Isoform der GPx4 die entscheidende Funktion einzunehmen. Die nukleäre Form der GPx4 kommt ausschließlich in den Spermien geschlechtsreifer Säugetiere vor und wird zum Zeitpunkt der Embryogenese noch nicht exprimiert. Ein isolierter Knockout der mitochondrialen Isoform bei Mäusen führt zwar zu Infertilität, jedoch ist die Embryogenese und die postnatale Entwicklung bei mGPx4-Knockouttieren nicht eingeschränkt (Schneider et al., 2009). Aufgrund des frühen Absterbens in utero des homozygoten GPx4-Knockouts waren weitere Untersuchungsmöglichkeiten der biologischen Funktion der GPx4 in der Embryogenese nicht gegeben. Dahingehend ist eine GPx4-Knockoutmodell ex vivo entwickelt worden (Seiler et al., 2008). Bei diesem Modell konnte die Letalität der GPx4-defizienten Zellen durch eine Zugabe von lipophilen Antioxidantien, wie z.B. Vitamin E verhindert werden. Wasserlösliche Antioxidantien zeigten sich in der Prävention des Zelltodes beim

homozygotem GPx4-Knockoutmodell wirkungslos. Bemerkenswert zeigt sich, dass unter Einfluss von mehrfach ungesättigten Fettsäuren bei GPx4-defizienten Zellen der Zelltod induziert wird. Mehrfach konnte in der Literatur bereits gezeigt werden, dass die GPx4 einen regulativen Einfluss auf den Arachidonsäure–Stoffwechsel wahrnimmt. Insbesondere konnte *in vitro* ein regulierender Effekt der GPx4 auf die Aktivität der 5- (Weitzel und Wendel, 1993), 12- (Sutherland et al., 2001) und 15-Lipoxygenase (Schnurr et al., 1996) gezeigt werden.

#### 4.2.2 GPx4 überexprimierende Zellen

Anhand von Zellmodellen, die ein Enzym überexprimieren, können zudem auch veränderte Zelleigenschaften festgestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der GPx4 zu einer vermehrten Resistenz der Zelle gegenüber oxidativem Stress führt (Imai et al., 1996). Ebenfalls konnten protektive Effekte durch eine Überexpression der GPx4 am Gefäßendothel mit Abnahme von artherosklerotischen Veränderungen insbesondere der Zellnekrosen am Gefäßendothel nachgewiesen werden (Guo et al., 2008). Dennoch sind Zellen und deren mitochondriale Strukturen nicht durch die Expression der mGPx4 vor direkten Schäden durch bestimmte Substanzen (wie KCN) geschützt. (Arai et al., 1999).

In den vorliegenden Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der mGPx4 zu einer Abnahme des intrazellulären Peroxidgehaltes führt und die Zelle damit weniger oxidativem Stress ausgesetzt ist. Aufgrund der Abnahme der intrazellulären Stoffwechselfprodukte kann vermutet werden, dass eine vermehrte Expression der GPx4 auch mit einer Zunahme der Enzymaktivität einhergehen. In bisherigen Veröffentlichungen finden sich mehrere Beispiele von GPx4–überexprimierenden Zellmodellen, die eine Abnahme des intrazellulären Peroxidgehaltes zeigen. Anhand der Überexpression der GPx4 konnten regulative Einflüsse des Enzyms auf die Prostaglandin- (Sakamoto et al., 2000) und Leukotriensynthese (Imai et al., 1998) gezeigt werden. In beiden Untersuchungen scheint ein verminderter intrazellulärer Peroxidlevel die Aktivierung der entsprechenden Enzyme zur Biosynthese der Entzündungsmediatoren zu verhindern. Im Gegenzug konnten in einem humanen GPx4-Knockdownmodell einer Carcinomzelllinie eine Hochregulation der 12-Lipoxygenase- und Cyclooxygenase 1–Aktivität gemessen werden (Chen et al., 2003). Dabei führt die Abnahme der GPx4-Aktivität zu einem Anstieg der intrazellulären Lipidperoxid-Level. Ebenfalls ist bei Auslösen des Glutathion als Reduktionsäquivalent der GPx4 ein vermehrter Anfall von intrazellulären Lipidperoxide



durch eine vermehrte Aktivität von Cyclooxygenase und 12-Lipooxygenase zu verzeichnen (Chen et al., 2000).

### *Sekretoglobine im Zellmodell*

Anhand von Zellmodellen können einzelne Funktionen und Besonderheiten einzelner Zellen auf molekularbiologischer Ebene beobachtet werden. Aufgrund einer bislang unbekanntem physiologischen Funktion der Sekretoglobine studiert man das Vorkommen der sekretorischen Proteine in verschiedenen Zelllinien. Von besonderem Interesse sind dabei die Tumorzelllinien, da für einige Vertreter der Sekretoglobinfamilie eine mögliche Rolle als Tumormarker oder auch als Tumorsuppressorgen diskutiert wird.

#### 4.2.3 Sekretoglobine in der stabilen Transfektante

Zur weiteren Charakterisierung des Enzyms mGPx4 gehören mögliche regulatorische Einflüsse auf andere Gene einer Zelle. Mittels einer Microarray-Analyse konnten mögliche Effekte auf das Genexpressionsmuster einer Zelle, die die mGPx4 überexprimiert, demaskiert werden. In der Analyse zeigte sich, dass regulatorische Einflüsse durch die Überexpression der mGPx4 auf insgesamt 4% (630 Gene) der untersuchten Gene ausgeübt werden. Eine positive Regulation zeigen dabei 296 Gene mit einer mindestens zweifachen Hochregulation. Der stärkste regulatorische Effekt war für den Parameter Lipophilin B (30fach hochreguliert) ersichtlich. In der weiteren Analyse fiel ein weiteres Mitglied derselben Genfamilie, das Mammaglobin 1 mit einem positiv regulatorischen Effekt auf (5fach hochreguliert).

Bei Betrachtung dieser beiden Parameter war auffällig, dass eine physiologische Funktion bislang nicht bekannt ist. Jedoch waren beide Vertreter schon mehrfach Gegenstand von Untersuchungen in der Literatur. Das Protein Mammaglobin 1 ist vor allem als neuer Tumormarker für das Mammacarcinom beschrieben worden, den vor allem seine hohe Gewebespezifität kennzeichnet (Watson et al., 1999). Ein Nachweis für Mammaglobin 1 konnte auch in verschiedenen in verschiedenen Brustkrebs-Zelllinien erbracht werden (Watson und Fleming, 1996). In weiteren Untersuchungen ist versucht worden, die regulativen Einflüsse auf die Expression von Mammaglobin 1 zu beschreiben. Unter dem Einfluss von Zytokinen und anderen proinflammatorischen Mediatoren war die Expression von Mammaglobin 1 unverändert nachweisbar (Ballestrero et al., 2005). Ebenfalls war die Expression von Mammaglobin 1 in Östrogen-Rezeptor positiven Brustkrebszelllinien durch Östrogen nicht induzierbar (Watson et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von Mammaglobin 1 in einer epithelialen Brustkrebs-Zelllinie nachgewiesen werden auf mRNA-Ebene. Ergänzend schloss sich die Betrachtung der Expressionshöhe von Mammaglobin 1 in der mGPx4-überexprimierenden Transfektante der untersuchten Brustkrebs-Zelllinie an. Dabei war eine fünffach höhere Expression des Mammaglobin 1 im Vergleich zum Wildtyp auffällig. Weiterführend sind in der vorliegenden Arbeit neben dem Expressionsniveau von Mammaglobin 1 ebenfalls die Daten für Lipophilin B erhoben worden. Die Expression von Lipophilin B mRNA war in der mGPx4-überexprimierenden Transfektante ebenfalls deutlich erhöht. Verweisend auf die zuvor erhobenen Microarray-Daten zeigt auch an dieser Stelle für Lipophilin B einen stärkeren regulatorischen Effekt bei Überexpression der mGPx4 in der Zelle im Vergleich zu Mammaglobin 1. Neben regulatorischen Einflüssen auf die Expression der zwei Proteine, ist zudem auch das Expressionsmuster in weiteren Geweben von Interesse.

### **4.3 Ausgewählte Sekretoglobine im Ovarialcarcinom**

#### **4.3.1 Mammaglobin 1 und Lipophilin B in Ovarialcarcinomen**

In der vorliegenden Arbeit ist das Expressionsverhalten von Mammaglobin 1 und Lipophilin B in einem weiteren hormonabhängigen gynäkologischem Gewebe vor dem Hintergrund einer vermuteten Gewebespezifität von Mammaglobin 1 untersucht worden. Dabei ist die Expression von Mammaglobin 1 und 2, sowie Lipophilin B in ovariellen Geweben unterschiedlicher Dignität betrachtet worden. In der Auswertung der Ergebnisse ließ sich eine signifikant höhere Expression von Mammaglobin 1-mRNA in Ovarialvarcinomen gegenüber dem ovariellen Normalgewebe nachweisen. Eine Aussage zum Expressionsmuster des Mammaglobin 1 in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht getroffen werden. Eine Häufung von fehlender Expression oder höheren Expressionsleveln für einen histologischen Subtyp kann bedingt durch den geringen Stoffgruppenumfang nicht beobachtet werden. Der geringe Stoffgruppenumfang mit jeweils n=10 für Malignome und Normalgewebe des Ovars lässt eine generelle Aussage zu Verteilungsmustern und Schwerpunkten entsprechend der Histologie nicht zu. Jedoch läßt sich neben einer nachweisbaren Expression von Mammaglobin 1 im ovariellen Gewebe, zudem eine erhöhte Expression in Ovarialcarcinomen postulieren.

Bislang galt Mammaglobin 1 als gewebespezifisch für das adulte Brustgewebe und ist aufgrund dieser Gewebespezifität als ein möglicher Kandidat als Tumormarker für das

Mammacarcinom gehandelt worden (Sasaki et al., 2007). In verschiedenen Untersuchungen gelang zunächst in gynäkologischen Geweben kein Nachweis einer Expression von Mammaglobin 1 (Zach et al., 1999). Weitere Anforderungen an einen potentiellen Tumormarker konnten in der Bestimmung von Mammaglobin 1 durch eine hohe Sensitivität sowie eine angenommene Spezifität durch fehlenden Nachweis in anderen Geweben erfüllt werden (Bernstein et al., 2005).

Ergänzend zu den Untersuchungen zum Expressionsverhalten des Mammaglobin 1 ist zudem Lipophilin B in die Betrachtung miteinbezogen worden. Für den Parameter Lipophilin B konnte in der Auswertung der Untersuchung der ovariellen Gewebeproben ein ähnliches Bild entworfen werden. So ließ sich die Expression des Lipophilin B auf mRNA-Ebene bei nahezu allen untersuchten ovariellen Biopaten nachweisen. Dennoch zeigten sich kategorienabhängige Unterschiede in der Expressionshöhe. Lipophilin B zeigt in den untersuchten Proben bei den Ovarialcarcinomen signifikant höhere Expression als in den Normalgeweben. Anhand dieses Zusammenhangs ließe sich die These formulieren, dass die Höhe der exprimierten mRNA für Lipophilin B sich abhängig von der Dignität der Zellen gestaltet.

In einzelnen Veröffentlichungen konnte eine basale Expression von Mammaglobin und Lipophilin B-mRNA im Ovar nachgewiesen werden (Lehrer et al., 2000; Sjodin et al., 2003). Erstmals konnte unter Anwendung der Nested-RT-PCR-Methode die Expression von Mammaglobin 1 in gynäkologischen Geweben und Carcinomen gezeigt werden (Grunewald et al., 2002). Dabei konnte der Nachweis einer Mammaglobin 1-Expression in ovariellen Normalgewebe (97%) als auch im Ovarialcarcinom erbracht werden (95%). Kürzlich konnte in einer großen Studie die These verstärkt werden, dass sowohl Mammaglobin 1 als auch Lipophilin B in normalen und tumorveränderten gynäkologischen Geweben exprimiert wird (Zafrakas et al., 2006). Darüberhinaus konnte unter Anwendung von immunhistochemischer Methoden die Expression von Mammaglobin 1 in einem weiteren hormonabhängigen, gynäkologischen Gewebe, dem endometrialen Gewebe, sowie dem endometrioiden Adenocarcinom gezeigt werden (Classen-Linke et al., 2012). In vitro war eine Steigerung der mRNA-Expression von Mammaglobin 1 durch hormonelle Behandlung zu beobachten. Ähnliche Ergebnisse, die ebenfalls die Gewebespezifität von Mammaglobin 1 in Frage stellen, konnten mit Nachweis einer Expression von Mammaglobin 1 in normalem und maligne entartetem endometrialen Gewebe erbracht werden (Onuma et al., 2008). Weiterführend war die

Isolierung von Mammaglobin-mRNA in Serumproben von Ovarialcarcinompatienten in 25% der Proben möglich (Suchy et al., 2000). Auch der Nachweis des sekretorischen Proteins war in anderen Tumoren möglich. Inzwischen wird die Aussagekraft des Mammaglobin 1 als Tumormarker für das Mammacarcinom dahingehend modifiziert, dass Mammaglobin 1 zunehmend an Bedeutung als Biomarker für Metastasierungen beim Mammacarcinom gewinnt. Bei Untersuchungen von Lymphknoten im Rahmen von metastasierten Tumoren unterschiedlichen Ursprungs, konnte Mammaglobin 1 in 84% der Gewebeproben ausgehend von einem Mammacarcinom nachgewiesen werden. Wiederum in 15% der Metastasen bei Tumoren anderen Ursprungs gelang ebenso der Proteinnachweis für Mammaglobin 1 (Han et al., 2003). Ergänzend zu einem möglichen diagnostischen Wert von Mammaglobin 1 hinsichtlich eines Nachweises einer Metastasierung und Identifizierung von metastasierenden Carcinomzellen konnte Mammaglobin 1 im Serum mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) bei 72% der untersuchten Mammacarcinompatienten nachgewiesen werden (Bernstein et al., 2005).

