

Aus der Medizinischen Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. K. Wilms

---

**Differenzierte molekulare Expression von Selenoproteinen im menschlichen  
Gastrointestinaltrakt und in gastrointestinalen Tumorzelllinien**

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

vorgelegt von  
**Benno Franziskus Johannes Lex**  
aus München

Würzburg, November 2003



**Referent: Prof. Dr. med. Michael Scheurlen**

**Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Marco Sailer**

**Dekan: Prof. Dr. med. Stefan Silbernagl**

**Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2004**

**Der Promovend ist Arzt**



# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1.1	Selen.....	1
1.2	Biochemie der Selenoproteine.....	1
1.3	Selen und Ernährung.....	3
1.4	Selenmangelkrankheiten.....	4
1.5	Eukaryontische Selenoproteine.....	5
1.5.1	Glutathionperoxidasen.....	5
1.5.1.1	Cytosolische Glutathionperoxidase (cGPx).....	6
1.5.1.2	Plasma-Glutathionperoxidase (pGPx).....	6
1.5.1.3	Gastrointestinale Glutathionperoxidase (GPx-GI).....	6
1.5.1.4	Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase (PHGPx).....	7
1.5.2	Thioredoxin-Reduktase (TrxR).....	7
1.5.3	Selenoprotein P (SeP).....	8
1.5.4	Deiodasen.....	10
1.5.4.1	TypI 5'-Deiodase (5'-DI).....	10
1.5.4.2	TypII 5'-Deiodase (5'-DII).....	10
1.5.4.3	TypIII 5-Deiodase (5-D).....	11
1.5.5	Selenoprotein W (SeW).....	11
1.5.6	Selenoproteine unbekannter Funktion.....	11
1.6	Oxidative Zellschädigung.....	12
1.7	Antioxidantien.....	13
1.8	Antioxidativer Schutz durch Selenoproteine.....	14
1.9	Die Bedeutung von Selen und Selenoproteinen für Entzündungsreaktionen am Beispiel der Gastritis.....	15
1.10	Die Bedeutung von Selen und Selenoproteinen in der gastrointestinalen Tumorphathogenese.....	16
1.11	Östrogene und gastrointestinale Tumorphathogenese.....	18
1.12	Das kolorektale Adenom als gastrointestinale Präkanzerose.....	19
1.13	Fragestellung.....	20

<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	22
2.1	Lösungen und Puffer.....	22
2.2	EDV.....	26
2.3	Verwendete Zellen und Gewebe.....	26
2.3.1	ST 23132.....	26
2.3.2	Caco 2.....	26
2.4	Quergestreifte Muskulatur der Ratte.....	26
2.5	Zellkultur.....	26
2.6	Metabolische Markierung der Zellen mit <sup>75</sup> Se unter Pulse Chase-Bedingungen und Proteinanalyse im SDS-PAGE.....	27
2.6.1	Markierung von Caco 2- und ST 23132-Zellen mit <sup>75</sup> Se.....	27
2.6.1.1	Pulse Chase.....	27
2.6.1.2	24 h-Inkubation mit <sup>75</sup> Se.....	28
2.7	Ex vivo Metabolisierung von Natrium- <sup>75</sup> Se-Selenit in Schleim- hautbiopsien aus dem Gastrointestinaltrakt.....	28
2.8	Quantifizierung des <sup>75</sup> Se-Einbaus.....	28
2.9	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	29
2.9.1	Theoretischer Hintergrund.....	29
2.9.2	Praktische Durchführung.....	29
2.10	Northern Blot.....	30
2.10.1	RNA-Extraktion.....	30
2.10.1.1	Zellkultur.....	30
2.10.1.2	Biopsie-Gewebe.....	31
2.10.2	Konzentrationsbestimmung von RNA.....	31
2.10.3	Gelelektrophorese der RNA.....	32
2.10.3.1	Probegel.....	32
2.10.3.2	Blotgel.....	32
2.10.4	Diffusionsblot.....	32
2.10.5	Northern-Hybridisierung mit cDNA.....	33
2.10.6	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden.....	33
2.10.6.1	Labeling mit „Rediprime Kit“ (Amersham).....	33
2.10.6.2	Reinigung der radioaktiven DNA-Sonde.....	34
2.10.7	Verwendete cDNA-Sonden.....	34
2.10.8	Restriktion der cDNA aus Plasmiden.....	35

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	36
3.1	Metabolisierung von Natrium- <sup>75</sup> Se-Selenit in Caco 2- und ST 23132-Zellen.....	36
3.2	Pulse Chase-Versuch bei Caco 2-Zellen.....	36
3.3	Metabolisierung von Natrium- <sup>75</sup> Se-Selenit in Caco 2-Zellen nach 24 h Inkubation.....	37
3.4	Metabolisierung von Natrium- <sup>75</sup> Se-Selenit in ST 23132- Zellen nach 24 h Inkubation.....	38
3.5	Ex vivo Metabolisierung von Natrium- <sup>75</sup> Se-Selenit in Schleimhautbiopsien aus dem Gastrointestinaltrakt.....	40
3.6	Expression von Selenoproteinen in Zelllinien und Geweben.....	43
3.6.1	Selenoproteine in Caco 2- und ST 23132-Zellen.....	43
3.6.2	Selenoproteinen in der quergestreiften Muskulatur der Ratte.....	43
3.6.3	Regulation der mRNA-Transkription von Selenoproteinen durch Östradiol und Östrogenantagonisten in Caco 2-Zellen.....	43
3.6.4	Regulation der mRNA-Transkription von Selenoproteinen durch Ethanol in Caco 2 Zellen.....	45
3.6.5	Einfluss von CO <sub>2</sub> und FCS auf die Expression von Selenoproteinen in ST 23132-Zellen.....	47
3.7	mRNA-Expression von Selenoproteinen im menschlichen Gastrointestinaltrakt.....	49
3.7.1	mRNA-Expressionsmuster der Selenoproteine in den verschiedenen Abschnitten des gesunden menschlichen Gastrointestinaltrakts.....	49
3.7.2	Veränderungen des mRNA-Expressionsmusters der Selenoproteine in Magenmukosa bei verschiedenen gastralen Erkrankungen.....	51
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	54
4.1	Metabolisierung von Natrium- <sup>75</sup> Se-Selenit in Caco 2- und ST 23132-Zellen.....	54
4.1.1	Pulse Chase-Versuch bei Caco 2-Zellen.....	54
4.1.2	Metabolisierung von Natrium- <sup>75</sup> Se-Selenit in Caco 2- und ST 23132-Zellen nach 24 h Inkubation.....	54

4.2	Ex vivo Metabolisierung von Natrium- <sup>75</sup> Se-Selenit in Schleimhautbiopsien aus dem Gastrointestinaltrakt.....	56
4.2.1	Magen.....	56
4.2.2	Kolon und Kolonadenom.....	57
4.3	Expression von Selenoproteinen in Zelllinien.....	58
4.3.1	Selenoproteinen in Caco 2- und ST 23132-Zellen.....	58
4.3.2	Regulation der mRNA-Transkription von Selenoproteinen durch Östradiol, Östrogenantagonisten und Ethanol in Caco 2-Zellen.....	59
4.4	Expressionsmuster verschiedener Selenoproteine im humanen Gastrointestinaltrakt.....	61
4.4.1	SeP im humanen Gastrointestinaltrakt.....	63
4.4.2	TrxR1 im humanen Gastrointestinaltrakt.....	67
4.4.3	Glutathionperoxidasen im humanen Gastrointestinaltrakt.....	69
4.4.3.1	GPx-GI im humanen Gastrointestinaltrakt.....	69
4.4.3.2	pGPx im humanen Gastrointestinaltrakt.....	70
4.4.3.3	cGPx im humanen Gastrointestinaltrakt.....	71
4.5	Veränderungen Expressionsmusters der Selenoproteine in der Magenmukosa bei verschiedenen gastralen Erkrankungen.....	72
4.6	Ausblick.....	73
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>75</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>76</b>

## **Danksagung**

## **Lebenslauf**

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ag	Silber
AP1	Activator Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
ASS	Acetylsalicylsäure
ATG	Aurothioglucose (ein selencysteinspezifischer Inhibitor der 5'-DI)
bp	Basenpaare
Cd	Cadmium
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGPx	cytosolische Glutathionperoxidase
CHO	Chinese hamster ovary
cpm	`counts per minute`
d	Tag(e)
ddPCR	`differential display PCR`
5-D	TypIII 5-Deiodase
5'-DI	TypI 5'-Deiodase
5'-DII	TypII 5'-Deiodase
DMBA	Dimethylbenzantrazen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMH	Dimethylhydrazin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynucleosid-5'-triphosphat
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
ed.	`editor`
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	`estradiol-receptor`

ERT	`estrogen replacement therapy`
FAD	Flavinadenindinucleotid
FCS	fetales Kälberserum
GAPDH	glyceraldehyde phosphate dehydrogenase
GPx-GI	gastrointestinale Glutathionperoxidase
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
GSH-Red.	Glutathion-Reduktase
GSSG	Glutathiondisulfid
GTC	Guanidin-Thiocyanat
h	Stunde(n)
HFOB	`human fetal osteoblast`
Hg	Quecksilber
Hp	Helicobacter pylori
ICI 164,384	N-n-butyl-11-(3,17 $\beta$ -dihydroxyöstra-1,3,5(10)-trien-7 $\alpha$ -yl)-N-Methylundecanamide
IL	Interleukin
INF	Interferon
IT	Insulin/Transferrin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	Mercaptoessigsäure
MALT	mucosa associated lymphatic tissue
MAM	Methylazooxymethanol
MAP	mitogen-activated protein
min.	Minuten
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Na	Natrium
NF- $\kappa$ B	`nuclear factor- $\kappa$ B`
NADPH/H <sup>+</sup>	Nicotinadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)