#### 4.3.2 Mammaglobin 2 (Lipophilin C) im Ovarialcarcinom

Für den Parameter, der die höchste Strukturhomologie mit Mammaglobin 1 aufweist, ergibt sich ein verwandtes Expressionsmuster zu MG 1. In der Abbildung der Ergebnisse zu den Analysen des Ovarialgewebes zeigt sich eine deutliche Verschiebung des Expressionsniveaus zugunsten der malignen Vertreter aus der Probenmenge. Statistisch ist dabei von einer hohen Signifikanz mit  $p = 0,005$  für diesen Zusammenhang zu sprechen. Auch hier wäre eine Hochregulation der Expression auf mRNA-Ebene durch tumoröse Veränderung des Gewebes anzudenken. Insbesondere zeigt sich für diesen Parameter die meiste Hochregulation in der Expression durch die carcinomatöse Entartung des Gewebes. Die Expression von Mammaglobin 2 offenbart eine Expressionshöhe im Mittel für die Ovarialcarcinome, die um den Faktor 27 höher liegt im Vergleich zu den ovariellen Normalgeweben. Dabei ist jedoch der geringe Stoffgruppenumfang zu berücksichtigen, so dass nur eingeschränkt Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen zu ziehen sind. Analysen zur Expression von Mammaglobin 2 sind bereits für verschiedene abdominelle Gewebe und Carcinome untersucht worden (Aihara et al., 2000). In der Literatur gilt Mammaglobin 2 als hoffnungsvoller Kandidat als Tumormarker für das Ovarialcarcinom. Mehrfach ist bereits der Nachweis einer erhöhten Expression von Mammaglobin 2 in Ovarialcarcinomen gelungen. Neben Daten aus Microarrayanalysen, die eine Hochregulation des Mammaglobin 2-Gens in Ovarialcarcinomen dokumentieren (Hibbs et

al., 2004), konnte ebenfalls über die Bestimmung von mRNA-Level eine vergleichende Analyse erfolgen. Dabei ist die Hochregulation des Parameters insbesondere für seröspapilläre Ovarialcarcinome beschrieben (Bignotti et al., 2006). Kürzlich gelang der Nachweis einer Expression von Mammaglobin 2 in allen untersuchten Proben von epithelialen Ovarialcarcinomen. Im Vergleich zu den Expressionslevel der Normalgewebe war eine signifikant höhere Expression von Mammaglobin 2 in ovariellen Malignomen nachweisbar (Tassi et al., 2007). Im Vergleich zu Normalgeweben wird Mammaglobin 2 in serösen Adenocarcinomen, sowie omentalen Metastasen signifikant höher exprimiert (Adib et al., 2004).

#### 4.3.3 CA 125

In den vorliegenden Betrachtungen ist ergänzend für die ovariellen Gewebeproben zudem der Tumormarker CA125 im Serum der Patientinnen präoperativ bestimmt worden. In der statistischen Analyse der erhobenen Werte sind die CA125-Werte bei nachgewiesener Carcinomerkrankung signifikant höher gegenüber den erhobenen Werten der normalen ovariellen Gewebeproben.

Hinsichtlich der Sensitivität ist die Expressionshöhe von CA 125 im Ovarialcarcinom abhängig vom Stadium und vom histologischen Subtyp der Erkrankung des Ovarialcarcinoms. So zeigten in Stadium I der Erkrankung 50% der Patientinnen eine erhöhte Expression des CA 125 (>35 U/ml), während bei Progress des Tumorgeschehens bis zum Stadium IV erhöhte CA 125-Spiegel in annähernd 94% der Fälle detektierbar sind (Bast et al., 2002; Hartmann et al., 2005). An anderer Stelle war bei Patientinnen mit einem klinisch diagnostizierten serösen Ovarialcarcinom im Stadium I die Serumlevel des CA 125 bei 66% der erkrankten Patientinnen erhöht (van Haaften-Day et al., 2001).

Die Bestimmung des CA 125 gilt insbesondere in frühen Stadien der Erkrankung als wenig spezifisch und wenig sensitiv. Die Expression von CA 125 erfolgt in vielen Geweben des adulten Organismus, u.a. auch in gynäkologischen Geweben, z.B. Normalgewebe des Ovars (Nouwen et al., 1987). Neben einer fehlenden Gewebespezifität unterliegt die Expression von CA 125 vielen, z.T. auch physiologischen Einflussfaktoren. So können neben dem Alter (Bon et al., 1996), Schwangerschaft (besonders 1.Trimenon) (Gocze et al., 1988) und Menstruationszyklus (Bon et al., 1999) auch extragynäkologische Erkrankungen, u.a. extragynäkologische Tumore ursächlich für einen erhöhten CA 125-Wert im Serum sein (Devarbhavi et al., 2002),(Molina et al., 2003). Bezugnehmend auf die

vorliegenden Ergebnisse zeichnet sich ein deutlicher Unterschied in der Expressionshöhe des Tumormarkers CA125 zwischen malignen Gewebeproben und ovariellen Normalgewebe. Unter Berücksichtigung des Tumorstadiums, das für jede ovarielle Carcinomprobe dokumentiert wurde, sind mehrheitlich die Carcinomproben einem fortgeschrittenen Tumorstadium zuzuordnen. Daher sind in der Interpretation dieser eindeutigen statistischen Signifikanz der unterschiedlichen Expressionshöhen des CA 125 neben dem geringen Stoffgruppenumfang ebenfalls die fortgeschrittenen Tumorstadien zu berücksichtigen.

#### **4.4 Ausgewählte Sekretoglobine in humanen Geweben**

Für die Sekretoglobine sind spezifische Expressionsmuster in Geweben beschrieben worden, z.B. konnte eine Expression von Lymphoglobin nur in Milz und Lymphozyten gezeigt werden (Ni et al., 2000). Im Überblick der einzelnen Mitglieder zeigt sich, dass eine Expression vor allem in epithelialen Geweben mit sekretorischer Funktion nachzuweisen ist, wie z.B. Speicheldrüsen, männliche und weibliche Genitalorgane und Lungengewebe.

##### **4.4.1 Mammaglobin 1 in humanen Geweben**

Ursprünglich wurde Mammaglobin 1 aufgrund seiner Gewebespezifität als neuer Marker für Brustkrebs beschrieben. Neben einer basalen Expression in normalem Brustgewebe konnte eine erhöhte Expression des Mammaglobin 1 in Mammacarcinomen gezeigt werden. (Watson und Fleming, 1996) Die bisherigen Untersuchungen und Veröffentlichungen konzentrierten sich mehrheitlich auf die Beobachtung der Expression von Mammaglobin 1 in Zellen des Brustgewebes und des Mammacarcinoms. Neben den klassischen Untersuchungen, wie z.B. Untersuchung der Sentinel-Lymphknoten, Hormonrezeptorstatus, etc., die zur Diagnostik und Prognoseabschätzung des Mammacarcinoms dienen, wurden ebenfalls Analysen zur Expression von Mammaglobin 1 in anderen Geweben vorgenommen um eine Gewebespezifität postulieren zu können. Dabei konnte zunächst die gewebsspezifische Expression von Mammaglobin 1-mRNA gezeigt werden (Fleming und Watson, 2000). In weiteren Untersuchungen war die Expression von Mammaglobin 1-mRNA auch in anderen Geweben zu dokumentieren. Unter Anwendung der Methode der Nested-RT-PCR gelang der Nachweis von Mammaglobin 1 in allen gynäkologischen Geweben (Grunewald et al., 2002). Unter Berücksichtigung einer zunächst angenommenen Expression in hormonabhängigen

Gewebe konnte in einer weiteren Veröffentlichung gezeigt werden, dass in Prostata und testikulärem Gewebe ebenfalls Mammaglobin 1 exprimiert wird (Brown et al., 2005). In der gleichen Untersuchung war eine unerwartet hohe Expression von Mammaglobin 1 und Lipophilin B im Skelettmuskel gefunden worden. Ähnliche Ergebnisse sind an anderer Stelle mittels quantitativer Real-Time RT-PCR mit dem höchsten Expressionsniveau für Mammaglobin 1 in der Haut, gefolgt von Brustdrüsengewebe und Tränendrüse gezeigt worden. In derselben Veröffentlichung ist auf niedrigem basalen Niveau der Nachweis einer Expression auch in anderen humanen Geweben (Niere, Trachea, Ovar, Uterus) erbracht worden (Sjodin et al., 2003). In mehreren Untersuchungen konnte der Nachweis einer Expression von Mammaglobin und Lipophilin-mRNA in verschiedenen, auch extragenitalen Geweben gezeigt werden (Carter et al., 2002; Lehrer et al., 1998; O'Brien et al., 2002). Zusammenfassend ist eine Expression von Mammaglobin 1-mRNA in verschiedenen Geweben gezeigt worden, jedoch in Relation zu dem hohen Expressionslevel im Brustdrüsengewebe sind die Expressionsniveaus als niedrig einzuschätzen. In der vorliegenden Arbeit war es möglich, die Expression von Mammaglobin 1 auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Real-Time RT-PCR in verschiedenen humanen Geweben nachzuweisen. Für Proben von Fettgewebe, Cervix uteri und der Lunge war das höchste Expressionsniveau nachzuweisen. In den weiteren Geweben auch hormonabhängiger Organe war eine Expression auf niedrigem Niveau nachzuweisen. Im Vergleich zu bisherigen veröffentlichten Untersuchungen sind die Ergebnisse in dieser Arbeit ähnlich. Punktuell sind hohe Expressionen für einzelne Gewebe bemerkenswert. So war in unseren Untersuchungen eine hohe Expression von Mammaglobin 1 im Fettgewebe auffällig. In der Literatur sind sehr hohe Expressionslevel für Mammaglobin 1 in Zellen von Skelettmuskel (Brown et al., 2005) und der Cutis (Sjodin et al., 2003) gefunden worden.

In Zusammenschau der vorliegenden Ergebnisse und bisherigen Veröffentlichungen fallen hohe Expressionslevel von Mammaglobin 1 in Binde- und Stützgewebe auf. Diese unerwartete Häufung von hohen Expressionsniveaus von Mammaglobin 1 kann Ausgangspunkt für neue Betrachtungen zur Klärung der physiologischen Funktion des Proteins sein. Die physiologische Rolle von Mammaglobin 1 ist bisher ungeklärt. Neben einer hohen Expression in Brustdrüsengewebe ist eine Expression von Mammaglobin1-RNA in verschiedenen anderen Geweben gelungen. Die These einer möglichen Gewebespezifität des Parameters Mammaglobin 1, die eine Grundvoraussetzung für den

Einsatz als neuer diagnostischer Marker für das Mammacarcinom wäre, kann damit nicht aufrechtgehalten werden.

#### 4.4.2 Lipophilin B in humanen Geweben

In der vorliegenden Arbeit war für Lipophilin B eine Expression auf posttranskriptioneller Ebene in den Untersuchungen der humanen Gewebe nachweisbar. Die höchsten Expressionslevel zeigten sich für die Gewebe Lunge, Cervix uteri und Fettgewebe. Lipophilin B ist bekannt als ein weiteres Mitglied der Sekretoglobinfamilie und ist als sekretorisches Protein in der Tränenflüssigkeit nachgewiesen worden (Lehrer et al., 1998). Die gleiche Arbeitsgruppe konnte den Nachweis einer Expression von Lipophilin B mittels quantitativer RT-PCR in hormonabhängigen humanen Geweben zeigen (Lehrer et al., 2000). Besondere Bedeutung gewinnt der Aspekt einer höheren Expression von Lipophilin B in Brustgewebe im Vergleich zu anderen Geweben (Culleton et al., 2007). In derselben Untersuchung konnte eine signifikant höhere Expression von Lipophilin B-mRNA in Mammacarcinomen gegenüber dem Normalgewebe der Brust gezeigt werden. Anderenorts war Lipophilin B in verschiedenen humanen Geweben auf mRNA-Ebene nachweisbar (Zhao et al., 1999). Die vorliegenden Ergebnisse decken sich weitestgehend mit den Beobachtungen in der Literatur. So zeigt sich eine basale Expression von Lipophilin B in fast allen Organen und Geweben des humanen Organismus. Indes bleibt die physiologische Funktion des Proteins weiterhin unklar. Die weiteren Untersuchungen zu funktionellen Aspekten sollten im Komplex mit Mammaglobin 1 aufgrund deutlicher Hinweise auf ein ähnliches Expressionsverhalten beider Parameter erfolgen.

#### 4.4.3 Koexpression von Mammaglobin 1 und Lipophilin B

In der statistischen Auswertung der hier vorgestellten Ergebnisse der beiden Parameter fielen wesentliche Gemeinsamkeiten im Expressionsmuster von Mammaglobin 1 und Lipophilin B auf. So korrelieren die Ergebnisse beider Parameter mit einer statistischen Signifikanz. Zudem gleichen sich die Gewebe mit den höchsten Expressionsniveaus für Mammaglobin 1 und Lipophilin B: Cervix uteri, Lunge und Fettgewebe. Eine mögliche Koexpression von Mammaglobin 1 und Lipophilin B ist schon mehrfach Gegenstand des Interesses in der Literatur gewesen. Initial konnte gezeigt werden, dass beide Proteine als Heterodimer vorliegen (Colpitts et al., 2000). Eine Komplexbildung der zwei sekretorischen Proteine ist untersucht und beschrieben worden (Carter et al., 2002). An



anderer Stelle konnte ergänzend für Mammaglobin 1 und Lipophilin B der Nachweis in verschiedenen extragenitalen Geweben erbracht werden (Brown et al., 2005).

Die molekularen Mechanismen, die verantwortlich sind für die Koexpression von Genen sind bis dato nicht geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass benachbarte Gene mit ähnlichem Expressionsmuster zu einer Clusterbildung neigen (Michalak, 2008). Eine mögliche Erklärung für die Koexpression vor allem in Genclustern ist, dass sich benachbarte Gene regulatorische Elemente, wie z.B. Promotor oder Enhancer teilen (Trinklein et al., 2004). Der Anteil der humanen Gene wird auf >10% geschätzt, deren Transkriptionsstartorte innerhalb von 1000 Basenpaaren liegen. Die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit lassen sich in die Theorie einfügen. Mammaglobin 1 und Lipophilin B sind Vertreter der Sekretoglobinfamilie, die als Gencluster auf Chromosom 11 vorhanden ist. Dahingehend wäre die Koexpression beider Gene im Rahmen ihrer Zugehörigkeit zu einem Gencluster anzunehmen. Die molekularbiologischen Mechanismen, die dieser Koexpression zugrunde liegen, bleiben weiter unklar. Neben der Theorie eines gemeinsamen Promotors oder Enhancer, ist kürzlich die Theorie veröffentlicht worden, dass Chromatin-Domänen, die mehrere benachbarte Chromosomen eines Genclusters enthalten, durch eine Änderung der Konformation zu einer Expression der enthaltenen Gene führt (Hurst et al., 2004; Sproul et al., 2005).

#### 4.4.4 Mammaglobin 2 in humanen Geweben

In den vorliegenden Ergebnissen zur Expression von Mammaglobin 2 in humanen Geweben konnten hohe Expressionslevel in Proben der Cervix uteri und Lunge gezeigt werden. Für die Gewebe Herz, Milz und Trachea war Mammaglobin 2-mRNA nicht nachweisbar. Mammaglobin 2 ist als ein weiterer Vertreter der Sekretoglobinfamilie und auch als möglicher neuer biologischer Marker von gynäkologischen Tumoren beschrieben worden. So konnte eine erhöhte Expression in Carcinomen der Brust beschrieben werden. Im Überblick der humanen Gewebe konnte gezeigt werden, dass Mammaglobin 2 v.a. in hormonabhängigen und sekretorischen Geweben (Tränendrüse, Speicheldrüse) exprimiert wird (Becker et al., 1998). In den Untersuchungen zur Charakterisierung der Mitglieder der Sekretoglobinfamilie bestätigte sich der Nachweis einer Expression von MG-2 in hormonabhängigen und weiteren abdominalen Organen (Lehrer et al., 2000). Die vorliegenden Ergebnisse untermauern die publizierten Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen. Die Expression von Mammaglobin 2 findet in verschiedenen humanen Geweben statt und

scheint nicht auf einzelne Gewebe begrenzt zu sein. Ein Unterschied in der Expressionshöhe deutet sich zugunsten von steroidabhängigen Geweben an. So war in den hiesigen Ergebnissen das höchste Expressionsniveau im Uterus messbar. Andererseits zeigte sich eine basal niedrige Expression für das ovarielle Gewebe.

### *Perspektivische Betrachtungen*

In der vorliegenden Arbeit sind Expressionsmuster von Sekretoglobinen in Ovarialcarcinomzellen analysiert worden. Eine Zuordnung zu einer histologischen Entität war aufgrund des geringen Stoffgruppenumfangs der malignen Zellproben nicht möglich. In weiteren Untersuchungen kann bei erweitertem Probenumfang das Expressionsmuster in einzelnen histologischen Subtypen des Ovarialcarcinoms analysiert werden. Darüberhinaus sollte auch die Expression von Sekretoglobinen in metastatischen Zellen eines Ovarialcarcinoms Berücksichtigung finden. In den vorliegenden Beobachtungen zeigten zwei Proben metastatischen Gewebes bei einem Ovarialcarcinom als Primärtumor eine erhöhte Genexpression im Vergleich zum Normalgewebe.

Zum Verständnis und Beurteilung des diagnostischen Wertes einer Expression der Sekretoglobine in bestimmten Geweben ist das Wissen um die eigentliche biologische Funktion der sekretorischen Proteine unabdingbar. Bislang erfolgte eine Charakterisierung der Sekretoglobinfamilie über eine Gewebeverteilung und das Vorkommen in Pathologischer einzelner Proteine. Um diese Ergebnisse, insbesondere einer Überexpression der Sekretoglobine richtig bewerten zu können, sind Erkenntnisse über die physiologischen Funktionen der Sekretoglobinfamilie nötig.

Einzelne Sekretoglobine, u.a. Mammaglobin 1, stehen in der Diskussion als neue biologische Marker für bestimmte Tumoren. Um der Eigenschaft eines Tumormarkers gerecht werden zu können, ist ein Nachweis auf Proteinebene erforderlich. In der vorliegenden Arbeit konnten die Sekretoglobine auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit eines spezifischen Antikörpers. Ebenso wäre für die Aussagekraft eines diagnostischen Marker die Nachweisbarkeit im Serum von Patienten eine wichtige Voraussetzung. Dafür ist neben einer geeigneten und praktikablen Nachweismethode für das Protein auch die Spezifität des biologischen Markers für das entsprechende Carcinom unabdingbar.

## 5 Zusammenfassung

Die Glutathionperoxidase 4 (GPx4) ist ein katalytisch aktives Protein und gehört zur Familie der selenhaltigen Glutathionperoxidasen. Sie katalysiert die Reduktion von Peroxiden zu den entsprechenden Alkoholen unter Verwendung von Glutathion bzw. Proteinthiolen als Reduktionsäquivalente. Innerhalb der Glutathionperoxidasen nimmt die GPx4 eine Sonderstellung ein, da sie als einziger Vertreter dieser Enzymklasse die Fähigkeit besitzt, membrangebundene Phospholipidhydroperoxide zu reduzieren. Homozygote GPx4 Knockout Mäuse sind nicht lebensfähig (embryonale Letalität nach 5-6 Tagen), was auf eine Rolle des Enzyms in der Embryogenese hindeutet. Weiterhin erfüllt die GPx4 Funktionen beim antioxidativen Schutz, bei der Spermatogenese und der Apoptose. Bei Mäusen existiert neben dem GPx4 Gen ein exprimierbares Retrotransposon, das für eine funktionelle GPx4 kodiert. Damit könnte eine Hochregulation der Expression dieses Pseudogens eine Inaktivierung des paralogen Gens zumindest teilweise kompensieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb zunächst untersucht, ob die heterozygote Inaktivierung des GPx4 Gens *in vivo* die Expression des GPx4-Pseudogens beeinflusst. Dabei ergab sich, dass das Expressionsniveau des Pseudogens bei Wildtyp- und heterozygoten GPx4-Knockout Mäusen mit vergleichbarem genetischem Background nicht signifikant verändert war. Damit konnte eine Kompensationsfunktion des GPx4-Pseudogens nicht belegt werden. Um weitere Hinweise zur zellulären Funktion der GPx4 zu erhalten, wurde die mitochondriale Form der GPx4 (mGPx4) in einem *in vitro* Zellsystem stabil überexprimiert und das Genexpressionsprofil (Expressionsmicroarrays) der transfizierten Zellen mit dem entsprechender Kontrollzellen verglichen. Die Analyse ergab eine mindestens zweifache Hochregulation von 296 der untersuchten Gene (2%), sowie eine entsprechende Downregulation von 334 Genen (2,3%). Zu den am stärksten hochregulierten Genen zählten zwei Vertreter der Sekretoglobine: Lipophilin B (30-fach) und Mammaglobin 1 (5-fach).

Die biologischen Funktionen von Sekretoglobinen sind derzeit noch weitgehend unklar. Zwar wurde Mammaglobin 1 aufgrund seiner Expressionscharakteristik als diagnostischer Marker für das Mammacarcinom vorgeschlagen, ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Expression des Proteins und der Karzinogenese konnte bisher aber nicht hergestellt werden. Um die Eignung von Sekretoglobinen als diagnostische Marker beim Ovarialcarcinom zu testen, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit das Expressionsniveau von

Mammaglobin 1, Mammaglobin 2 und Lipohilin B in normalen und malignen Ovarialgeweben quantifiziert. Dabei war ein signifikant höheres Expressionsniveaus der Sekretoglobin-mRNAs beim Ovarialcarcinom nachweisbar. Trotz dieser Daten sollte die Eignung von Sekretoglobinen als diagnostische Marker bei gynäkologischen Malignomen jedoch kritisch gesehen werden, da diese Proteine auch in anderen Geweben (z.B. Lunge, Cervix uteri, Fettgewebe) auf ähnlich hohem Niveau exprimiert werden und das Expressionsniveau zudem vom Hormonstatus abhängt.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aarnio, M.; Sankila, R.; Pukkala, E.; Salovaara, R.; Aaltonen, L. A.; de la Chapelle, A.; Peltomaki, P.; Mecklin, J. P. und Jarvinen, H. J. (1999): Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes, *Int J Cancer* 81 [2], Seite 214-8.
- Adib, T. R.; Henderson, S.; Perrett, C.; Hewitt, D.; Bourmpoulia, D.; Ledermann, J. und Boshoff, C. (2004): Predicting biomarkers for ovarian cancer using gene-expression microarrays, *Br J Cancer* 90 [3], Seite 686-92.
- Aihara, T.; Fujiwara, Y.; Miyake, Y.; Okami, J.; Okada, Y.; Iwao, K.; Sugita, Y.; Tomita, N.; Sakon, M.; Shiozaki, H. und Monden, M. (2000): Mammaglobin B gene as a novel marker for lymph node micrometastasis in patients with abdominal cancers, *Cancer Lett* 150 [1], Seite 79-84.
- Aihara, T.; Fujiwara, Y.; Ooka, M.; Sakita, I.; Tamaki, Y. und Monden, M. (1999): Mammaglobin B as a novel marker for detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by reverse transcription-polymerase chain reaction, *Breast Cancer Res Treat* 58 [2], Seite 137-40.
- 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.
- 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.
- Austin, C. J.; Emberson, L. und Nicholls, P. (2004): Purification and characterization of pheromaxein, the porcine steroid-binding protein. A member of the secretoglobulin superfamily, *Eur J Biochem* 271 [13], Seite 2593-606.
- Baek, I. J.; Seo, D. S.; Yon, J. M.; Lee, S. R.; Jin, Y.; Nahm, S. S.; Jeong, J. H.; Choo, Y. K.; Kang, J. K.; Lee, B. J.; Yun, Y. W. und Nam, S. Y. (2007): Tissue expression and cellular localization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) mRNA in male mice, *J Mol Histol* 38 [3], Seite 237-44.
- Ballestrero, A.; Garuti, A.; Bertolotto, M.; Rocco, I.; Boy, D.; Nencioni, A.; Ottonello, L. und Patrone, F. (2005): Effect of different cytokines on mammaglobin and maspin gene expression in normal leukocytes: possible relevance to the assays for the detection of micrometastatic breast cancer, *Br J Cancer* 92 [10], Seite 1948-52.
- Bast, R. C., Jr. (2003): Status of tumor markers in ovarian cancer screening, *J Clin Oncol* 21 [10 Suppl], Seite 200s-205s.
- Bast, R. C., Jr.; Badgwell, D.; Lu, Z.; Marquez, R.; Rosen, D.; Liu, J.; Baggerly, K. A.; Atkinson, E. N.; Skates, S.; Zhang, Z.; Lokshin, A.; Menon, U.; Jacobs, I. und Lu, K. (2005): New tumor markers: CA125 and beyond, *Int J Gynecol Cancer* 15 Suppl 3, Seite 274-81.
- Bast, R. C., Jr.; Feeney, M.; Lazarus, H.; Nadler, L. M.; Colvin, R. B. und Knapp, R. C. (1981): Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma, *J Clin Invest* 68 [5], Seite 1331-7.