NADP <sup>+</sup>	Nicotinadeninucleotidphosphat (oxidierte Form)
Ni	Nickel
NK-Zelle	natürliche Killer-Zelle
NSAIDs	`nonsteroidal antiinflammatory drugs`
ORE	Sauerstoff-responsives Element
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pBSSKII+	pBluescript SKII+
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pGPx	Plasma-Glutathionperoxidase
PHGPx	Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase
PTU	2-n-Propyl-6-thiouracil
R	Rezeptor
RA	rheumatoide Arthritis
RACE	`rapid amplification of cDNA ends`
Ref-1	`redox-factor 1`
RIA	Radioimmunassay
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	reaktive Sauerstoffintermediate
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
Se	Selen
<sup>75</sup> Se	(radioaktiv markiertes) Selen
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDH	Schilddrüsenhormon
SECIS	`selenocysteine insertion sequence`
SeP	Selenoprotein P
SIRS	`severe systemic inflammatory response syndrome`
SSC	Sodium-Sodium-Citrat
T2	3,3'-Diod-L-Thyronin
T3	3,5,3'-Triiod-L-Thyronin
rT3	3,3',5'-Triiod-L-Thyronin

T4	L-Thyroxin
TBE	Tris-Bor-EDTA
TBG	Thyroxin-bindendes Globulin
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	`transforming growth factor`
TNF	Tumor Necrosis Faktor
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxin-Reduktase
TSH	Thyrotropin
u. a.	unter anderem
UTR	untranslatierte Region
Vol.	Volumen
WHO	`world health organization`
Zn	Zink
ZNS	zentrales Nervensystem

# 1. Einleitung

## 1.1 Selen

Selen ist das dritte Element der VI. Hauptgruppe (Ordnungszahl 34; Atomgewicht 78,96 g/mol; Isotope  $^{68}\text{Se}$ - $^{91}\text{Se}$ ;  $^{80}\text{Se}$  am häufigsten) und wurde 1817 von Jöns Jakob Freiherr von Berzelius (Professor für Medizin und Pharmazie in Stockholm, \* 1779, † 1884) entdeckt. Da Selen in seinen chemisch-physikalischen Eigenschaften dem Element Tellur (lateinisch *tellus* = Erde) sehr ähnlich ist, gab ihm Berzelius in Anlehnung an die Griechische Göttin des Mondes, Selene (altgriechisch  $\Sigma\epsilon\lambda\eta\nu\eta$  = die Strahlende), den Namen Selen. Mythologische Zusammenhänge spielten bei der Namensgebung keine Rolle.

Selen ist mit einer Konzentration von 0,09 mg/kg ein eher selteneres Element der Erdkruste. Es ist häufig als isomorphe Beimengung in zahlreichen sulfidischen Schwermetallerzen vorhanden. Lange Zeit wurde dem Selen lediglich eine stark toxische Wirkung angelastet, da Nahrungsstudien bei Säugetieren ergaben, dass hohe Selen-Konzentrationen im Tierfutter zu toxischen Erscheinungen bei Säugetieren führen können (Beath O et al. 1934, Franke K und Potter W 1935). Erst in den 80er Jahren wurde eine direkt toxische Wirkung beim Menschen aufgezeigt. Eine tägliche Selenaufnahme von 800 µg verursachte chronische Vergiftungserscheinungen wie Wachstumsretardierung, Fertilitätsstörungen oder auch Leberzellschäden (Yang G et al. 1989). Als weitere Symptome der chronischen Selenosis gelten Müdigkeit, Haarausfall und Brüchigkeit der Fingernägel.

## 1.2 Biochemie der Selenoproteine

1957 führte die Beobachtung, dass Ratten unter selenarmen Ernährungsbedingungen Lebernekrosen entwickelten, jedoch bei Selenit-Zugabe zur Nahrung keine Leberschädigung eintrat, zur Einstufung des Selens als essentielles Spurenelement (Schwarz K und Foltz CM 1959). Mit der Identifizierung der cytosolischen Glutathionperoxidase (cGPx) als eukaryontisches, enzymatisches Selenoprotein wurde 1973 erstmals nachgewiesen, dass Selen essentiell in die Struktur bestimmter Proteine integriert ist (Flohé L et al. 1973, Rotruck JTA et al. 1973). In den Aminosäuren Selenomethionin und Selenocystein liegt Selen kovalent gebunden vor. Der Einbau von Selenomethionin anstelle von Methionin in entsprechende Proteine unterliegt dem Zufall, da Selen und Schwefel um die Metabolisierung in die strukturgleiche Aminosäure konkurrieren. Die Selenocysteininsertion hingegen unterliegt einem besonderen Mechanismus, der für Prokaryonten aufgeklärt wurde (Böck A et al. 1991),

hingegen für Eukaryonten teilweise noch unbekannt ist (Low SC und Berry MJ 1996, Lee BJ et al. 1996).

Die Kodierung für die Translation von Selenocystein erfolgt durch ein UGA-Codon in der mRNA, das normalerweise als Opal-Stop-Codon fungiert (Zinoni F et al. 1986, Chambers I et al. 1986). In Kombination mit dem SECIS-Element ('selenocysteine insertion sequence'), einer Sekundärstruktur im 3'-Bereich der mRNA, erfolgt die Insertion von Selenocystein, jedoch nicht der kodierte Kettenabbruch. Während das SECIS-Element bei Prokaryonten dem UGA-Codon meist direkt nachgekoppelt ist, kann es bei Eukaryonten weit in der 3'-untranslatierten Region (UTR) liegen (Berry MJ et al. 1991, Heider J et al. 1992, Martin GW et al. 1996, Walczak R et al. 1996). Bei der Translation in Prokaryonten wird zunächst Serin an eine spezielle tRNA<sup>Sec</sup>, das Transkript des selC-Gens (Leinfelder W et al. 1988), gekoppelt. Darauf folgend modifiziert die Selenocystein-Synthase (SelA) Serin zu Selenocystein. Das Selen wird aus Selenophosphat rekrutiert, dessen Synthese durch ATP-abhängige Aktivierung von Selenid durch die Selenophosphat-Synthetase (SelD) gewährleistet wird. Die Interaktion der Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> mit dem entsprechenden Ribosom wird von dem Elongationsfaktor SelB gesteuert (Forchhammer K et al. 1989).

Genomische Homologe zu selB und selA konnten bisher in Eukaryonten noch nicht identifiziert werden, wohingegen das selC-Gen bei Eukaryonten ubiquitär vorkommt (Lee BJ et al. 1990). SelC-Knockout-Mäuse überleben das frühe Embryonalstadium nicht, wodurch die Bedeutung des Genproduktes belegt wird (Bösl MR et al. 1997). Eukaryontische Proteine, die mit dem SECIS-Element interagieren, wurden ebenso (Shen Q et al. 1995, Hubert N et al. 1996, Lesson A et al. 1997) wie ein dem SelA gleichendes Enzym (Mizutani T et al. 1992) nachgewiesen. Für SelD wurden zwei homologe eukaryontische Isoformen (SelD1 und 2) des Proteins identifiziert. Im SelD1-Enzym befindet sich im aktiven Zentrum Threonin anstelle von Cystein (Low SC et al. 1995). In der Isoform SelD2 hingegen ist das aktive Zentrum mit Selenocystein, welches eine Selen-abhängige Autoregulation der Selenoproteinsynthese ermöglicht, ausgestattet (Guimaraes MJ et al. 1996). In Selenoproteinen bekannter Funktion liegt Selenocystein jeweils im aktiven Zentrum vor und ist maßgeblich an der Katalyse von Redox-Reaktionen beteiligt. Wird dieser Selenocysteinrest in analogen rekombinant hergestellten Proteinen durch Cystein ersetzt, können die entsprechenden Enzymreaktionen nicht oder lediglich mit stark verminderter Effektivität ablaufen (Köhrle J 1999).

Neben der Tatsache, dass Selen und damit auch Selenoproteine in zahlreichen humanen Gewebe- und Zelltypen vorkommen (Dickson RC und Tomlinson RH 1967, Behne D und Wolters W 1983), ist auch eine hierarchische Verteilung des Selens innerhalb der

verschiedenen Gewebe gezeigt worden. Diese differenzierte Verteilung bedingt eine überproportionale Selen-Versorgung von ZNS und Endokrinium (z. B. Hypophyse, Schilddrüse, Gonaden) bei selenarmer Alimentation (Behne D et al. 1988). Während die Aktivität der TypI 5'-Deiodase (5'-DI) in der Schilddrüse Selen-defizienter Ratten beinahe unverändert blieb, war die Enzymaktivität in Niere und Leber deutlich reduziert. Wurde hingegen die PHGPx-Aktivität und deren quantitative mRNA-Transkription in Leber und Herz des selben Tiermodells konstant gehalten, so reduzierten sich mRNA und Aktivität der cGPx deutlich (Bermano G et al. 1995). Auch konnte eine intrazelluläre Verteilungshierarchie von Selen zugunsten bestimmter Selenoproteine (PHGPx, SeP, 5'-DI) nachgewiesen werden (Behne D und Kyriakopoulos A 1993, Gross M et al. 1995). Ebenso wie in Eu- und Prokaryonten konnten auch in Viren (Molluscum contagiosum, ein Virus der Pockengruppe, welches die GPx kodiert und die epidermale Dellwarze verursacht) Selenoproteine-kodierende Gene identifiziert werden (Shisler JL et al. 1998). Die durch das Virus-Genom gewährleistete Zytoprotektion der Wirtszelle mittels cGPx sichert wiederum das Überleben des Virus.

### **1.3 Selen und Ernährung**

Der Organismus vermag neben den Selenoaminosäuren Selenomethionin und Selenocystein auch anorganisches Selen (Selenit) zu verwerten. Letzteres, z. B. in Form von Natriumselenit, ist vom substitutiven Aspekt aus den Selenoaminosäuren vorzuziehen, da diese als Aminosäuren auch unspezifisch in Proteine eingebaut werden und somit das enthaltene Selen nicht unmittelbar verfügbar ist (Krämer K et al. 1996). Schrauzer allerdings sieht bei der Selensupplementation einen eindeutigen Vorteil von Selenomethionin gegenüber Selenit hinsichtlich der effektiven Inkorporation, Verstoffwechslung und Halbwertszeit (Schrauzer GN 2000 (a)). Die Ausscheidung von Selen erfolgt hauptsächlich renal als Trimethylselenoniumion. Bei Inkorporierung höherer Dosen wird Dimethylselenit, ein nach Knoblauch riechender Selenmetabolit, exspiriert. Aus diesem Grund kann u. a. knoblauchartiger Atemgeruch Indiz einer Selenintoxikation sein (Krämer K et al. 1996).