- Bast, R. C., Jr.; Urban, N.; Shridhar, V.; Smith, D.; Zhang, Z.; Skates, S.; Lu, K.; Liu, J.; Fishman, D. und Mills, G. (2002): Early detection of ovarian cancer: promise and reality, *Cancer Treat Res* 107, Seite 61-97.
- Becker, R. M.; Darrow, C.; Zimonjic, D. B.; Popescu, N. C.; Watson, M. A. und Fleming, T. P. (1998): Identification of mammaglobin B, a novel member of the uteroglobin gene family, *Genomics* 54 [1], Seite 70-8.
- Behne, D.; Hilmert, H.; Scheid, S.; Gessner, H. und Elger, W. (1988): Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins, *Biochim Biophys Acta* 966 [1], Seite 12-21.
- Bellingham, J.; Gregory-Evans, K.; Fox, M. F. und Gregory-Evans, C. Y. (2003): Gene structure and tissue expression of human selenoprotein W, SEPW1, and identification of a retroprocessed pseudogene, SEPW1P, *Biochim Biophys Acta* 1627 [2-3], Seite 140-6
- Bernstein, J. L.; Godbold, J. H.; Raptis, G.; Watson, M. A.; Levinson, B.; Aaronson, S. A. und Fleming, T. P. (2005): Identification of mammaglobin as a novel serum marker for breast cancer, *Clin Cancer Res* 11 [18], Seite 6528-35.
- Bignotti, E.; Tassi, R. A.; Calza, S.; Ravaggi, A.; Romani, C.; Rossi, E.; Falchetti, M.; Odicino, F. E.; Pecorelli, S. und Santin, A. D. (2006): Differential gene expression profiles between tumor biopsies and short-term primary cultures of ovarian serous carcinomas: Identification of novel molecular biomarkers for early diagnosis and therapy, *Gynecol Oncol*.
- Boger, E. T.; Sellers, J. R. und Friedman, T. B. (2001): Human myosin XVBP is a transcribed pseudogene, *J Muscle Res Cell Motil* 22 [5], Seite 477-83.
- Bon, G. G.; Kenemans, P.; Dekker, J. J.; Hompes, P. G.; Verstraeten, R. A.; van Kamp, G. J. und Schoemaker, J. (1999): Fluctuations in CA 125 and CA 15-3 serum concentrations during spontaneous ovulatory cycles, *Hum Reprod* 14 [2], Seite 566-70.
- Bon, G. G.; Kenemans, P.; Verstraeten, R.; van Kamp, G. J. und Hilgers, J. (1996): Serum tumor marker immunoassays in gynecologic oncology: establishment of reference values, *Am J Obstet Gynecol* 174 [1 Pt 1], Seite 107-14.
- Bon, G. G.; Verheijen, R. H.; Zuetenhorst, J. M.; van Kamp, G. J.; Verstraeten, A. A. und Kenemans, P. (1996): Mucin-like carcinoma-associated antigen serum levels in patients with adenocarcinomas originating from ovary, breast and colon, *Gynecol Obstet Invest* 42 [1], Seite 58-62.
- Borchert, A.; Wang, C. C.; Ufer, C.; Schiebel, H.; Savaskan, N. E. und Kuhn, H. (2006): The role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase isoforms in murine embryogenesis, *J Biol Chem* 281 [28], Seite 19655-64.
- 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.
- Bostrom, J.; Cobbers, J. M.; Wolter, M.; Tabatabai, G.; Weber, R. G.; Lichter, P.; Collins, V. P. und Reifenberger, G. (1998): Mutation of the PTEN (MMAC1) tumor suppressor gene in a subset of glioblastomas but not in meningiomas with loss of chromosome arm 10q, *Cancer Res* 58 [1], Seite 29-33.
- Boyce, E. A. und Kohn, E. C. (2005): Ovarian cancer in the proteomics era: diagnosis, prognosis, and therapeutics targets, *Int J Gynecol Cancer* 15 Suppl 3, Seite 266-73.

- Bristow, J.; Gitelman, S. E.; Tee, M. K.; Staels, B. und Miller, W. L. (1993): Abundant adrenal-specific transcription of the human P450c21A "pseudogene", *J Biol Chem* 268 [17], Seite 12919-24.
- Bristow, R. E. und Karlan, B. Y. (1996): Ovulation induction, infertility, and ovarian cancer risk, *Fertil Steril* 66 [4], Seite 499-507.
- Brosius, J. (1999): RNAs from all categories generate retrosequences that may be exapted as novel genes or regulatory elements, *Gene* 238 [1], Seite 115-34.
- Brown, N. M.; Stenzel, T. T.; Friedman, P. N.; Henslee, J.; Huper, G. und Marks, J. R. (2005): Evaluation of expression based markers for the detection of breast cancer cells, *Breast Cancer Res Treat*, Seite 1-7.
- Carlsson, L. M.; Jonsson, J.; Edlund, T. und Marklund, S. L. (1995): Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 [14], Seite 6264-8.
- Carter, D.; Dillon, D. C.; Reynolds, L. D.; Retter, M. W.; Fanger, G.; Molesh, D. A.; Sleath, P. R.; McNeill, P. D.; Vedvick, T. S.; Reed, S. G.; Persing, D. H. und Houghton, R. L. (2003): Serum antibodies to lipophilin B detected in late stage breast cancer patients, *Clin Cancer Res* 9 [2], Seite 749-54.
- Carter, D.; Douglass, J. F.; Cornellison, C. D.; Retter, M. W.; Johnson, J. C.; Bennington, A. A.; Fleming, T. P.; Reed, S. G.; Houghton, R. L.; Diamond, D. L. und Vedvick, T. S. (2002): Purification and characterization of the mammaglobin/lipophilin B complex, a promising diagnostic marker for breast cancer, *Biochemistry* 41 [21], Seite 6714-22.
- Cejas, P.; Garcia-Cabezas, M. A.; Casado, E.; Belda-Iniesta, C.; De Castro, J.; Fresno, J. A.; Sereno, M.; Barriuso, J.; Espinosa, E.; Zamora, P.; Feliu, J.; Redondo, A.; Hardisson, D. A.; Renart, J. und Gonzalez-Baron, M. (2007): Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) expression is downregulated in poorly differentiated breast invasive ductal carcinoma, *Free Radic Res* 41 [6], Seite 681-7.
- Cerveira, N.; Torres, L.; Rocha, P.; Bizarro, S.; Pereira, D.; Abreu, J.; Henrique, R.; Teixeira, M. R. und Castedo, S. (2004): Highly sensitive detection of the MGB1 transcript (mammaglobin) in the peripheral blood of breast cancer patients, *Int J Cancer* 108 [4], Seite 592-5.
- Chatterjee, S. K. und Zetter, B. R. (2005): Cancer biomarkers: knowing the present and predicting the future, *Future Oncol* 1 [1], Seite 37-50.
- Chen, C. J.; Huang, H. S. und Chang, W. C. (2003): Depletion of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase up-regulates arachidonate metabolism by 12S-lipoxygenase and cyclooxygenase 1 in human epidermoid carcinoma A431 cells, *Faseb J* 17 [12], Seite 1694-6.
- 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.
- Chinopoulos, C.; Tretter, L. und Adam-Vizi, V. (1999): Depolarization of in situ mitochondria due to hydrogen peroxide-induced oxidative stress in nerve terminals: inhibition of alpha-ketoglutarate dehydrogenase, *J Neurochem* 73 [1], Seite 220-8.
- Christie, M. und Oehler, M. K. (2006): Molecular pathology of epithelial ovarian cancer, *J Br Menopause Soc* 12 [2], Seite 57-63.

- Chu, F. F.; Doroshow, 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.
- Chu, F. F.; Esworthy, R. S. und Burmeister, M. (1996): The mouse glutathione peroxidase Gpx2 gene maps to chromosome 12; its pseudogene Gpx2-ps maps to chromosome 7, *Genomics* 33 [3], Seite 516-8.
- Clarke-Pearson, D. L. (2009): Clinical practice. Screening for ovarian cancer, *N Engl J Med* 361 [2], Seite 170-7.
- Classen-Linke, I.; Moss, S.; Gröting, K.; Beier, H. M.; Alfer J. und Krusche C.A. (2012): Mammaglobin 1: not only a breast-specific and tumor-specific marker, but also a hormone-responsive endometrial protein, *Histopathology* 2012, Seite 1-12.
- Colpitts, T. L.; Billing, P.; Granados, E.; Hodges, S.; Menhart, N.; Russell, J. und Stroupe, S. (2000): Mammaglobin complexes with BU101 in breast tissue, *Ann N Y Acad Sci* 923, Seite 312-5.
- Conrad, M.; Moreno, S. G.; Sinowatz, F.; Ursini, F.; Kolle, 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.
- Culleton, J.; O'Brien, N.; Ryan, B. M.; Hill, A. D.; McDermott, E.; O'Higgins, N. und Duffy, M. J. (2007): Lipophilin B: A gene preferentially expressed in breast tissue and upregulated in breast cancer, *Int J Cancer* 120 [5], Seite 1087-92.
- Dabkowski, E. R.; Williamson, C. L. und Hollander, J. M. (2008): Mitochondria-specific transgenic overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPx4) attenuates ischemia/reperfusion-associated cardiac dysfunction, *Free Radic Biol Med* 45 [6], Seite 855-65.
- Denkert, C.; Kobel, M.; Pest, S.; Koch, I.; Berger, S.; Schwabe, M.; Siegert, A.; Reles, A.; Klosterhalfen, B. und Hauptmann, S. (2002): Expression of cyclooxygenase 2 is an independent prognostic factor in human ovarian carcinoma, *Am J Pathol* 160 [3], Seite 893-903.
- Devarbhavi, H.; Kaese, D.; Williams, A. W.; Rakela, J.; Klee, G. G. und Kamath, P. S. (2002): Cancer antigen 125 in patients with chronic liver disease, *Mayo Clin Proc* 77 [6], Seite 538-41.
- Dhanireddy, R.; Kikukawa, T. und Mukherjee, A. B. (1988): Detection of a rabbit uteroglobin-like protein in human neonatal tracheobronchial washings, *Biochem Biophys Res Commun* 152 [3], Seite 1447-54.
- Diaconu, M.; Tangat, Y.; Bohm, D.; Kuhn, H.; Michelmann, H. W.; Schreiber, G.; Haidl, G.; Glander, H. J.; Engel, W. und Nayernia, K. (2006): Failure of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase expression in oligoasthenozoospermia and mutations in the PHGPx gene, *Andrologia* 38 [4], Seite 152-7.
- Diamandis, E. P.; Scorilas, A.; Fracchioli, S.; Van Gramberen, M.; De Bruijn, H.; Henrik, A.; Soosaipillai, A.; Grass, L.; Yousef, G. M.; Stenman, U. H.; Massobrio, M.; Van Der Zee, A. G.; Vergote, I. und Katsaros, D. (2003): Human kallikrein 6 (hK6): a new potential serum biomarker for diagnosis and prognosis of ovarian carcinoma, *J Clin Oncol* 21 [6], Seite 1035-43.
- Diamandis, E. P.; Yousef, G. M.; Soosaipillai, A. R. und Bunting, P. (2000): Human kallikrein 6 (zyme/protease M/neurosin): a new serum biomarker of ovarian carcinoma, *Clin Biochem* 33 [7], Seite 579-83.



- Easton, D. F.; Bishop, D. T.; Ford, D. und Crockford, G. P. (1993): Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium, *Am J Hum Genet* 52 [4], Seite 678-701.
- Edgar, A. J. (2002): The human L-threonine 3-dehydrogenase gene is an expressed pseudogene, *BMC Genet* 3, Seite 18.
- Edwards, M. G.; Anderson, R. M.; Yuan, M.; Kendzioriski, C. M.; Weindruch, R. und Prolla, T. A. (2007): Gene expression profiling of aging reveals activation of a p53-mediated transcriptional program, *BMC Genomics* 8, Seite 80.
- Emerson, J. J.; Kaessmann, H.; Betran, E. und Long, M. (2004): Extensive gene traffic on the mammalian X chromosome, *Science* 303 [5657], Seite 537-40.
- Emes, R. D.; Riley, M. C.; Laukaitis, C. M.; Goodstadt, L.; Karn, R. C. und Ponting, C. P. (2004): Comparative evolutionary genomics of androgen-binding protein genes, *Genome Res* 14 [8], Seite 1516-29.
- Engels, F. und Nijkamp, F. P. (1998): Pharmacological inhibition of leukotriene actions, *Pharm World Sci* 20 [2], Seite 60-5.
- Esnault, C.; Maestre, J. und Heidmann, T. (2000): Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes, *Nat Genet* 24 [4], Seite 363-7.
- Esworthy, R. S.; Aranda, R.; Martin, M. G.; Doroshov, J. H.; Binder, S. W. und Chu, F. F. (2001): Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281 [3], Seite G848-55.
- Fleming, I. D.; Phillips, J. L.; Menck, H. R.; Murphy, G. P. und Winchester, D. P. (1997): The National Cancer Data Base report on recent hospital cancer program progress toward complete American Joint Committee on Cancer/TNM staging, *Cancer* 80 [12], Seite 2305-10.
- Fleming, T. P. und Watson, M. A. (2000): Mammaglobin, a breast-specific gene, and its utility as a marker for breast cancer, *Ann N Y Acad Sci* 923, Seite 78-89.
- Frank, T. S.; Manley, S. A.; Olopade, O. I.; Cummings, S.; Garber, J. E.; Bernhardt, B.; Antman, K.; Russo, D.; Wood, M. E.; Mullineau, L.; Isaacs, C.; Peshkin, B.; Buys, S.; Venne, V.; Rowley, P. T.; Loader, S.; Offit, K.; Robson, M.; Hampel, H.; Brener, D.; Winer, E. P.; Clark, S.; Weber, B.; Strong, L. C.; Thomas, A. und et al. (1998): Sequence analysis of BRCA1 and BRCA2: correlation of mutations with family history and ovarian cancer risk, *J Clin Oncol* 16 [7], Seite 2417-25.
- Fsihi, H.; De Rossi, E.; Salazar, L.; Cantoni, R.; Labo, M.; Riccardi, G.; Takiff, H. E.; Eiglmeier, K.; Bergh, S. und Cole, S. T. (1996): Gene arrangement and organization in a approximately 76 kb fragment encompassing the oriC region of the chromosome of *Mycobacterium leprae*, *Microbiology* 142 ( Pt 11), Seite 3147-61.
- Fujii, G. H.; Morimoto, A. M.; Berson, A. E. und Bolen, J. B. (1999): Transcriptional analysis of the PTEN/MMAC1 pseudogene, psiPTEN, *Oncogene* 18 [9], Seite 1765-9.
- Gal, S.; Fidler, C.; Lo, Y. M.; Chin, K.; Moore, J.; Harris, A. L. und Wainscoat, J. S. (2001): Detection of mammaglobin mRNA in the plasma of breast cancer patients, *Ann N Y Acad Sci* 945, Seite 192-4.

- Garry, M. R.; Kavanagh, T. J.; Faustman, E. M.; Sidhu, J. S.; Liao, R.; Ware, C.; Vliet, P. A. und Deeb, S. S. (2008): Sensitivity of mouse lung fibroblasts heterozygous for GPx4 to oxidative stress, *Free Radic Biol Med* 44 [6], Seite 1075-87.
- Glusman, G.; Yanai, I.; Rubin, I. und Lancet, D. (2001): The complete human olfactory subgenome, *Genome Res* 11 [5], Seite 685-702.
- Gocze, P. M.; Szabo, D. G.; Than, G. N.; Csaba, I. F. und Krommer, K. F. (1988): Occurrence of CA 125 and CA 19-9 tumor-associated antigens in sera of patients with gynecologic, trophoblastic, and colorectal tumors, *Gynecol Obstet Invest* 25 [4], Seite 268-72.
- 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.
- Goncalves, I.; Duret, L. und Mouchiroud, D. (2000): Nature and structure of human genes that generate retropseudogenes, *Genome Res* 10 [5], Seite 672-8.
- Gross, T. P. und Schlesselman, J. J. (1994): The estimated effect of oral contraceptive use on the cumulative risk of epithelial ovarian cancer, *Obstet Gynecol* 83 [3], Seite 419-24.
- Grunewald, K.; Haun, M.; Fiegl, M.; Urbanek, M.; Muller-Holzner, E.; Massoner, A.; Riha, K.; Propst, A.; Marth, C. und Gastl, G. (2002): Mammaglobin expression in gynecologic malignancies and malignant effusions detected by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction, *Lab Invest* 82 [9], Seite 1147-53.
- Guo, N.; Mogue, T.; Weremowicz, S.; Morton, C. C. und Sastry, K. N. (1998): The human ortholog of rhesus mannose-binding protein-A gene is an expressed pseudogene that localizes to chromosome 10, *Mamm Genome* 9 [3], Seite 246-9.
- Guo, Z.; Ran, Q.; Roberts, L. J., 2nd; Zhou, L.; Richardson, A.; Sharan, C.; Wu, D. und Yang, H. (2008): Suppression of atherosclerosis by overexpression of glutathione peroxidase-4 in apolipoprotein E-deficient mice, *Free Radic Biol Med* 44 [3], Seite 343-52.
- Han, J. H.; Kang, Y.; Shin, H. C.; Kim, H. S.; Kang, Y. M.; Kim, Y. B. und Oh, S. Y. (2003): Mammaglobin expression in lymph nodes is an important marker of metastatic breast carcinoma, *Arch Pathol Lab Med* 127 [10], Seite 1330-4.
- Hankinson, S. E.; Colditz, G. A.; Hunter, D. J.; Willett, W. C.; Stampfer, M. J.; Rosner, B.; Hennekens, C. H. und Speizer, F. E. (1995): A prospective study of reproductive factors and risk of epithelial ovarian cancer, *Cancer* 76 [2], Seite 284-90.
- Harris, S.; Barrie, P. A.; Weiss, M. L. und Jeffreys, A. J. (1984): The primate psi beta 1 gene. An ancient beta-globin pseudogene, *J Mol Biol* 180 [4], Seite 785-801.
- Harrison, P.; Kumar, A.; Lan, N.; Echols, N.; Snyder, M. und Gerstein, M. (2002): A small reservoir of disabled ORFs in the yeast genome and its implications for the dynamics of proteome evolution, *J Mol Biol* 316 [3], Seite 409-19.
- Harrison, P. M. und Gerstein, M. (2002): Studying genomes through the aeons: protein families, pseudogenes and proteome evolution, *J Mol Biol* 318 [5], Seite 1155-74.

- Harrison, P. M.; Hegyi, H.; Balasubramanian, S.; Luscombe, N. M.; Bertone, P.; Echols, N.; Johnson, T. und Gerstein, M. (2002): Molecular fossils in the human genome: identification and analysis of the pseudogenes in chromosomes 21 and 22, *Genome Res* 12 [2], Seite 272-80.
- Harrison, P. M.; Zheng, D.; Zhang, Z.; Carriero, N. und Gerstein, M. (2005): Transcribed processed pseudogenes in the human genome: an intermediate form of expressed retrosequence lacking protein-coding ability, *Nucleic Acids Res* 33 [8], Seite 2374-83.
- Hartmann, L. C.; Lu, K. H.; Linette, G. P.; Cliby, W. A.; Kalli, K. R.; Gershenson, D.; Bast, R. C.; Stec, J.; Iartchouk, N.; Smith, D. I.; Ross, J. S.; Hoersch, S.; Shridhar, V.; Lillie, J.; Kaufmann, S. H.; Clark, E. A. und Damokosh, A. I. (2005): Gene expression profiles predict early relapse in ovarian cancer after platinum-paclitaxel chemotherapy, *Clin Cancer Res* 11 [6], Seite 2149-55.
- Haurand, M. und Flohe, L. (1988): Kinetic studies on arachidonate 5-lipoxygenase from rat basophilic leukemia cells, *Biol Chem Hoppe Seyler* 369 [2], Seite 133-42.
- Heintz, A. P.; Odicino, F.; Maisonneuve, P.; Quinn, M. A.; Benedet, J. L.; Creasman, W. T.; Ngan, H. Y.; Pecorelli, S. und Beller, U. (2006): Carcinoma of the ovary. FIGO 6th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer, *Int J Gynaecol Obstet* 95 Suppl 1, Seite S161-92.
- Hibbs, K.; Skubitz, K. M.; Pambuccian, S. E.; Casey, R. C.; Burleson, K. M.; Oegema, T. R., Jr.; Thiele, J. J.; Grindle, S. M.; Bliss, R. L. und Skubitz, A. P. (2004): Differential gene expression in ovarian carcinoma: identification of potential biomarkers, *Am J Pathol* 165 [2], Seite 397-414.
- Hirotsune, S.; Yoshida, N.; Chen, A.; Garrett, L.; Sugiyama, F.; Takahashi, S.; Yagami, K.; Wynshaw-Boris, A. und Yoshiki, A. (2003): An expressed pseudogene regulates the messenger-RNA stability of its homologous coding gene, *Nature* 423 [6935], Seite 91-6.
- 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.
- Hollis, G. F.; Hieter, P. A.; McBride, O. W.; Swan, D. und Leder, P. (1982): Processed genes: a dispersed human immunoglobulin gene bearing evidence of RNA-type processing, *Nature* 296 [5855], Seite 321-5.
- Holschneider, C. H. und Berek, J. S. (2000): Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors, *Semin Surg Oncol* 19 [1], Seite 3-10.
- Houghton, R. L.; Dillon, D. C.; Molesh, D. A.; Zehentner, B. K.; Xu, J.; Jiang, J.; Schmidt, C.; Frudakis, A.; Repasky, E.; Maltez Filho, A.; Nolasco, M.; Badaro, R.; Zhang, X.; Roche, P. C.; Persing, D. H. und Reed, S. G. (2001): Transcriptional complementarity in breast cancer: application to detection of circulating tumor cells, *Mol Diagn* 6 [2], Seite 79-91.
- 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.
- Hurst, L. D.; Pal, C. und Lercher, M. J. (2004): The evolutionary dynamics of eukaryotic gene order, *Nat Rev Genet* 5 [4], Seite 299-310.
- 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.

- Hwang, S. L.; Chang, J. H.; Cheng, C. Y.; Howng, S. L.; Sy, W. D.; Lieu, A. S.; Lin, C. L.; Lee, K. S. und Hong, Y. R. (2005): The expression of *rac1* pseudogene in human tissues and in human brain tumors, *Eur Surg Res* 37 [2], Seite 100-4.
- 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.
- 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.
- 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.
- Imai, H.; Sumi, D.; Hanamoto, A.; Arai, M. und Sugiyama, A. (1995): Molecular cloning and functional expression of a cDNA for rat phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: 3'-untranslated region of the gene is necessary for functional expression, *J Biochem* 118 [5], Seite 1061-7.
- 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.
- 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.
- Jacobs, I. und Bast, R. C., Jr. (1989): The CA 125 tumour-associated antigen: a review of the literature, *Hum Reprod* 4 [1], Seite 1-12.
- Jacq, C.; Miller, J. R. und Brownlee, G. G. (1977): A pseudogene structure in 5S DNA of *Xenopus laevis*, *Cell* 12 [1], Seite 109-20.
- Jemal, A.; Siegel, R.; Ward, E.; Hao, Y.; Xu, J. und Thun, M. J. (2009): Cancer statistics, 2009, *CA Cancer J Clin* 59 [4], Seite 225-49.
- Jemal, A.; Siegel, R.; Ward, E.; Murray, T.; Xu, J. und Thun, M. J. (2007): Cancer statistics, 2007, *CA Cancer J Clin* 57 [1], Seite 43-66.
- Kandouz, M.; Bier, A.; Carystinos, G. D.; Alaoui-Jamali, M. A. und Batist, G. (2004): Connexin43 pseudogene is expressed in tumor cells and inhibits growth, *Oncogene* 23 [27], Seite 4763-70.
- Kazazian, H. H., Jr. und Moran, J. V. (1998): The impact of L1 retrotransposons on the human genome, *Nat Genet* 19 [1], Seite 19-24.
- Kelner, M. J. und Montoya, M. A. (1998): Structural organization of the human selenium-dependent phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene (GPX4): chromosomal localization to 19p13.3, *Biochem Biophys Res Commun* 249 [1], Seite 53-5.