Die Erkenntnisse über kanzeroprotektive Wirkungen von Selen und durch ausgeprägten Selenmangel bedingte Erkrankungen warfen die Frage nach dem quantitativen Selenbedarf und der optimalen täglichen Selenzufuhr auf. Basierend auf den Daten aus erfolgreichen Seleninterventionsstudien, in welchen bei täglicher Selenzufuhr von bis zu 400 µg keine Nebenwirkungen auftraten, wird eine tägliche Selensupplementation von bis zu 200 µg (zusätzlich zu durchschnittlich 70 µg, die durch die Nahrung aufgenommen werden (USA))

gefordert (Combs GF et al. 1999). Bisherige Konsensusempfehlungen gingen von einem täglichen Bedarf von 40-150 µg Selen bei Erwachsenen aus (Biesalski HK et al. 1997). Die WHO unterscheidet in ihrer aktuellen Empfehlung zur täglichen Selenversorgung zwischen einem Normativwert (♂: 40 µg/d, ♀: 30 µg/d), der ausreichende Enzymtätigkeit und Gewebespiegel gewährleistet, einem Basalwert (♂: 21 µg/d, ♀: 16 µg/d), der vor klinischen Mangelerscheinungen schützt und einem sicherem nicht toxischem Wert (400 µg/d). Der „safe and adequate dietary intake“ (sichere und angemessene Aufnahmemenge) umfasst somit den Mengenbereich zwischen 30 bzw. 40 und 400 µg/d. Rayman betrachtet die WHO-Empfehlung als nicht mehr ausreichend und fordert unter Einbeziehung der neuesten Daten eine tägliche Einnahme von mindestens 73 µg/d für beide Geschlechter (Rayman MP 2000). Einige Experten fordern, dass Tumorpatienten annähernd 400 µg/d Selen erhalten sollten (Levander OA 1996).

Als Quelle für die alimentäre Selenversorgung dienen hauptsächlich rotes Fleisch, Getreide, Seefisch und Meeresfrüchte, soweit diese entsprechend selenreichen Umweltbedingungen (selenreiche Böden, maritime Nahrungskette) exponiert waren. Der Selengehalt der Erdböden – in Deutschland und Mitteleuropa mit 0,1-0,3 ppm Se/kg Trockensubstanz relativ niedrig (Hartfiel W und Bahners N 1988) – determiniert somit die alimentäre Selenversorgung. In Deutschland nehmen Männer durchschnittlich 48 µg/d, Frauen 38 µg/d Selen zu sich. Mit der gewöhnlichen mitteleuropäischen Ernährung werden dennoch ausreichende Serum-Selenspiegel (~100 µg/l) erreicht. Als Messlatte kann der bereits erwähnte „safe and adequate dietary intake“, dem u. a. die Sättigung der GPx-Aktivität (Bedingung: Serum-Selenspiegel >50 µg/l) zugrunde liegt (Biesalski HK et al. 1997), herangezogen werden.

#### **1.4 Selenmangelkrankheiten**

In bestimmten Gebieten Chinas mit extrem selenarmen Erdböden (< 0,1 ppm) traten erstmals Krankheitsbilder zu Tage, die eindeutig auf Selenmangel zurückzuführen waren. Dazu zählt u. a. die Keshan-Krankheit, eine kongestive Kardiomyopathie, die in der chinesischen Provinz Keshan (durchschnittlicher Serum-Selenspiegel der Einwohner bei ca. 20 µg/l) endemisch auftrat. Die typischen kardialen Symptome wie akute oder chronische Herzinsuffizienz, dilatative Kardiomyopathie, Arrhythmien und Galopprrhythmus können sich bereits im Kindesalter manifestieren. Prophylaktische und therapeutische Selensubstitution (0,5-1 mg Na-Selenit/d) vermochten die Erkrankung zu verhindern bzw. die Symptomatik zu bessern (Foster LH und Sumar S 1997). Ebenso sind die Kashin-Beck-Erkrankung (Osteoarthritis deformans endemica), die endemisch in Tibet, Sibirien, Nordchina und -korea auftritt, und

die symptomverwandte, im nördlichen KwaZulu-Natal auftretende Mseleni-Krankheit (Gibson RS 1989) den Selen-responsiven endemischen Erkrankungen zuzurechnen. Die Kashin-Beck-Erkrankung manifestiert sich bereits im Kindesalter und weist als pathologische Merkmale multiple fokale Chondronekrosen, Muskelatrophien sowie rheumatoide Beschwerden auf. Sie führt unbehandelt innerhalb von 30 Jahren über eine multifokale Osteoarthritis zu Gelenksversteifung. Derzeit wird die Selendefizienz als alleinige Ursache für diese Krankheitsbilder jedoch stark angezweifelt, da diese Erkrankungen nicht in allen selenarmen Regionen auftreten. Pathogene Kofaktoren Jodmangel und Hypothyreodismus (Moreno-Reyes R et al. 1998), Infektionen mit primär apathogenen Coxsackie B3-Viren, die in selendefizienten Wirtsorganismen durch multiple virale Genom-Mutationen kardiopathogen werden (Beck MA et al. 1994), oder auch eine chronische Toxinbelastung durch, mit Mykotoxinen, kontaminiertes Getreide (Chasseur C et al. 1997) werden diskutiert. Erniedrigte Plasma-Selenspiegel werden auch bei zahlreichen Patienten mit SIRS im Rahmen einer Sepsis, alkoholinduzierter Leberzirrhose, zystischer Fibrose und inflammatorischen Darmerkrankungen beobachtet (Gärtner R et al. 2001). Bei Patienten mit Morbus Crohn konnte durch Selen-Substitution eine Besserung der Krankheitssymptome erreicht werden (Ringstad J et al. 1993).

## **1.5 Eukaryontische Selenoproteine**

In den vergangenen Jahren wurde eine Reihe eukaryontischer Selenoproteine identifiziert. Markierungsversuche mit <sup>75</sup>Se zeigten, dass im Organismus von Ratten, die Selenmangel ausgesetzt waren, ca. 30 verschiedene Selenoproteine vorkommen, deren Sequenz und Funktion teilweise noch nicht bekannt ist (Behne D et al. 1995).

### **1.5.1 Glutathionperoxidasen (GPx)**

Die GPx-Enzymfamilie umfasst mindestens vier genetisch verschiedene Isoenzyme mit antioxidativer Schutzfunktion. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und andere Hydroperoxide werden durch GPx mit Hilfe von reduziertem GSH zu H<sub>2</sub>O oder zu Alkohol umgewandelt. Anders als die PHGPx, die ein 22 kDa Monomer mit eigenem Substratspektrum darstellt, sind die Isoenzyme cGPx, pGPx und GPx-GI strukturell Homotetramere mit leicht unterschiedlichem Molekulargewicht (cGPx: 23 kDa; pGPx: 25 kDa; GPx-GI: 22 kDa). Sie katalysieren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Lipid- und andere niedermolekulare Hydroperoxide.

### **1.5.1.1 Cytosolische Glutathionperoxidase (cGPx)**

Die cGPx wird in zahlreichen Geweben – quantitativ am stärksten in Erythrozyten, Niere und Leber (Flohé L et al. 1973; Rotruck JTA et al. 1973; Sunde RA 1997) – gebildet. Das humane Gen liegt auf Chromosom 3 (Region 3q11-3q12). Der Promotor enthält Sauerstoff-responsive Elemente (OREs), welche die cGPx-Genexpression responsiv auf den Sauerstoffpartialdruck in der Zelle regulieren (Cowan DB et al. 1993). Weder die cGPx-Überexpression durch Hyperoxie (Jornot L und Junod AF 1997) noch der Knockout der cGPx beeinträchtigen die Entwicklung und Vitalität der entsprechenden Mäuse (Ho YS et al. 1997). Auch bleibt die Transkription anderer Glutathionperoxidasen bei einer cGPx-Überexpression unbeeinflusst (Cheng WH et al. 1997).

### **1.5.1.2 Plasma-Glutathionperoxidase (pGPx)**

Eine ins Plasma sezernierte, glykosylierte Isoform der cGPx, die pGPx, reduziert  $H_2O_2$  oder reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROI), die durch phagozytierende Zellen oder Endothelzellen abgesondert werden. Die pGPx weist auf DNA-Ebene 57% Identität zur cGPx auf und ist auf Chromosom 5q32 lokalisiert (Yoshimura S et al. 1994). Die genetischen Differenzen zwischen p- und cGPx manifestieren sich in unterschiedlicher mRNA-Länge und auf Proteinebene im Molekulargewicht. Beide binden keine identischen Antikörper (Takahashi K et al. 1987). Als bedeutendste Quelle von sezernierter pGPx wurden die proximale Nieren-Tubuli und die Parietalzellen der Bowman-Kapsel identifiziert (Avisar N et al. 1994). Zwischenzeitlich konnte pGPx-mRNA auch in Herz, Plazenta, Nebenhoden, Leber, Pankreas, Kolonepithel, Skelettmuskulatur, Epithel des Ziliarkörpers, Gehirn, laktierender Mamma und Lunge von Mensch und Nager nachgewiesen werden. Die sezernierte pGPx wurde in Milch, Fruchtwasser, Darmlumen und okulärem Kammerwasser detektiert (Chu FF et al. 1992, Brigelius-Flohé R 1999). Neben GSH vermag pGPx auch Trx und Glutaredoxin (als reduzierte Thiol-Substrate) in der Funktion von Reduktionspartnern zu oxidieren (Björnstedt M et al. 1994).