- Kim, J. H.; Skates, S. J.; Uede, T.; Wong, K. K.; Schorge, J. O.; Feltmate, C. M.; Berkowitz, R. S.; Cramer, D. W. und Mok, S. C. (2002): Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer, *Jama* 287 [13], Seite 1671-9.
- Kimura, E. T.; Nikiforova, M. N.; Zhu, Z.; Knauf, J. A.; Nikiforov, Y. E. und Fagin, J. A. (2003): High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma, *Cancer Res* 63 [7], Seite 1454-7.
- 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.
- Kobel, M.; Kalloger, S. E.; Boyd, N.; McKinney, S.; Mehl, E.; Palmer, C.; Leung, S.; Bowen, N. J.; Ionescu, D. N.; Rajput, A.; Prentice, L. M.; Miller, D.; Santos, J.; Swenerton, K.; Gilks, C. B. und Huntsman, D. (2008): Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies, *PLoS Med* 5 [12], Seite e232.
- Korneev, S. A.; Park, J. H. und O'Shea, M. (1999): Neuronal expression of neural nitric oxide synthase (nNOS) protein is suppressed by an antisense RNA transcribed from an NOS pseudogene, *J Neurosci* 19 [18], Seite 7711-20.
- Krishnan, R. S. und Daniel, J. C., Jr. (1967): "Blastokinin": inducer and regulator of blastocyst development in the rabbit uterus, *Science* 158 [800], Seite 490-2.
- Kriska, T.; Korytowski, W. und Girotti, A. W. (2002): Hyperresistance to photosensitized lipid peroxidation and apoptotic killing in 5-aminolevulinic acid-treated tumor cells overexpressing mitochondrial GPX4, *Free Radic Biol Med* 33 [10], Seite 1389-402.
- Kugler, M. C.; Gerhard, M.; Schnelzer, A.; Borzym, K.; Reinhardt, R.; Schmitt, M. und Lengyel, E. (2004): Isolation and characterization of Rac1 pseudogenes (psi1Rac1-psi4Rac1) in the human genome, *Gene* 341, Seite 189-97.
- Lee, J. T. (2003): Molecular biology: Complicity of gene and pseudogene, *Nature* 423 [6935], Seite 26-8.
- Lee, M. G.; Lewis, S. A.; Wilde, C. D. und Cowan, N. J. (1983): Evolutionary history of a multigene family: an expressed human beta-tubulin gene and three processed pseudogenes, *Cell* 33 [2], Seite 477-87.
- Lee, Y. C.; Zhang, Z. und Mukherjee, A. B. (2006): Mice lacking uteroglobin are highly susceptible to developing pulmonary fibrosis, *FEBS Lett* 580 [18], Seite 4515-20.
- Lehrer, R. I.; Nguyen, T.; Zhao, C.; Ha, C. X. und Glasgow, B. J. (2000): Secretory lipophilins: a tale of two species, *Ann N Y Acad Sci* 923, Seite 59-67.
- Lehrer, R. I.; Xu, G.; Abduragimov, A.; Dinh, N. N.; Qu, X. D.; Martin, D. und Glasgow, B. J. (1998): Lipophilin, a novel heterodimeric protein of human tears, *FEBS Lett* 432 [3], Seite 163-7.
- Lei, X. G.; Ross, D. A.; Parks, J. E. und Combs, G. F., Jr. (1997): Effects of dietary selenium and vitamin E concentrations on phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase expression in reproductive tissues of pubertal maturing male rats, *Biol Trace Elem Res* 59 [1-3], Seite 195-206.

- Leygue, E.; Snell, L.; Dotzlaw, H.; Hole, K.; Troup, S.; Hiller-Hitchcock, T.; Murphy, L. C. und Watson, P. H. (1999): Mammaglobin, a potential marker of breast cancer nodal metastasis, *J Pathol* 189 [1], Seite 28-33.
- Li, Y.; Huang, T. T.; Carlson, E. J.; Melov, S.; Ursell, P. C.; Olson, J. L.; Noble, L. J.; Yoshimura, M. P.; Berger, C.; Chan, P. H.; Wallace, D. C. und Epstein, C. J. (1995): Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase, *Nat Genet* 11 [4], Seite 376-81.
- Liang, H.; Van Remmen, H.; Frohlich, V.; Lechleiter, J.; Richardson, A. und Ran, Q. (2007): Gpx4 protects mitochondrial ATP generation against oxidative damage, *Biochem Biophys Res Commun* 356 [4], Seite 893-8.
- Lin, Y. C.; Wu Chou, Y. H.; Liao, I. C. und Cheng, A. J. (2003): The expression of mammaglobin mRNA in peripheral blood of metastatic breast cancer patients as an adjunct to serum tumor markers, *Cancer Lett* 191 [1], Seite 93-9.
- Liu, J.; Du, J.; Zhang, Y.; Sun, W.; Smith, B. J.; Oberley, L. W. und Cullen, J. J. (2006): Suppression of the malignant phenotype in pancreatic cancer by overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, *Hum Gene Ther* 17 [1], Seite 105-16.
- Loguercio, L. L. und Wilkins, T. A. (1998): Structural analysis of a hmg-coA-reductase pseudogene: insights into evolutionary processes affecting the hmgr gene family in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.), *Curr Genet* 34 [4], Seite 241-9.
- Luo, L. Y.; Bunting, P.; Scorilas, A. und Diamandis, E. P. (2001): Human kallikrein 10: a novel tumor marker for ovarian carcinoma?, *Clin Chim Acta* 306 [1-2], Seite 111-8.
- Lynch, H. T.; Casey, M. J.; Lynch, J.; White, T. E. und Godwin, A. K. (1998): Genetics and ovarian carcinoma, *Semin Oncol* 25 [3], Seite 265-80.
- Lynch, H. T.; Watson, P.; Lynch, J. F.; Conway, T. A. und Feli, M. (1993): Hereditary ovarian cancer. Heterogeneity in age at onset, *Cancer* 71 [2 Suppl], Seite 573-81.
- Maddipati, K. R. und Marnett, L. J. (1987): Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. Purification and properties of a selenium-dependent glutathione peroxidase, *J Biol Chem* 262 [36], Seite 17398-403.
- Maiorino, M.; Scapin, M.; Ursini, F.; Biasolo, M.; Bosello, V. und Flohe, L. (2003): Distinct promoters determine alternative transcription of gpx-4 into phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase variants, *J Biol Chem* 278 [36], Seite 34286-90.
- 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.
- Manzotti, M.; Dell'Orto, P.; Maisonneuve, P.; Zurrada, S.; Mazzarol, G. und Viale, G. (2001): Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for multiple mRNA markers in the detection of breast cancer metastases in sentinel lymph nodes, *Int J Cancer* 95 [5], Seite 307-12.
- Marchetti, A.; Buttitta, F.; Bertacca, G.; Zavaglia, K.; Bevilacqua, G.; Angelucci, D.; Viacava, P.; Naccarato, A.; Bonadio, A.; Barassi, F.; Felicioni, L.; Salvatore, S. und Mucilli, F. (2001): mRNA markers of breast cancer nodal metastases: comparison between mammaglobin and carcinoembryonic antigen in 248 patients, *J Pathol* 195 [2], Seite 186-90.

- Marques, A. C.; Dupanloup, I.; Vinckenbosch, N.; Reymond, A. und Kaessmann, H. (2005): Emergence of young human genes after a burst of retroposition in primates, *PLoS Biol* 3 [11], Seite e357.
- Michalak, P. (2008): Coexpression, coregulation, and cofunctionality of neighboring genes in eukaryotic genomes, *Genomics* 91 [3], Seite 243-8.
- Miele, L.; Cordella-Miele, E.; Mantile, G.; Peri, A. und Mukherjee, A. B. (1994): Uteroglobin and uteroglobin-like proteins: the uteroglobin family of proteins, *J Endocrinol Invest* 17 [8], Seite 679-92.
- 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.
- Molina, R.; Filella, X.; Auge, J. M.; Fuentes, R.; Bover, I.; Rifa, J.; Moreno, V.; Canals, E.; Vinolas, N.; Marquez, A.; Barreiro, E.; Borrás, J. und Viladiu, P. (2003): Tumor markers (CEA, CA 125, CYFRA 21-1, SCC and NSE) in patients with non-small cell lung cancer as an aid in histological diagnosis and prognosis. Comparison with the main clinical and pathological prognostic factors, *Tumour Biol* 24 [4], Seite 209-18.
- Mukherjee, A. B.; Kundu, G. C.; Mantile-Selvaggi, G.; Yuan, C. J.; Mandal, A. K.; Chattopadhyay, S.; Zheng, F.; Pattabiraman, N. und Zhang, Z. (1999): Uteroglobin: a novel cytokine?, *Cell Mol Life Sci* 55 [5], Seite 771-87.
- Muller-Schottle, F.; Classen-Linke, I.; Beier-Hellwig, K.; Sterzik, K. und Beier, H. M. (2000): Uteroglobin expression and release in the human endometrium, *Ann N Y Acad Sci* 923, Seite 332-5.
- Nagele, F.; Petru, E.; Medl, M.; Kainz, C.; Graf, A. H. und Sevelde, P. (1995): Preoperative CA 125: an independent prognostic factor in patients with stage I epithelial ovarian cancer, *Obstet Gynecol* 86 [2], Seite 259-64.
- Nakagawa, Y. (2004): Role of mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) as an antiapoptotic factor, *Biol Pharm Bull* 27 [7], Seite 956-60.
- Narod, S.; Ford, D.; Devilee, P.; Barkardottir, R. B.; Eyfjord, J.; Lenoir, G.; Serova, O.; Easton, D. und Goldgar, D. (1995): Genetic heterogeneity of breast-ovarian cancer revisited. Breast Cancer Linkage Consortium, *Am J Hum Genet* 57 [4], Seite 957-8.
- Negri, E.; Franceschi, S.; Tzonou, A.; Booth, M.; La Vecchia, C.; Parazzini, F.; Beral, V.; Boyle, P. und Trichopoulos, D. (1991): Pooled analysis of 3 European case-control studies: I. Reproductive factors and risk of epithelial ovarian cancer, *Int J Cancer* 49 [1], Seite 50-6.
- Negri, E.; Pelucchi, C.; Franceschi, S.; Montella, M.; Conti, E.; Dal Maso, L.; Parazzini, F.; Tavani, A.; Carbone, A. und La Vecchia, C. (2003): Family history of cancer and risk of ovarian cancer, *Eur J Cancer* 39 [4], Seite 505-10.
- Ni, J.; Kalff-Suske, M.; Gentz, R.; Schageman, J.; Beato, M. und Klug, J. (2000): All human genes of the uteroglobin family are localized on chromosome 11q12.2 and form a dense cluster, *Ann N Y Acad Sci* 923, Seite 25-42.
- Nieto, A.; Ponstingl, H. und Beato, M. (1977): Purification and quaternary structure of the hormonally induced protein uteroglobin, *Arch Biochem Biophys* 180 [1], Seite 82-92.

- 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.
- 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.
- Nouwen, E. J.; Hendrix, P. G.; Dauwe, S.; Eerdekens, M. W. und De Broe, M. E. (1987): Tumor markers in the human ovary and its neoplasms. A comparative immunohistochemical study, *Am J Pathol* 126 [2], Seite 230-42.
- Nunez-Villar, M. J.; Martinez-Arribas, F.; Pollan, M.; Lucas, A. R.; Sanchez, J.; Tejerina, A. und Schneider, J. (2003): Elevated mammaglobin (h-MAM) expression in breast cancer is associated with clinical and biological features defining a less aggressive tumour phenotype, *Breast Cancer Res* 5 [3], Seite R65-70.
- O'Brien, N. A.; O'Donovan, N.; Ryan, B.; Hill, A. D.; McDermott, E.; O'Higgins, N. und Duffy, M. J. (2005): Mammaglobin a in breast cancer: existence of multiple molecular forms, *Int J Cancer* 114 [4], Seite 623-7.
- O'Brien, N.; Maguire, T. M.; O'Donovan, N.; Lynch, N.; Hill, A. D.; McDermott, E.; O'Higgins, N. und Duffy, M. J. (2002): Mammaglobin a: a promising marker for breast cancer, *Clin Chem* 48 [8], Seite 1362-4.
- Olsen, M. A. und Schechter, L. E. (1999): Cloning, mRNA localization and evolutionary conservation of a human 5-HT7 receptor pseudogene, *Gene* 227 [1], Seite 63-9.
- Olson, M. F.; Ashworth, A. und Hall, A. (1995): An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1, *Science* 269 [5228], Seite 1270-2.
- Ooka, M.; Sakita, I.; Fujiwara, Y.; Tamaki, Y.; Yamamoto, H.; Aihara, T.; Miyazaki, M.; Kadota, M.; Masuda, N.; Sugita, Y.; Iwao, K. und Monden, M. (2000): Selection of mRNA markers for detection of lymph node micrometastases in breast cancer patients, *Oncol Rep* 7 [3], Seite 561-6.
- Peri, A.; Cordella-Miele, E.; Miele, L. und Mukherjee, A. B. (1993): Tissue-specific expression of the gene coding for human Clara cell 10-kD protein, a phospholipase A2-inhibitory protein, *J Clin Invest* 92 [5], Seite 2099-109.
- Permeth-Wey, J. und Sellers, T. A. (2009): Epidemiology of ovarian cancer, *Methods Mol Biol* 472, Seite 413-37.
- 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.
- Podlaha, O. und Zhang, J. (2004): Nonneutral evolution of the transcribed pseudogene Makorin1-p1 in mice, *Mol Biol Evol* 21 [12], Seite 2202-9.
- Puglisi, R.; Bevilacqua, A.; Carlomagno, G.; Lenzi, A.; Gandini, L.; Stefanini, M.; Mangia, F. und Boitani, C. (2007): Mice overexpressing the mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in male germ cells show abnormal spermatogenesis and reduced fertility, *Endocrinology* 148 [9], Seite 4302-9.