### **1.5.1.3 Gastrointestinale Glutathionperoxidase (GPx-GI)**

Als eine weitere cytosolische Isoform wurde die im Gastrointestinaltrakt exprimierte GPx-GI identifiziert. Ihre Funktion liegt in der Reduktion von Peroxiden, die mit der Nahrung zugeführt oder durch residierende Mikroorganismen im Gastrointestinaltrakt produziert

werden. Auf DNA-Ebene weist die GPx-GI 61% Sequenzidentität zur cGPx auf. Die spezifische Enzym-Aktivität der GPx-GI ist im Vergleich zur cGPx um den Faktor 3 niedriger (Chu FF et al. 1997), der Genlokus ist auf Chromosom 14q21 (Chu FF et al. 1996). Die mRNA war bisher im humanen Gastrointestinaltrakt (Kolon, „Dünndarm“, Magen), Leber und unkonstant in Mammagewebe nachgewiesen worden. Eine Artenspezifität wird durch die Tatsache, dass der Expressions-Nachweis bei der Ratte nur im Gastrointestinaltrakt gelang, angedeutet (Chu FF et al. 1992). In einem Mausmodell korrelierte die Resistenz gegen Dimethylhydrazin-induzierte Kolonkarzinome positiv mit der GPx-GI-Expression. Interessanterweise wurde dabei eine gegenläufige Aktivierung von cGPx und GPx-GI beobachtet, was die These über den besonderen Stellenwert des GPx-GI-Gens für die Tumor-Protektion untermauert (Chu FF et al. 1997).

#### **1.5.1.4 Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase (PHGPx)**

Die meistens membrangebundene PHGPx reduziert insbesondere Phospholipid-, Cholesterin-Hydroperoxide und andere höhermolekulare Lipidperoxide. Ihre Funktion ist somit vor allem in der Protektion von Biomembranen gegenüber Peroxidation zu sehen (Ursini F et al. 1995). Möglicherweise besitzt die PHGPx zusätzlich eine Reparaturfunktion bei oxidativer DNA-Schädigung (Bao Y und Williamson G 1997). Das Gen liegt auf Chromosom 19 (Chu FF 1994) und enthält in seiner Sequenz putative Hormon-responsive Elemente (Brigelius-Flohé R et al. 1994). PHGPx kann die Schutzfunktion vor Lipidperoxidation nur in Kombination mit Vitamin E effektiv erfüllen, was einen synergistischen, antioxidativen Mechanismus beider Systeme wahrscheinlich macht. Primär reduziert Vitamin E Lipidperoxid-Radikale zu Lipid-Hydroperoxiden, die anschließend von der PHGPx reduziert werden (Roveri A et al. 1994). Die mRNA ist in den meisten Geweben vorhanden. Die höchste Enzymaktivität wurde in den Testes gefunden - die PHGPx-Expression beginnt jedoch erst nach der Pubertät und ist hormonell reguliert (Ursini F et al. 1985). Die geringen mRNA-Mengen in den humanen Geweben sind in der Northern-Hybridisierung meist nicht detektierbar (Dreher I 1997).

#### **1.5.2 Thioredoxin-Reduktase (TrxR)**

Das 12 kDa-Protein Thioredoxin (Trx) fungiert mit zwei freiliegenden, eng benachbarten Cysteinresten als Protein-Disulfid-Reduktase. Besonders als Wasserstoffdonor für die Ribonucleotidreduktase hat Trx eine große Bedeutung. Das 57 kDa FAD-haltige Flavoenzym Thioredoxin-Reduktase (TrxR) reduziert NADPH-abhängig Trx und andere Substrate wie Vitamine und Pharmaka (Holmgren N und Björnstedt M 1995). Mit der Identifizierung von

TrxR als eukaryontisches Selenoprotein (Tamura T et al. 1995 und 1996) gelang auch die Klonierung der humanen TrxR aus einer Lungen-Adenokarzinomzelllinie (Gasdaska PY et al. 1995). Bisher konnten drei Isoenzyme der TrxR (TrxR1 bzw. TrxR $\alpha$ , TrxR2, TrxR3 bzw. TrxR $\beta$ ) identifiziert werden (Zimmermann MB und Köhrle J 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die TrxR1 untersucht. Die humane mitochondriale TrxR2 hat ein Molekulargewicht von 56 kDa, die TrxR3 von 66 kDa.

Die Funktion der TrxR2 wird in der Protektion vor Mitochondrien-induzierten ROI vermutet, die TrxR3-funktion ist unbekannt (Behne D und Kyriakopoulos A 2001). Analog zu anderen Selenoproteinen war die TrxR-Aktivität unter Selenmangel in Leber und Niere von Selen-depletierten Ratten vermindert (Hill KE et al. 1997). Einer schwachen Regulation der TrxR-mRNA durch Selen steht eine stark regulierte TrxR-Enzymaktivität entgegen. Die Stimulation der TrxR-Enzymaktivität variierte in verschiedenen Zelllinien stark (Gallegos A et al. 1997, Schütze N et al. 1998 (a)). Als regulative Elemente für die TrxR1-mRNA konnten bislang Vitamin D (1,25(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>), FCS, verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine identifiziert werden (Schütze N et al. 1998 (b)). Aufgaben von Trx und TrxR liegen in der Proteinfaltung (durch Spaltung von Disulfidbrücken), der Modulation des zellulären Redoxsystems und der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP1. TrxR steuert damit Prozesse bei Zellwachstum,-differenzierung und -protektion (Schütze N et al. 1998 (b)). Eine TrxR-Sezernierung ist zwischenzeitlich nachgewiesen worden (Soderberg A et al. 2000). Beim antioxidativen Schutz von Endothelzellen soll TrxR von allen Selenoproteinen die bedeutendste Funktion besitzen (Anema SM et al. 1999). Ob es dadurch ein Target-Protein bei der Pathogenese der Arteriosklerose ist, bleibt noch zu klären. Im Mausmodell zieht Thioredoxin-„Knockout“ eine absolute Letalität im frühen Embryonalstadium nach sich, was die integrative Bedeutung dieses Protein-Systems belegt (Matsui M et al. 1996).

Erhöhte TrxR-Enzymaktivität in zahlreichen Tumorzelllinien/-geweben deuten auf eine TrxR-Dysregulation im Rahmen der Karzinogenese hin (Gallegos A et al. 1997), was die TrxR zu einem potentiellen Angriffspunkt in der Tumorthherapie macht (Kirkpatrick DL et al. 1997). Die Kolonschleimhaut war bisher die einzig beschriebene Lokalisation für TrxR-mRNA im Gastrointestinaltrakt des Menschen (Berggren M et al. 1996).

### **1.5.3 Selenoprotein P (SeP)**

SeP wurde primär als 57 kDa-Protein aus Rattenplasma und schließlich auch aus humanem Plasma isoliert (Motschnik PA und Tappel AL 1989, Eberle B und Haas HJ 1993). Die Leber bildet die Hauptquelle für die Produktion des stark glykosylierten, Histidin- und Cystein-

reichen Plasmaproteins SeP. Die SeP-mRNA enthält 10 UGA-Codons, die in Kombination mit 2 SECIS-Elementen in der 3'-UTR den Einbau von 10 Selencysteinresten kodieren (Hill KE et al. 1991 und 1993). Eine Erklärung für die Existenz von zahlreichen SeP-Isoformen mit unterschiedlichen Glykosylierungsgraden ist ein postulierter Terminationsmechanismus an den UGA-Codons 7-10, denen sich jeweils die Purinbase Adenin anschließt und somit „starke Terminatoren“ darstellen (Himeno S et al. 1996). Einige der UGA-Codons könnten damit während der Translation in bestimmten Situationen als Stop-Kodons gelesen werden. Neben SeP wurde im bovinen Gehirn auch ein Selenoprotein mit 12 Selenocysteinresten kloniert und charakterisiert (Saijoh K et al. 1995). Das humane SeP wurde auf Chromosom 5q31 lokalisiert (Hill KE et al. 1996). Die Zellmembrananbindung von SeP wird vermutlich über spezifische Rezeptoren gewährleistet (Wilson DS und Tappel AL 1993).

Der hohe SeP-Anteil (60-70%) bei Plasmaselen (Burk RF und Hill KE 1994) führte anfangs zur Annahme, SeP erfülle eine Selentransport oder -speicherfunktion aus (Motsenbocker MA und Tappel AL 1982). In verschiedenen Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass SeP unter Selenmangelbedingungen gegenüber der cGPx bevorzugt mit Selen versorgt wird. Damit dürfte der cGPx die vermutete Selen-Speicherfunktion zukommen (Hill KE et al. 1992; Gross M et al. 1995).

Im Rattenmodell bewirkte SeP eine Protektion gegenüber Paraquat- oder Diquat-induzierter Lebernekrose, weshalb für SeP eine extrazelluläre antioxidative Schutzfunktion postuliert wird (Burk RF et al. 1995). Darüber hinaus wurden Interaktionen von Hg-Se-Komplexen (Yoneda S und Suzuki KT 1997) sowie anderen Schwermetallen wie Ag, Cd, Ni und Zn (Mostert V 2000) mit SeP nachgewiesen, was Spekulationen über die Rolle von SeP in der Schwermetall-Detoxifikation eröffnet. Die neben den 10 Selencysteinresten in einem SeP-Protein integrierten 17 Cysteinreste untermauern die Vermutung, SeP sei am antioxidativen Defense-System beteiligt. Die mittels RIA bestimmbaren SeP-Konzentrationen korrelieren stark mit den entsprechenden Serum-Selenspiegeln (Persson-Moschos M et al. 1995), wodurch SeP als potentieller Marker für den individuellen Selenstatus einsetzbar wäre. Die SeP-mRNA ist in zahlreichen Geweben vorhanden. Die Expression von SeP wird durch proinflammatorische Cytokine Il-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und INF- $\gamma$  (Dreher I et al. 1997 (a)) sowie TGF- $\beta$ <sub>1</sub> (Mostert V et al. 2001) als Vertreter einer Akut-Phase-Reaktion über responsive Promotor-Elemente herunterreguliert, was eine Erklärung für die häufig bei akuten oder chronischen Erkrankungen beobachteten, niedrigen Serum-Selenspiegel sein könnte.

#### **1.5.4 Deiodasen**

Die Familie der Deiodasen umfasst die bisher identifizierten Proteine 5'-DI, 5'-DII und 5-D. Die genannten Deiodasen sind elementarer Bestandteil des Jodstoffwechsels der Schilddrüse. Ihre Bedeutung wird durch die präferentielle Selenversorgung unter Selenmangelbedingungen unterstrichen (Gross M et al. 1995). Die verschiedenen Isoenzyme unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Substratpräferenz, Reaktionsmechanismen, Gewebeverteilung, Inhibierbarkeit und Regulation. Da die Deiodasen in dieser Arbeit nicht untersucht wurden, soll lediglich ein kurzer Überblick vermittelt werden.

##### **1.5.4.1 TypI 5'-Deiodase (5'-DI)**

Die 5'-DI ist ein Homodimer aus 2 identischen 27 kDa-Untereinheiten, in deren aktivem Zentrum ein Selencystein vorliegt. Es agiert nach einem Zwei-Substrat Ping-Pong Mechanismus mit einer Bevorzugung von rT3 gegenüber T4 als Substrat. Die hauptsächliche Funktion der 5'-DI liegt in der reduktiven Deiodierung von T4 zu T3 und im Abbau von rT3 zu T2. Als Inhibitoren sind u. a. Flavonoide, Iopansäure (jodiertes Röntgenkontrastmittel), ATG und PTU wirksam. Die 5'-DI wird hauptsächlich in Schilddrüse, Hypophyse, Leber (Hauptproduktionsort des zirkulierenden T3) und Niere exprimiert. Das Gen wurde auf Chromosom 1p32-33 lokalisiert (Jakobs TC et al. 1997). Die 5'-DI wird durch Schilddrüsenhormone selbst reguliert, bei Hyperthyreose (und Selendefizienz) ist eine erhöhte, bei Hypothyreose dagegen eine reduzierte Aktivität festzustellen (Zimmermann MB und Köhrle J 2002).

##### **1.5.4.2 TypII 5'-Deiodase (5'-DII)**

Die 5'-DII ist ein multimeres Enzym, das sich aus einer oder mehreren 29 kDa-, substratbindenden Untereinheiten (Safran M und Leonard J 1991), einem ca. 60 kDa-cAMP induzierten Aktivierungsprotein (Safran M et al. 1996) und einer oder mehreren katalytischen Untereinheiten zusammensetzt. Auch die 5'-DII katalysiert die reduktive Deiodierung (T4→T3), unterscheidet sich aber von der 5'-DI durch präferentielle T4-Substratbindung, Nicht-Inhibierbarkeit durch PTU, konträres Aktivitätsmuster bei Hypo- und Hyperthyreose sowie eigenem Verteilungsmuster in den Geweben. Bei Nagern liegt die stärkste Expression in ZNS, Hypophyse und braunem Fettgewebe vor (Visser TJ et al. 1983), während beim Menschen Aktivität auch in Schilddrüse, Skelettmuskel, Herz und Plazenta für die auf Chromosom 14q24.3 lokalisierte 5'-DII nachgewiesen wurde (Celi FS et al. 1998). Die Bedeutung der 5'-DII liegt in der lokalen, gewebsspezifischen T3-Homöostase. Damit ist eine

Unabhängigkeit vom zirkulierenden T3 gewährleistet, was auch beim Nieder-T3-Syndrom zum Ausdruck kommt. Die Diskussion, ob die 5'-DII tatsächlich ein Selenoprotein ist, hält aufgrund konträrer Befunde gegenwärtig noch an (Köhrle J 2000).

#### **1.5.4.3 TypIII 5-Deiodase (5-D)**

Die 5-D fungiert als Inaktivierungsenzym für SDH durch Deiodierung am Tyrosylring von T3 und T4. Während der Vertebratenentwicklung wird 5-D in fast allen untersuchten Geweben exprimiert, beim adulten Erwachsenen ist die Expression offensichtlich auf Plazenta, Haut und ZNS beschränkt (Croteau W et al. 1995). Während im Nieder-T3-Syndrom keine Änderung der Enzymaktivität beobachtet wurde, gleicht die Regulation in Hyper- und Hypothyreose der 5'-DI. In den letzten Jahren konnte die Identifizierung von 5-D als Selenoprotein eindeutig belegt werden (Salvatore D et al. 1995, Köhrle J 2000).

#### **1.5.5 Selenoprotein W (SeW)**

SeW ist ein 9,5 kDa-Muskelprotein, das Selen-abhängig exprimiert wird (Vendeland SC et al. 1993; Yeh JY et al. 1995). SeW wurde in Skelett- und Herzmuskulatur, Milz, ZNS, Hoden und zahlreichen anderen Geweben gefunden (Behne D und Kyriakopoulos A 2001). Wegen der nachgewiesenen Bindung von GSH an SeW (Beilstein MA et al. 1996) und der erhöhten Resistenz SeW-überexprimierender Glia-Zellen gegenüber oxidativem Stress (Behne D und Kyriakopoulos A 2001) wird eine Redox-Funktion im Sinne der antioxidativen Zellprotektion postuliert. Ein Zusammenhang der SeW-Expression mit der „white muscle disease“, einer bei Schafen vorkommender Selenmangelkrankheit, wird diskutiert, ist aber noch nicht eindeutig geklärt (Whanger PD et al. 1977).

#### **1.5.6 Selenoproteine unbekannter Funktion**

Neben den aufgeführten Selenoproteinen wurden weitere beschrieben, deren Funktion noch unklar ist. Diese Selenoproteine fanden sich beispielsweise in Hoden, Spermatozoen, Prostata, Pankreas und anderen Geweben (Kyriakopoulos A et al. 1993; Behne D et al. 1995; Kalcklösch M et al.1995). Kürzlich wurde aus humanen T-Zellen ein neues 15 kDa-Selenoprotein (Sel15) kloniert. Das Gen ist auf Chromosom 1p31 lokalisiert und wird als mRNA in zahlreichen humanen und Ratten-Geweben, insbesondere aber in Schild- und Nebenschilddrüse sowie Prostata exprimiert. Die Funktion von Sel15 ist noch unklar (Gladyshev VN et al. 1998 (a), Behne D und Kyriakopoulos A 2001). Da der Genlocus von Chromosom 1p31 auch häufig beim Prostata-Karzinom mutiert ist, die Proteinmenge von

Sel15 in Zelllinien von Prostata- und Leberzellkarzinom signifikant verringert ist und die Proteinexpression von Nukleotid-Polymorphismen abhängt, könnte Sel15 in der Karzinogenese der Prostata eine wichtige Rolle einnehmen (Kumaraswamy E et al. 2000). Zusätzlich wurde ein 18 kDa-Selenoprotein (Sel18) beschrieben, welches an den mitochondrialen Membranen zahlreicher Organe bei Ratten zu finden ist. Es wird in der Hierarchie der Selenoproteine bevorzugt versorgt, seine Funktion ist jedoch noch unbekannt. Weitere beschriebene, unbekannte Selenoproteine werden mit zugehörigem Molekulargewicht tabellarisch aufgeführt (Behne D und Kyriakopoulos A 2001):

Selenoprotein (Kürzel)	kDa
SelR	12,6
SelT	18,8
SelN	58
SelX	16
SelZf1	48
SelZf2	48

## 1.6 Oxidative Zellschädigung

Protektion vor Zellschädigung durch reaktive Sauerstoffintermediate (ROI) ist eine postulierte Funktion für zahlreiche Selenoproteine. Die Entstehung von ROI steht normalerweise in einem Fließgleichgewicht mit ihrer Neutralisierung durch Antioxidanzien. Bei vielen Krankheitsprozessen entsteht im Zuge eines gestörten Gleichgewichts ein Überschuss an zytopathogenen ROI.

Bei der Reduktion von molekularem Sauerstoff im anaeroben Stoffwechsel können unterschiedliche hochreaktive ROI entstehen. Diese sind Superoxidanion-Radikale ( $O_2^{\bullet-}$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Hydroxylradikale ( $HO^{\bullet}$ ) oder Oxidradikale ( $O^{\bullet}$ ). Ebenso bilden sich Radikale durch Verbindung mit anderen Atomen: Alkoyl- ( $RO^{\bullet}$ ), Peroxyl- ( $ROO^{\bullet}$ ) oder Stickstoffmonoxid- ( $NO^{\bullet}$ ) Radikale. Als Quellen für die ROI-Bildung können die mitochondriale Atmungskette (als „Kurzschlussreaktion“ bei der  $O_2$ -Reduktion), oxidierende Enzymsysteme (z. B. Monoamino- und Xanthinoxidase, P450, peroxismale Enzyme, membranständige NADPH-Oxidasen), immunologische Reaktionen (phagozytierende Makrophagen und Monozyten), endogene PKC-Aktivierung durch Zytokine und exogene Stimulation durch Zigarettenrauch und ionisierende Strahlen angeführt werden.