- 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.
- Ramos-Onsins, S. und Aguade, M. (1998): Molecular evolution of the Cecropin multigene family in *Drosophila*. functional genes vs. pseudogenes, *Genetics* 150 [1], Seite 157-71.
- Ran, Q.; Liang, H.; Ikeno, Y.; Qi, W.; Prolla, T. A.; Roberts, L. J., 2nd; Wolf, N.; Van Remmen, H. und Richardson, A. (2007): Reduction in glutathione peroxidase 4 increases life span through increased sensitivity to apoptosis, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62 [9], Seite 932-42.
- 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.
- Renaudie, F.; Yachou, A. K.; Grandchamp, B.; Jones, R. und Beaumont, C. (1992): A second ferritin L subunit is encoded by an intronless gene in the mouse, *Mamm Genome* 2 [3], Seite 143-9.
- Ricciardelli, C. und Oehler, M. K. (2009): Diverse molecular pathways in ovarian cancer and their clinical significance, *Maturitas* 62 [3], Seite 270-5.
- Riman, T.; Dickman, P. W.; Nilsson, S.; Correia, N.; Nordlinder, H.; Magnusson, C. M. und Persson, I. R. (2002): Risk factors for invasive epithelial ovarian cancer: results from a Swedish case-control study, *Am J Epidemiol* 156 [4], Seite 363-73.
- Riman, T.; Dickman, P. W.; Nilsson, S.; Nordlinder, H.; Magnusson, C. M. und Persson, I. R. (2004): Some life-style factors and the risk of invasive epithelial ovarian cancer in Swedish women, *Eur J Epidemiol* 19 [11], Seite 1011-9.
- Rosen, D. G.; Wang, L.; Atkinson, J. N.; Yu, Y.; Lu, K. H.; Diamandis, E. P.; Hellstrom, I.; Mok, S. C.; Liu, J. und Bast, R. C., Jr. (2005): Potential markers that complement expression of CA125 in epithelial ovarian cancer, *Gynecol Oncol* 99 [2], Seite 267-77.
- 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.
- Roveri, A.; Maiorino, M.; Nisii, C. und Ursini, F. (1994): Purification and characterization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from rat testis mitochondrial membranes, *Biochim Biophys Acta* 1208 [2], Seite 211-21.
- Ruud, P.; Fodstad, O. und Hovig, E. (1999): Identification of a novel cytokeratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells, *Int J Cancer* 80 [1], Seite 119-25.
- Ryerse, J. S.; Hoffmann, J. W.; Mahmoud, S.; Nagel, B. A. und deMello, D. E. (2001): Immunolocalization of CC10 in Clara cells in mouse and human lung, *Histochem Cell Biol* 115 [4], Seite 325-32.
- 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.

- Sanchez-Gutierrez, M.; Garcia-Montalvo, E. A.; Izquierdo-Vega, J. A. und Del Razo, L. M. (2008): Effect of dietary selenium deficiency on the in vitro fertilizing ability of mice spermatozoa, *Cell Biol Toxicol* 24 [4], Seite 321-9.
- Sankaranarayanan, R. und Ferlay, J. (2006): Worldwide burden of gynaecological cancer: the size of the problem, *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 20 [2], Seite 207-25.
- Sant, M.; Aareleid, T.; Berrino, F.; Bielska Lasota, M.; Carli, P. M.; Faivre, J.; Grosclaude, P.; Hedelin, G.; Matsuda, T.; Moller, H.; Moller, T.; Verdecchia, A.; Capocaccia, R.; Gatta, G.; Micheli, A.; Santaquilani, M.; Roazzi, P. und Lisi, D. (2003): EURO CARE-3: survival of cancer patients diagnosed 1990-94--results and commentary, *Ann Oncol* 14 Suppl 5, Seite v61-118.
- Sasaki, E.; Tsunoda, N.; Hatanaka, Y.; Mori, N.; Iwata, H. und Yatabe, Y. (2007): Breast-specific expression of MGB1/mammaglobin: an examination of 480 tumors from various organs and clinicopathological analysis of MGB1-positive breast cancers, *Mod Pathol* 20 [2], Seite 208-14.
- 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.
- Schneider, M.; Forster, H.; Boersma, A.; Seiler, A.; Wehnes, H.; Sinowatz, F.; Neumuller, C.; Deutsch, M. J.; Walch, A.; Hrabe de Angelis, M.; Wurst, W.; Ursini, F.; Roveri, A.; Maleszewski, M.; Maiorino, M. und Conrad, M. (2009): Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility, *Faseb J*.
- 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.
- Schomburg, L.; Schweizer, U.; Holtmann, B.; Flohe, L.; Sendtner, M. und Kohrle, J. (2003): Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues, *Biochem J* 370 [Pt 2], Seite 397-402.
- Scimeca, M. S.; Lisk, D. J.; Prolla, T. und Lei, X. G. (2005): Effects of gpx4 haploid insufficiency on GPx4 activity, selenium concentration, and paraquat-induced protein oxidation in murine tissues, *Exp Biol Med (Maywood)* 230 [10], Seite 709-14.
- Seiler, A.; Schneider, M.; Forster, H.; Roth, S.; Wirth, E. K.; Culmsee, C.; Plesnila, N.; Kremmer, E.; Radmark, O.; Wurst, W.; Bornkamm, G. W.; Schweizer, U. und Conrad, M. (2008): Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death, *Cell Metab* 8 [3], Seite 237-48.
- Sharpless, N. E. und DePinho, R. A. (2002): p53: good cop/bad cop, *Cell* 110 [1], Seite 9-12.
- Shi, C. X.; Long, M. A.; Liu, L.; Graham, F. L.; Gaudie, J. und Hitt, M. M. (2004): The human SCGB2A2 (mammaglobin-1) promoter/enhancer in a helper-dependent adenovirus vector directs high levels of transgene expression in mammary carcinoma cells but not in normal nonmammary cells, *Mol Ther* 10 [4], Seite 758-67.
- Shi, Z. Z.; Osei-Frimpong, J.; Kala, G.; Kala, S. V.; Barrios, R. J.; Habib, G. M.; Lukin, D. J.; Danney, C. M.; Matzuk, M. M. und Lieberman, M. W. (2000): Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 [10], Seite 5101-6.

- Silva, J. M.; Dominguez, G.; Silva, J.; Garcia, J. M.; Sanchez, A.; Rodriguez, O.; Provencio, M.; Espana, P. und Bonilla, F. (2001): Detection of epithelial messenger RNA in the plasma of breast cancer patients is associated with poor prognosis tumor characteristics, *Clin Cancer Res* 7 [9], Seite 2821-5.
- Sjodin, A.; Guo, D.; Hofer, P. A.; Henriksson, R. und Hedman, H. (2003): Mammaglobin in normal human sweat glands and human sweat gland tumors, *J Invest Dermatol* 121 [2], Seite 428-9.
- Sjodin, A.; Guo, D.; Lund-Johansen, M.; Krossnes, B. K.; Lilleng, P.; Henriksson, R. und Hedman, H. (2005): Secretoglobins in the human pituitary: high expression of lipophilin B and its down-regulation in pituitary adenomas, *Acta Neuropathol (Berl)* 109 [4], Seite 381-6.
- Sjodin, A.; Guo, D.; Sorhaug, S.; Bjermer, L.; Henriksson, R. und Hedman, H. (2003): Dysregulated secretoglobin expression in human lung cancers, *Lung Cancer* 41 [1], Seite 49-56.
- Skulachev, V. P. (1998): Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades, *FEBS Lett* 423 [3], Seite 275-80.
- Soares, M. B.; Schon, E.; Henderson, A.; Karathanasis, S. K.; Cate, R.; Zeitlin, S.; Chirgwin, J. und Efstratiadis, A. (1985): RNA-mediated gene duplication: the rat preproinsulin I gene is a functional retroposon, *Mol Cell Biol* 5 [8], Seite 2090-103.
- Sorge, J.; Gross, E.; West, C. und Beutler, E. (1990): High level transcription of the glucocerebrosidase pseudogene in normal subjects and patients with Gaucher disease, *J Clin Invest* 86 [4], Seite 1137-41.
- Soslow, R. A. (2008): Histologic subtypes of ovarian carcinoma: an overview, *Int J Gynecol Pathol* 27 [2], Seite 161-74.
- Span, P. N.; Waanders, E.; Manders, P.; Heuvel, J. J.; Foekens, J. A.; Watson, M. A.; Beex, L. V. und Sweep, F. C. (2004): Mammaglobin is associated with low-grade, steroid receptor-positive breast tumors from postmenopausal patients, and has independent prognostic value for relapse-free survival time, *J Clin Oncol* 22 [4], Seite 691-8.
- Sproul, D.; Gilbert, N. und Bickmore, W. A. (2005): The role of chromatin structure in regulating the expression of clustered genes, *Nat Rev Genet* 6 [10], Seite 775-81.
- Stoeckelhuber, M.; Messmer, E. M.; Schmidt, C.; Xiao, F.; Schubert, C. und Klug, J. (2006): Immunohistochemical analysis of secretoglobin SCGB 2A1 expression in human ocular glands and tissues, *Histochem Cell Biol* 126 [1], Seite 103-9.
- Stratton, J. F.; Pharoah, P.; Smith, S. K.; Easton, D. und Ponder, B. A. (1998): A systematic review and meta-analysis of family history and risk of ovarian cancer, *Br J Obstet Gynaecol* 105 [5], Seite 493-9.
- Stripp, B. R.; Lund, J.; Mango, G. W.; Doyen, K. C.; Johnston, C.; Hultenby, K.; Nord, M. und Whitsett, J. A. (1996): Clara cell secretory protein: a determinant of PCB bioaccumulation in mammals, *Am J Physiol* 271 [4 Pt 1], Seite L656-64.
- Suchy, B.; Austrup, F.; Driesel, G.; Eder, C.; Kusiak, I.; Uciechowski, P.; Grill, H. J. und Giesing, M. (2000): Detection of mammaglobin expressing cells in blood of breast cancer patients, *Cancer Lett* 158 [2], Seite 171-8.
- Sutherland, M.; Shankaranarayanan, P.; Schewe, T. und Nigam, S. (2001): Evidence for the presence of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in human platelets: implications for its

involvement in the regulatory network of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism, *Biochem J* 353 [Pt 1], Seite 91-100.

Takahara, S. (1952): Progressive oral gangrene probably due to lack of catalase in the blood (acatalasaemia); report of nine cases, *Lancet* 2 [6745], Seite 1101-4.

Tanaka, R.; Saito, T.; Shijubo, N.; Takehara, M.; Yamada, G.; Kawabata, I.; Itoh, Y. und Kudo, R. (2004): Expression of uteroglobin in normal and carcinogenic endometrium and influence of hormone replacement therapy, *Int J Cancer* 109 [1], Seite 43-8.

Tassi, R. A.; Bignotti, E.; Rossi, E.; Falchetti, M.; Donzelli, C.; Calza, S.; Ravaggi, A.; Bandiera, E.; Pecorelli, S. und Santin, A. D. (2007): Overexpression of mammaglobin B in epithelial ovarian carcinomas, *Gynecol Oncol* 105 [3], Seite 578-85.

Tassi, R. A.; Calza, S.; Ravaggi, A.; Bignotti, E.; Odicino, F. E.; Tognon, G.; Donzelli, C.; Falchetti, M.; Rossi, E.; Todeschini, P.; Romani, C.; Bandiera, E.; Zanotti, L.; Pecorelli, S. und Santin, A. D. (2009): Mammaglobin B is an independent prognostic marker in epithelial ovarian cancer and its expression is associated with reduced risk of disease recurrence, *BMC Cancer* 9, Seite 253.

Thomas, J. P.; Maiorino, M.; Ursini, F. und Girotti, A. W. (1990): Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides, *J Biol Chem* 265 [1], Seite 454-61.

Toppo, S.; Vanin, S.; Bosello, V. und Tosatto, S. C. (2008): Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily, *Antioxid Redox Signal* 10 [9], Seite 1501-14.

Torrents, D.; Suyama, M.; Zdobnov, E. und Bork, P. (2003): A genome-wide survey of human pseudogenes, *Genome Res* 13 [12], Seite 2559-67.

Trinklein, N. D.; Aldred, S. F.; Hartman, S. J.; Schroeder, D. I.; Otilar, R. P. und Myers, R. M. (2004): An abundance of bidirectional promoters in the human genome, *Genome Res* 14 [1], Seite 62-6.

Tsuji, T.; Watanabe, Y.; Katoh, H.; Sato, K. und Kunieda, T. (1998): Cloning and mapping of the mouse Gpx2 gene encoding gastrointestinal glutathione peroxidase, *J Vet Med Sci* 60 [5], Seite 651-4.

Tucker, J. M.; Lipatova, Z.; Beljanski, V.; Townsend, D. M. und Tew, K. D. (2005): Evaluation of lipophilins as determinants of tumor cell response to estramustine, *J Pharmacol Exp Ther* 315 [3], Seite 1158-62.