Zellmembranen mit den an mehrfach ungesättigten Fettsäuren reichen Phospholipiden sind besonders durch ROI gefährdet, da Lipidperoxidationsprodukte (z. B. Malondialdehyd und 4-

Hydroxynoneal) stark zytotoxisch und genotoxisch wirken. Zusätzlich kann Lipidperoxidation die Permeabilität der Zellmembran sowie die Aktivität bzw. Bindungskapazität von membranständigen Enzymen und Rezeptoren modifizieren. Dadurch bedingter Calcium-Influx kann einerseits die Zelle aktivieren, andererseits die Apoptose induzieren (Krämer K et al. 1996). Endpunkte der zytopathogenen Effekte von ROI in Zellkulturmodellen sind DNA-Strangbrüche (Shacter E et al. 1988; Breen AP und Murphy JA 1995) oder Genommutationen (Weitzman SA und Stossel TP 1981). Organische Koprodukte der ROI wie Chloramine, Aldehyde oder Peroxyl-Radikale haben eine eigene, zusätzlich mutagene Wirkung (Imlay JA et al. 1988). Durch ROI induzierte, maligne Transformationen wurden in kultivierten Mäusefibroblasten nachgewiesen (Weitzman SA et al. 1985 (a); Nassi-Calo L et al. 1989). ROI-induzierte, chromosomale Schäden wie Chromosomenbrüche oder Chromatidentausch treten bei Mangel an intrazellulären GSH verstärkt auf (Weitberg AB et al. 1983; Weitzman SA et al. 1985 (b); Kozumbo WJ et al. 1987). Bevorzugter genomischer Angriffspunkt von Hydroxylradikalen ist die Base Guanin unter der Bildung von 8-Hydroxyguanin, was zu Basenfehlpaarungen bei der Replikation führt. Im Harn nachgewiesenes 8-Hydroxyguanin gilt als Marker für genotoxischen Stress, z. B. im Rahmen von sportlicher Dauerbelastung. ROI haben andererseits auch proliferative Effekte, wie z. B. die NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Dieser redoxsensitive Transkriptionsfaktor reguliert u. a. die Genaktivierung proinflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) und ist bei Selenmangel hochreguliert. Für ROI sind auch die Aktivierung der Protoonkogene c-fos und c-junc sowie des Tumorsuppressorgens p53 nachgewiesen (Krämer K et al. 1996).

## **1.7 Antioxidantien**

Neben den antioxidativ wirkenden Selenoproteinen verfügen Zellen über zahlreiche andere antioxidative Schutzsysteme. Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien zählen beispielsweise  $\alpha$ -Tocopherol,  $\beta$ -Carotin, Ascorbat und Urat. Als Vertreter der enzymatischen Antioxidantien sind die Katalase und die Superoxiddismutasen zu nennen.  $O_2^{\bullet-}$  wird durch die Superoxiddismutasen im Zytosol (Kupfer/Zink-abhängig) oder in den Mitochondrien (Mangan-abhängig) in  $H_2O_2$  umgewandelt. Die Eisen-abhängige Katalase überführt (bei hoher  $H_2O_2$ -Konzentration) Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff.

## 1.8 Antioxidativer Schutz durch Selenoproteine

Der Mechanismus der antioxidativen Wirkung von GPx ist inzwischen gut erforscht. GPx katalysiert die Oxidation von durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduziertem GSH bereits bei niedriger  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration (Sies H 1997) wie folgt:



GPx-Substrate sind  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Peroxylradikale ( $\text{ROO}^\bullet$ ), die aus, durch oxidativen Abbau ungesättigter Fettsäuren entstehenden Lipidhydroperoxiden bestehen. GPx reduziert keine Organoperoxide (ROOR) (Flohé L et al. 1973), die wiederum GSH reduzieren und dieses somit zum direkten GPx-Kosubstrat machen. Die hohe GSH-Konzentration (0,5-12 nM) vieler Zellen ist vermutlich durch seine Rolle als nicht-toxische Speicherform von Cystein, das vergleichsweise mehr reaktive Sulfhydroxylgruppen integriert hat, bedingt. Die GSH-Konzentrationen können die Cystein-Konzentrationen in unterschiedlichen Geweben um den Faktor 10-100 übersteigen. Die GSH-Wirkung erklärt sich durch die Protektion der enzymatischen Thiolgruppen durch SH-Gruppen.

Das Reaktionsprodukt GSSG erfährt eine Rückreduktion durch die Glutathion-Reduktase (GSH-Red.) unter  $\text{NADPH}/\text{H}^+$ -Oxidation durch Elektronenübertragung über  $\text{FAD}^+$  (Thieme R et al. 1981) wie folgt:



Biosynthese und Abbau von GSH erfolgen über den  $\gamma$ -Glutamylzyklus (Meister A und Anderson ME 1983). Nach S-Konjugat-Bildung durch spezielle Glutathion-S-Transferasen (GST) wird GSH zu Mercaptursäuren metabolisiert und ausgeschieden (Cooper AJL und Kristal BS 1997). Mehrere GST-Isoenzyme üben eine GSH-abhängige Peroxidasefunktion zur Reduktion von Lipid-Peroxiden aus (Nicholson DW 1993). Neben der Detoxifikation besitzt GSH noch weitere Funktionen wie z. B. die GSH-abhängige Reduktion als ersten Schritt im Metabolismus anorganischer Selen-Verbindungen (z. B. Selenit).

Auch die TrxR stellt im Synergismus mit Trx eine wichtige Säule des zellulären Redox-Systems dar. Oxidiertes Trx ( $\text{Trx-S}_2$ ) erhält über TrxR-Katalysierung mit  $\text{NADPH}/\text{H}^+$  als Donor Elektronen.

Die Hypothese der SeP-Bedeutung für das (extra-) zelluläre, antioxidative Defense-System beruht auf der Beobachtung des SeP-Schutzes gegen Paraquat-/Diquat-induzierte Leberzellnekrosen im Rattenmodell (Burk RF et al. 1995) sowie der Phospholipidhydroperoxid-Reduzierung in Gegenwart von GSH (Saito Y et al. 1999). Die nachgewiesene Neuroprotektion durch SeP im Zellkulturmodell (Yan J und Barrett JN 1998), der hohe Selenocystein-Anteil im Protein und der hohe Anteil am Plasmaselen stützen diese Annahme.

### **1.9 Die Bedeutung von Selen und Selenoproteinen für Entzündungsreaktionen am Beispiel der Gastritis**

Die Entzündungsreaktion nach Gewebsinfektion oder -traumatisierung findet als Akut-Phase-Reaktion statt. Die aktivierten Abwehrzellen wie Blutmonozyten, Gewebsmakrophagen und Granulozyten setzen im Zuge der Phagozytose ROI, aber auch Zytokine zur Modulation und Koordination der Abwehrreaktion. Lokalen Wirkungen wie Endothel-vermittelter Diapedese-Steigerung und Vasodilatation stehen generalisierte Effekte wie z. B. Fieber durch Aktivierung hypothalamischer Regulationen oder die hepatische Sekretion von Akut-Phase-Plasmaproteinen gegenüber. Die klinischen Beobachtungen, dass Patienten mit schweren Infektionen, chronischen rheumatischen Erkrankungen (z. B. Kashin-Beck- und Keshan-Krankheit) oder schlechtem Allgemeinzustand niedrige Selenplasmaspiegel aufweisen, deuten auf eine Beteiligung von Selen/Selenoproteinen bei Entzündungsreaktionen hin.

Im Zellkultursystem konnte gezeigt werden, dass die DNA-Bindung von AP1, einem Redox-regulierten Transkriptionsfaktor, vom Selenstatus der Zellen beeinflusst und durch oxidativen Stress verstärkt wird. Auch konnte eine Verringerung der hepatischen SeP-Transkription durch INF- $\gamma$  und LPS in Zellkultursystemen und Tierversuchen gezeigt werden (Dreher I et al. 1997 (a)). Bei Patienten mit schwerer Sepsis/SIRS sind vermindertes Serumselen und GPx-Aktivität beschrieben. Diese Defizienz - ob sie primär oder sekundär entsteht, ist unbekannt - wiegt pathophysiologisch in mehreren Aspekten schwer. Zum einen erfordert die vermehrte Radikalenbildung durch neutrophile Granulozyten eine verbesserte Protektion vor Lipidmembran-Oxidation, zum anderen optimiert Selen die Funktion verschiedenster Komponenten des Immunsystems (Phagozytose, Aktivität von NK-Zellen, Proliferation von T-Lymphozyten und Thymozyten, Reduktion der T-Supressorzellen, Steigerung der Immunglobulinsynthese, Induktion der IL-2-Rezeptor-Expression) (Krämer K et al. 1996, Gärtner R und Angstwurm M 1999).

Die Entzündung der Magenschleimhaut (Gastritis) ist ein häufig diagnostiziertes Krankheitsbild. Die exakte Diagnose kann nur durch eine histopathologische Beurteilung erfolgen. Hierbei wird die Gastritis in die seltene, akute und die häufige, chronische Form unterteilt. Der chronischen Form liegen unterschiedliche Ursachen zugrunde. Mit zunehmenden Erkenntnissen über die einzelnen, pathophysiologischen Kaskaden mehren sich die Hinweise für multifaktorielle Geschehen, welche die entsprechenden histologischen Gastritis-Formen bedingen. Da einige pathophysiologische Prozesse, die den drei Gastritis-Manifestationen (Typ A: Ak gegen gastrale Belegzellen  $\approx$  Autoimmunpathologie; Typ B: HP assoziiert  $\approx$  Infektion; Typ C: chemische Noxe  $\approx$  Zytotoxizität) vorausgehen, bei anderen chronischen Krankheitsprozessen (z. B. rheumatoide Arthritis, Hashimoto-Thyreoditis) im Zusammenhang mit Selenmangel bzw. reduzierter Aktivität von Selenoproteinen stehen, sollte untersucht werden, ob Selen/Selenoproteine auch bei der Pathophysiologie der Gastritis eine Rolle spielen. Bis zu diesem Zeitpunkt gab es zu dieser Fragestellung weder klinische noch experimentelle Daten. Die mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* (Hp)-assoziierte Gastritis ist für diese Fragestellung wegen ihrer Rolle als postulierte fakultative Präkanzerose bei der Entstehung des Magenkarzinoms von großem Interesse.

### **1.10 Die Bedeutung von Selen und Selenoproteinen in der gastrointestinalen Tumorpathogenese**

Nach den heutigen Erkenntnissen wird die Tumorentstehung in die drei Stadien Initiierung, Promotion und Progression unterteilt. ROI sind in allen Stadien beteiligt. Unter der Initiierung wird die primäre DNA-Mutation, z. B. in Form von ROI-induzierten Basenschäden oder Strangbrüchen, verstanden. Die Aktivierung von Signaltransduktionsketten durch ROI und der damit verbundene Proliferationsreiz kann zur klonalen Expansion initiiert Zellen (Promotion) führen. Die Progression stellt schließlich die Alteration (z. B. ROI-bedingte DNA-Mutation) von noch kontrollierter Proliferation in die unkontrollierte Neoplasie dar.