Ufer, C.; Wang, C. C.; Fahling, M.; Schiebel, H.; Thiele, B. J.; Billett, E. E.; Kuhn, H. und Borchert, A. (2008): Translational regulation of glutathione peroxidase 4 expression through guanine-rich sequence-binding factor 1 is essential for embryonic brain development, *Genes Dev* 22 [13], Seite 1838-50.

Ursini, F. und Bindoli, A. (1987): The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes, *Chem Phys Lipids* 44 [2-4], Seite 255-76.

Ursini, F.; Maiorino, M. und Gregolin, C. (1985): The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, *Biochim Biophys Acta* 839 [1], Seite 62-70.

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.

- Utomo, A.; Jiang, X.; Furuta, S.; Yun, J.; Levin, D. S.; Wang, Y. C.; Desai, K. V.; Green, J. E.; Chen, P. L. und Lee, W. H. (2004): Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells, *J Biol Chem* 279 [42], Seite 43522-9.
- van der Burg, M. E.; Lammes, F. B.; van Putten, W. L. und Stoter, G. (1988): Ovarian cancer: the prognostic value of the serum half-life of CA125 during induction chemotherapy, *Gynecol Oncol* 30 [3], Seite 307-12.
- van Haaften-Day, C.; Shen, Y.; Xu, F.; Yu, Y.; Berchuck, A.; Havrilesky, L. J.; de Bruijn, H. W.; van der Zee, A. G.; Bast, R. C., Jr. und Hacker, N. F. (2001): OVX1, macrophage-colony stimulating factor, and CA-125-II as tumor markers for epithelial ovarian carcinoma: a critical appraisal, *Cancer* 92 [11], Seite 2837-44.
- van Nagell, J. R., Jr.; DePriest, P. D.; Ueland, F. R.; DeSimone, C. P.; Cooper, A. L.; McDonald, J. M.; Pavlik, E. J. und Kryscio, R. J. (2007): Ovarian cancer screening with annual transvaginal sonography: findings of 25,000 women screened, *Cancer* 109 [9], Seite 1887-96.
- van Nagell, J. R., Jr.; Higgins, R. V.; Donaldson, E. S.; Gallion, H. H.; Powell, D. E.; Pavlik, E. J.; Woods, C. H. und Thompson, E. A. (1990): Transvaginal sonography as a screening method for ovarian cancer. A report of the first 1000 cases screened, *Cancer* 65 [3], Seite 573-7.
- Vanin, E. F. (1985): Processed pseudogenes: characteristics and evolution, *Annu Rev Genet* 19, Seite 253-72.
- Vanin, E. F.; Goldberg, G. I.; Tucker, P. W. und Smithies, O. (1980): A mouse alpha-globin-related pseudogene lacking intervening sequences, *Nature* 286 [5770], Seite 222-6.
- 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.
- Watson, James V. (1992): *Flow cytometry data analysis : basic concepts and statistics*, Cambridge University Press, Cambridge ; New York, NY, USA, ISBN: 0521415454.
- Watson, M. A.; Darrow, C.; Zimonjic, D. B.; Popescu, N. C. und Fleming, T. P. (1998): Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to chromosome 11q13, *Oncogene* 16 [6], Seite 817-24.
- Watson, M. A.; Dintzis, S.; Darrow, C. M.; Voss, L. E.; DiPersio, J.; Jensen, R. und Fleming, T. P. (1999): Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer, *Cancer Res* 59 [13], Seite 3028-31.
- Watson, M. A. und Fleming, T. P. (1996): Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer, *Cancer Res* 56 [4], Seite 860-5.
- Weeraratna, A. T.; Cajigas, J. A.; Schwartz, A.; Enquist, E. G.; Manyak, M. J. und Patierno, S. R. (1997): Loss of uteroglobin expression in prostate cancer: relationship to advancing grade, *Clin Cancer Res* 3 [12 Pt 1], Seite 2295-300.

- Weitzel, F.; Ursini, F. und Wendel, A. (1990): Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in various mouse organs during selenium deficiency and repletion, *Biochim Biophys Acta* 1036 [2], Seite 88-94.
- 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.
- Woolas, R. P.; Xu, F. J.; Jacobs, I. J.; Yu, Y. H.; Daly, L.; Berchuck, A.; Soper, J. T.; Clarke-Pearson, D. L.; Oram, D. H. und Bast, R. C., Jr. (1993): Elevation of multiple serum markers in patients with stage I ovarian cancer, *J Natl Cancer Inst* 85 [21], Seite 1748-51.
- Wu, C. T. und Morris, J. R. (1999): Transvection and other homology effects, *Curr Opin Genet Dev* 9 [2], Seite 237-46.
- Xiao, F.; Mirwald, A.; Papaioannou, M.; Baniahmad, A. und Klug, J. (2005): Secretoglobin 2A1 is under selective androgen control mediated by a peculiar binding site for Sp family transcription factors, *Mol Endocrinol* 19 [12], Seite 2964-78.
- 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.
- Yagi, K.; Komura, S. und Ohishi, N. (2002): Expression of human phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, *Methods Mol Biol* 196, Seite 195-9.
- Yagi, K.; Shidoji, Y.; Komura, S.; Kojima, H. und Ohishi, N. (1998): Dissipation of mitochondrial membrane potential by exogenous phospholipid monohydroperoxide and protection against this effect by transfection of cells with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene, *Biochem Biophys Res Commun* 245 [2], Seite 528-33.
- Yancik, R. (1993): Ovarian cancer. Age contrasts in incidence, histology, disease stage at diagnosis, and mortality, *Cancer* 71 [2 Suppl], Seite 517-23.
- Yang, Y.; Zhang, Z.; Mukherjee, A. B. und Linnoila, R. I. (2004): Increased susceptibility of mice lacking Clara cell 10-kDa protein to lung tumorigenesis by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a potent carcinogen in cigarette smoke, *J Biol Chem* 279 [28], Seite 29336-40.
- Yano, Y.; Saito, R.; Yoshida, N.; Yoshiki, A.; Wynshaw-Boris, A.; Tomita, M. und Hirotsune, S. (2004): A new role for expressed pseudogenes as ncRNA: regulation of mRNA stability of its homologous coding gene, *J Mol Med* 82 [7], Seite 414-22.
- 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.
- Yousef, G. M.; Borgono, C. A.; Michael, I. P. und Diamandis, E. P. (2004): Cloning of a kallikrein pseudogene, *Clin Biochem* 37 [11], Seite 961-7.
- Yu, Z.; Morais, D.; Ivanga, M. und Harrison, P. M. (2007): Analysis of the role of retrotransposition in gene evolution in vertebrates, *BMC Bioinformatics* 8, Seite 308.
- Zach, O.; Kasparu, H.; Krieger, O.; Hehenwarter, W.; Girschikofsky, M. und Lutz, D. (1999): Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested

reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA, *J Clin Oncol* 17 [7], Seite 2015-9.

- Zach, O.; Kasparu, H.; Wagner, H.; Krieger, O. und Lutz, D. (2000): Mammaglobin as a marker for the detection of tumor cells in the peripheral blood of breast cancer patients, *Ann N Y Acad Sci* 923, Seite 343-5.
- Zafrakas, M.; Petschke, B.; Donner, A.; Fritzsche, F.; Kristiansen, G.; Knuechel, R. und Dahl, E. (2006): Expression analysis of Mammaglobin A (SCGB2A2) and Lipophilin B (SCGB1D2) in more than 300 human tumors and matching normal tissues reveals their co-expression in gynecologic malignancies, *BMC Cancer* 6 [1], Seite 88.
- Zalata, A. A.; Christophe, A. B.; Depuydt, C. E.; Schoonjans, F. und Comhaire, F. H. (1998): The fatty acid composition of phospholipids of spermatozoa from infertile patients, *Mol Hum Reprod* 4 [2], Seite 111-8.
- Zdobnov, E. M.; Campillos, M.; Harrington, E. D.; Torrents, D. und Bork, P. (2005): Protein coding potential of retroviruses and other transposable elements in vertebrate genomes, *Nucleic Acids Res* 33 [3], Seite 946-54.
- Zehentner, B. K. und Carter, D. (2004): Mammaglobin: a candidate diagnostic marker for breast cancer, *Clin Biochem* 37 [4], Seite 249-57.
- Zehentner, B. K.; Dillon, D. C.; Jiang, Y.; Xu, J.; Bennington, A.; Molesh, D. A.; Zhang, X.; Reed, S. G.; Persing, D. und Houghton, R. L. (2002): Application of a multigene reverse transcription-PCR assay for detection of mammaglobin and complementary transcribed genes in breast cancer lymph nodes, *Clin Chem* 48 [8], Seite 1225-31.
- Zhang, C. L.; Tada, M.; Kobayashi, H.; Nozaki, M.; Moriuchi, T. und Abe, H. (2000): Detection of PTEN nonsense mutation and psiPTEN expression in central nervous system high-grade astrocytic tumors by a yeast-based stop codon assay, *Oncogene* 19 [38], Seite 4346-53.
- Zhang, L. P.; Maiorino, M.; Roveri, A. und Ursini, F. (1989): Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: specific activity in tissues of rats of different age and comparison with other glutathione peroxidases, *Biochim Biophys Acta* 1006 [1], Seite 140-3.
- Zhang, Z.; Carriero, N. und Gerstein, M. (2004): Comparative analysis of processed pseudogenes in the mouse and human genomes, *Trends Genet* 20 [2], Seite 62-7.
- Zhang, Z. und Gerstein, M. (2003): Patterns of nucleotide substitution, insertion and deletion in the human genome inferred from pseudogenes, *Nucleic Acids Res* 31 [18], Seite 5338-48.
- Zhang, Z.; Harrison, P. und Gerstein, M. (2002): Identification and analysis of over 2000 ribosomal protein pseudogenes in the human genome, *Genome Res* 12 [10], Seite 1466-82.
- Zhang, Z.; Harrison, P. M.; Liu, Y. und Gerstein, M. (2003): Millions of years of evolution preserved: a comprehensive catalog of the processed pseudogenes in the human genome, *Genome Res* 13 [12], Seite 2541-58.
- Zhao, C.; Nguyen, T.; Yusifov, T.; Glasgow, B. J. und Lehrer, R. I. (1999): Lipophilins: human peptides homologous to rat prostatein, *Biochem Biophys Res Commun* 256 [1], Seite 147-55.
- Zheng, F.; Kundu, G. C.; Zhang, Z.; Ward, J.; DeMayo, F. und Mukherjee, A. B. (1999): Uteroglobin is essential in preventing immunoglobulin A nephropathy in mice, *Nat Med* 5 [9], Seite 1018-25.

Ziogas, A.; Gildea, M.; Cohen, P.; Bringman, D.; Taylor, T. H.; Seminara, D.; Barker, D.; Casey, G.; Haile, R.; Liao, S. Y.; Thomas, D.; Noble, B.; Kurosaki, T. und Anton-Culver, H. (2000): Cancer risk estimates for family members of a population-based family registry for breast and ovarian cancer, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9 [1], Seite 103-11.

Zou, M.; Baitei, E. Y.; Alzahrani, A. S.; Al-Mohanna, F.; Farid, N. R.; Meyer, B. und Shi, Y. (2009): Oncogenic activation of MAP kinase by BRAF pseudogene in thyroid tumors, *Neoplasia* 11 [1], Seite 57-65.



## **7 Anhang**

### **7.1 Tabellarischer Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## **7.2 Selbständigkeitserklärung**

„Ich, Katharina Fischer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zur Rolle der Glutathionperoxidase-4 bei der Kontrolle des zellulären Redoxstatus und dessen Einfluss auf die Expressionsregulation von Sekretoglobinen beim Ovarialkarzinom“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

29.10.2012

K. Fischer



### **7.3 Danksagung**

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. sc. med. H. Kühn für die Vergabe dieses interessanten Promotionsthemas und die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe am Institut für Biochemie, Charité-Universitätsmedizin Berlin durchführen zu können. Darüberhinaus möchte ich mich für die stets hilfreiche und geduldige Betreuung und die vielfältige Unterstützung durch immerwährende Diskussionsbereitschaft und Anregungen bedanken.

Mein ausdrücklicher Dank gilt Frau Dr. rer. nat. A. Borchert, die mich durch ihr Engagement, ihr fachliches Wissen, ihre Motivation und ihr Verständnis in der Anfertigung dieser Arbeit (auch in der Ferne) begleitet und maßgeblich unterstützt hat.

Des Weiteren möchte ich mich ebenfalls bei Dr. rer. nat. M. Walther, Dr. rer. nat. C. Ufer und Frau H. Schiebel für eine wertvolle Zusammenarbeit und jederzeit gewährte Unterstützung bedanken.

Darüberhinaus gilt mein Dank allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Kühn für die kollegiale Atmosphäre, die Anleitung und Unterstützung in der Durchführung der experimentellen Untersuchungen und die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

Mein Dank gilt nicht zuletzt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mir mit viel Zuspruch und Unterstützung das Vertrauen in die Erstellung dieser Arbeit gegeben haben.