Der Zusammenhang zwischen individueller Selenversorgung und gastrointestinalen Tumoren wird durch Daten molekularbiologischer, tierexperimenteller, epidemiologischer und klinischer Untersuchungen gestützt. In kultivierten Hepatomzellen vermochte Natrium-Selenit die c-fos-Expression steigern und die c-myc-Expression reduzieren. Beide nukleären Onkogene werden in der sequenziellen, molekularen Karzinogenese entgegengesetzt reguliert, wobei eine verstärkte c-myc-Genexpression mit zellulärer Entartung, eine gesteigerte c-fos-Genexpression hingegen mit verbesserter Zelldifferenzierung einhergeht (Schnauzer GN 1997). In einer humanen Kolon-Karzinomzelllinie induzierte Natrium-Selenit

konzentrationsabhängig die Differenzierung und Apoptose der Zellen (Stewart MS et al. 1997).

Im Rattenmodell wurde gezeigt, dass Selen-arm ernährte Tiere nach Injektion von MAM oder DMH vermehrt nukleäre Schäden in den Zellen der Kolon-Mukosa aufwiesen (erhöhter Karyorhexis-Index) (Nelson RL et al. 1996). Selen-supplementierte Ratten entwickelten nach Verabreichung von DMH oder DMBA signifikant weniger Kolonkarzinome als Selen-arm ernährte Tiere (El-Bayoumy K et al. 1995; Jao SW et al. 1996). Die verbesserte Protektion vor AOM-induzierten Kolonkarzinomen bei Selen-supplementierten gegenüber Selen-defizienten Ratten ging mit gesteigerter mukosaler GPx-Aktivität einher (Reddy BS et al. 1994). Bei Mäusen mit einer DMH-Resistenz gegenüber induzierten Kolonkarzinomen fand sich eine erhöhte GPx-GI-mRNA Expression im Vergleich zu DMH-sensiblen Mäusen, welche Neoplasien im Kolon entwickelten. In dieser Studie wurde das GI-GPx-Gen *gpx2* in Nachbarschaft bekannter Tumorsuszeptibilitätsgene lokalisiert (Chu FF et al. 1997).

Retrospektive epidemiologische Studien (basierend auf Blutselenwerten oder errechneter alimentärer Selenaufnahme) zeigten eine inverse Korrelation zwischen Selenstatus und der Tumormortalität unterschiedlichster Tumorentitäten, darunter auch Kolon- und Rektumkarzinom (Schrauzer G et al. 1977). Diese inverse Korrelation wurde auch in Gebieten mit ausreichender bzw. defizienter Selenversorgung für die Inzidenz kolorektaler Neoplasien gefunden (Janson B 1985). Bei einer in zahlreichen chinesischen Provinzen, durchgeführten Untersuchung der Selen-Konzentrationen im Plasma fand sich wiederum eine inverse Korrelation zwischen Selenstatus und der Prävalenz von Magen- und Ösophaguskarzinom (Yu SY et al. 1985). In einer weiteren Studie fanden sich bei Patienten mit gastrointestinalen Neoplasien signifikant erniedrigte Selen-Konzentrationen im Plasma (Gupta S et al. 1994). Aus Magenbiopsien gewonnenes Gewebe wies bei neoplastischer Alteration geringere Selen-Konzentrationen als unauffällige Magenschleimhaut auf (Burguera JL et al. 1995). In einer prospektiven epidemiologischen Untersuchung in den Niederlanden hatten klinisch unauffällige Personen mit Selenmangel (gemessen am Selengehalt in Nagelproben) ein signifikant erhöhtes Risiko zur späteren Erkrankung an einem Magenkarzinom (van den Brandt PA et al. 1993). Erniedrigter Selengehalt in Nagelproben wird auch mit einem erhöhtem Risiko zur Erkrankung an Prostata- und Bronchialkarzinomen assoziiert (Schrauzer GN 2000 (b)).

Eine prospektive Interventionsstudie in China erreichte durch Selensupplementierung eine signifikante Senkung der Inzidenz des primären Leberzellkarzinoms (Yu SY et al. 1989). In einer weiteren chinesischen Interventionsstudie konnte durch die kombinierte Substitution

von Selen,  $\beta$ -Karotin und Vitamin E über 5 Jahre die Inzidenz an Magen- und Ösophaguskarzinom signifikant reduziert werden (Blot WJ et al. 1993). In einer multizentrischen, prospektiven, randomisiert-doppelblinden und placebo-kontrollierten Interventionsstudie in den USA führte die tägliche Gabe von 200  $\mu$ g Selen über einen Zeitraum von durchschnittlich 4,5 Jahren zu einer signifikanten Erniedrigung der Gesamtinzidenz an Tumorerkrankungen und der Tumormortalität. Die Rezidivrate an nicht-Melanom-Hautkrebs als primäres Studienziel blieb hierbei unverändert, hingegen fand sich eine signifikante Senkung der Inzidenz an Lungen-, Prostata- Kolon- und Rektumkarzinom in der Selengruppe gegenüber der Kontrollgruppe (Clark LC et al. 1996).

### **1.11 Östrogene und gastrointestinale Tumorphathogenese**

Die bei weitem größte Zielgruppe für den therapeutischen und präventiven Einsatz von oralen Östrogenderivaten stellen prä- und postmenopausale Frauen dar. Als Indikationen für den prämenopausalen Einsatz gelten die orale Kontrazeption, für den postmenopausalen therapeutischen Einsatz typische Östrogen-Mangel assoziierte Symptome wie Hitzewallungen, depressive Verstimmungen, genitale Schleimhautatrophie u. a. Der präventive Einsatz dient der Reduzierung der Inzidenz, Morbidität und Mortalität der Osteoporose sowie der Reduzierung kardiovaskulärer Ereignisse. Bei langjährigem, alleinigem Einsatz von Östrogenen wurde jedoch eine erhöhte Inzidenz an Endometriumkarzinomen gefunden. Ob Östrogene die Inzidenz des Mammakarzinoms leicht erhöhen, ist aufgrund der widersprüchlichen Datenlage noch nicht endgültig geklärt. Zahlreiche prospektive Studien konnten ebenso zeigen, dass die langjährige orale Östrogen-Substitution (ERT) zu einer starken Reduktion der Inzidenz und Mortalität kolorektaler Karzinome führt (Calle EE et al. 1995). In Plasmauntersuchungen bei postmenopausalen Frauen konnte gezeigt werden, dass ERT den antioxidativen Status verbessern sowie die Lipoperoxid-Konzentration senken kann (Leal M et al. 2000). Auch konnte eine Östrogenbedingte IGF-1-Senkung im Plasma nachgewiesen werden. IGF-1 ist ein mit der kolorektalen Tumorentstehung assoziiertes Mutagen (Grodstein F et al. 1999). In vitro Versuche mit der gastrointestinalen Tumorzelllinie MC-26 (Maus) zeigten, dass Östrogen die ER-Genexpression direkt hochreguliert (Xu X und Thomas ML 1994). In Caco 2-Zellen konnte eine direkte proliferative Wirkung von Östradiol über die ER-Komplex-vermittelte Aktivierung von Genen der MAP- und Tyrosin-Kinasen-Familie nachgewiesen werden (Di Domenico M et al. 1996). Für einige Östrogen-responsive Tumoren ist eine zugrundeliegende Mutation der BRCA1/2-Gene beschrieben, welche mit hoher Penetranz zu einer Neoplasie im betroffenen Gewebe führen. Das BRCA 1-Genprodukt inhibiert die Transkriptions-

Aktivierung des ER- $\alpha$ , eine entsprechende Mutation führt zum Kontrollverlust der östrogenvermittelten Proliferation (Fan S et al. 1999). Erste experimentelle Hinweise über eine Interaktion von Selen und dem Steroid-Metabolismus ergaben sich aus der Beobachtung, dass Selen-arm ernährte Ratten eine verminderte Transkription der hepatischen Östrogen-Sulfotransferase (EST) mRNA zeigten (Yang Q und Christensen MJ 1998).

Als kanzeroprotektive Mechanismen von Östrogen werden die verminderte Gallensäure-Produktion in vivo und die in vitro beobachtete Hemmung der Zellproliferation angeführt. Tamoxifen, ein nicht steroidaler Östrogen-Antagonist, nimmt als die meist verordnete Substanz in der Therapie des Mammakarzinoms eine zentrale Stellung ein. Die Tamoxifen-Gabe beim ER-positiven Mammakarzinom ist durch die häufige Resistenzentwicklung gegen das Medikament zeitlich limitiert. Neben der Haupteigenschaft als Östrogen-Antagonist ist auch eine Östrogen-agonistische Wirkung bekannt. Letzteres spiegelt sich in der erhöhten Inzidenz des Endometriumskarzinoms unter Tamoxifen-Therapie wieder. In den bisher wenigen Studien über den Zusammenhang von Tamoxifen und kolorektalem Karzinom zeigt sich eine Erhöhung des relativen Risikos für die Entwicklung kolorektaler Karzinome (Grodstein F et al. 1999). ICI 182,780 ist ein Östradiol-Analogen ohne agonistische Aktivität. Das Fehlen der proliferativen Komponente wirft die Frage nach differenzierter Gen-Aktivierung, in diesem Fall der Selenoproteine, auf. In MCF-7-Zellen - eine Mammakarzinomzelllinie - übertraf ICI 182,780 Tamoxifen in der Wachstumsinhibition der Tumorzellen deutlich (Wakeling AE und Bowler J 1992).

### **1.12 Das kolorektale Adenom als gastrointestinale Präkanzerose**

Das kolorektale Adenom stellt histopathologisch eine durch Zellatypien, zelluläre Reifungsstörung und eine veränderte Zellarchitektur bedingte, epitheliale Neoplasie ohne invasive Komponente dar. Die kolorektalen Adenome werden als fakultative Präkanzerose eingestuft. Durch Vogelstein wurde das Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz postuliert (Fearon ER und Vogelstein B 1990). Dabei ist das Adenom ein Zwischenstadium in der Entwicklung vom anfänglich hyperproliferativen Epithel zum Karzinom. Exogene und endogene Faktoren im und am Epithel bedingen die Adenom-Entstehung. Im Zuge genomischer Schäden bei einer hohen epithelialen Proliferationsquote kommt es zu einer Aktivierung von Onkogenen sowie Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Von diesen sporadischen Adenomen sind die weitaus selteneren, obligat präkanzerösen Adenome der autosomal-dominant vererbten Adenomatosis coli zu unterscheiden. Für deren hohes Malignitätspotential zeichnet sich eine Mutation im APC-Tumorsuppressorgen verantwortlich

(Miyoshi Y et al. 1992). Die Prävalenz der sporadischen Adenome ist in den Industrieländern mit hohem Lebensstandard am höchsten und korreliert mit der Karzinominzidenz (Eide TJ 1986). Durch Studien belegte, protektive, exogene Faktoren im Sinne einer Chemoprävention sind ASS sowie andere nichtsteroidale Antirheumatika (NSAIDs), Folsäure, Calcium und Östrogene (Janne PA und Mayer RJ 2000). Exogene Faktoren, welche die Entstehung von kolorektalen Karzinomen begünstigen sind u. a. fettreiche und faserarme Ernährung, Übergewicht und langjähriger Nikotin- und Alkoholabusus. Der Vorgang der direkten und indirekten (z. B. über Lipid-Peroxide) DNA-Schädigung ist nunmehr integraler Bestandteil allgemeiner Karzinogenese-Modelle (Marnett LJ 2000) wie auch bei der kolorektalen Karzinogenese (Babbs CF 1990). Enzymatischen und nicht-enzymatischen, antioxidativen Systemen wird wiederum eine wichtige Funktion in der Kanzeroprotektion des Gasrointestinaltrakts zugeschrieben (Beno I et al. 1995).

### **1.13 Fragestellung**

Ein direkter und indirekter Zusammenhang zwischen nutritiver Selenversorgung und der Inzidenz gastrointestinaler Malignome wurde durch zahlreiche publizierte, epidemiologische, tierexperimentelle und klinische Daten aufgezeigt. Zum Zeitpunkt der Durchführung der in dieser Arbeit aufgeführten Experimente gab es bezüglich der Lokalisation und der Funktion gastrointestinaler Selenoproteine nur wenige, zumeist aus Tiermodellen gewonnene Daten. Ziel dieser Arbeit ist es, durch die erstmalige Ermittlung eines Verteilungsmusters der Selenoproteine im menschlichen Gastrointestinaltrakt potentielle Repräsentanten der lokalen Tumorprotektion zu identifizieren. Weiterhin soll in der vorliegenden Arbeit in einer Art von „Screening-Untersuchung“ geprüft werden, ob verschiedene gastrointestinale Erkrankungen mit Veränderungen der molekularen Expression von Selenoproteinen einhergehen, welche gastrointestinale Zelllinie ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Expressionsregulationen sein könnte und ob Östrogen auf molekularer Ebene mit Selenoproteinen interagiert. Im Einzelnen sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Welche Selenoproteine sind auf mRNA-Ebene im menschlichen Gastrointestinaltrakt nachweisbar? Erschließen sich aus dem Verteilungsmuster in den gastrointestinalen Kompartimenten neue Hinweise über mögliche Funktionen der detektierten Selenoproteine?
- 2) Stehen entzündliche und prä maligne Läsionen des menschlichen Gastrointestinaltrakts in direktem oder indirektem Zusammenhang mit veränderter Expression einzelner

Selenoproteine? Lassen sich daraus neue pathophysiologische oder pathobiochemische Erkenntnisse gewinnen?

- 3) Eignen sich die humane Kolonkarzinomzelllinie Caco 2 und Magenkarzinomzelllinie ST 23132 als Modell zur Untersuchung der Regulierung der Genexpression verschiedener Selenoproteine?
- 4) Welche transkribierten Selenoproteine werden auch zu Proteinen translatiert? Ist bei der Translation gastrointestinaler Selenoproteine eine Hierarchie erkennbar?
- 5) Beeinflussen Östrogen oder Östrogen-Antagonisten die Genexpression der Selenoproteine und könnte sich damit die kanzeroprotektive Östrogenwirkung zumindest teilweise erklären lassen?

## **2. Materialien und Methoden**

### **2.1 Lösungen und Puffer**

#### **Acrylamid-Stammlösungen:**

44,4 % Acrylamid: Bisacrylamid: 49:1

44,4 % Acrylamid: Bisacrylamid: 150:1

#### **Auftragspuffer**

Bromphenolblau (w/v), 0,25 %

Xylencyanol (w/v), 0,25 %

Glycerin (w/v), 30 %

1 mM EDTA

#### **Entfärbelösung**

30 ml Methanol

25 ml Glycerin 87 %

200 ml Wasser

#### **Ethidiumbromid Stammlösung**

10 mg/ml Ethidiumbromid

#### **Färbestammlösung (10 x)**

0,1 % Coomassie Blue 250R

50 % Methanol

10 % Essigsäure

40 % Wasser

#### **Formaldehyd-Gel-Laufpuffer für RNA**

21 % Formaldehyd pH 4

50 % Formamid (deionisiert)

15 % 10 x MOPS

14 % Loadingbuffer

### **Formaldehyd-Gel- Loadingbuffer**

0,22 M MOPS

0,01 M EDTA

0,05 M NaAc, pH 7

### **Gel für RNA-Elektrophorese**

1,2 % Agarose

1/30 Formaldehyd

1 x MOPS

0,5 µg/ml Ethidiumbromid

### **GTC-Lösung**

4 M Guanidinthiocyanat

0,5 % Na-Lauryl-Sarcosin

0,25 mM Natriumacetat (pH 7)

0,1 M 2-Mercaptoethanol

Filtration durch Whatman Papier

### **Homogenisationspuffer**

250 mM Saccharose

20 mM HEPES

1 mM EDTA

1 mM Dithiothreitol, pH 7,4

### **Lowerbuffer**

25 mM Tris

190 mM Glycin

### **10 x Mops**

0,2 M Morpholinopropansulfonsäure

0,5 M EDTA

50 mM Natriumacetat pH 8,0

**PBS**

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4

**Prähybridisierungslöung**

20 % deionisiertes Formamid

1 % SDS

1 M NaCl

10 % Dextransulfat

100 µg/ml Hitze denaturiertes (100 °C) Lachs-Sperma DNA

**Probegel**

1 % Agorose

1 x TBE

0,5 µg/ml Ethidiumbromid

**Protein-Größenmarker**

P-1677 Proteinmarker (26,6-116,0 kDa) (Sigma)

6001 LA Proteinmarker (14,3-200 kDa) (Gibco)

**RNA-Größenmarker**

1 kb RNA-Leiter (0,24-9.5 kb) von Gibco

**Sammelgelpuffer (4-fach)**

500 mM Tris

0,4 % SDS, pH 6,8

**20 x SSC**

3 M NaCl

0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0

**20 % SDS**

20 % (w/v) in DPC-H<sub>2</sub>O

**SDS-PAGE-Probenpuffer**

100 mM Tris

1 % Lithiumdodecylsulfat

0,1 %, Glycerin

0,1 % Mercaptoessigsäure

0,0005 % Bromphenolblau, pH 6,8

**TBE**

0,09 M Tris-Borat

0,002 M EDTA, pH 8,3

**TBS**

50 mM TrisHCl

0,15 M NaCl, pH 7,5

**TE**

10 mM Tris/HCl

1 mM EDTA, pH 8,0

**Trenngelpuffer (4-fach)**

3 M Tris

0,4 % SDS, pH 8,8

**Upperbuffer (4-fach)**

112 mM Tris

760 mM Glycin

0,4 % SDS

**2.2 EDV**

Hardware: Acer TravelMate 512T; HP Laser Jet

Software: Word 7,0; Exel 7,0; Bioprofil Kodak

## **2.3 Verwendete Zellen und Gewebe**

### **2.3.1 ST 23132**

Die humane Magenkarzinomzelllinie ST 23132 wurde aus einem gut differenzierten Adenokarzinom des Magens (Karzinom vom intestinale Typ (Klassifikation nach Lauren)) eines 72-jährigen männlichen deutschen Patienten isoliert (Vollmers HP et al. 1993). Die Zelllinie ST 23132 wurde freundlicherweise von Herrn Dr. A. Greiner (Pathologisches Institut der Universität Würzburg; Direktor: Prof. Dr. H.-K. Müller-Hermelink) zur Verfügung gestellt.

### **2.3.2 Caco 2**

Die humane Kolon-Karzinomzelllinie Caco 2 (ATCC Nr. HTB37) wurde aus einem primären Kolon-Adenokarzinom eines 72jährigen Kaukasiers isoliert (Jumarie C und Malo C 1991).

## **2.4 Quergestreifte Muskulatur der Ratte**

Das Material wurde freundlicherweise von Fr. Dr. A. Baur zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um Teile des M. quadriceps femoris der Ratte (Sprague-Dawley, adult, ♂).

## **2.5 Zellkultur**

Es wurden Brutschränke und Zellkultureinheiten der Firma Haereus benutzt. Die Caco 2-Zellen wurden für die Stammerhaltung bei 37 °C in feuchter Atmosphäre (5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luft) in 75 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflaschen (Falcon) kultiviert.

Die Zellen wurden alle 3 bis 4 Tage mit frischem Medium versorgt. Bei Konfluenz wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA Lösung für 3-5 min. inkubiert und vom Flaschenboden abgelöst.

Die Zellen wurden mit 5 ml Medium vom Boden ab gespült und in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt. Das zellhaltige Medium wurde im entsprechenden Volumen Zellkulturmedium resuspendiert und auf neue Kulturflaschen verteilt. Caco 2-Zellen

wurden in DMEM-Medium mit den Zusätzen 10 % FCS, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren, 0,4 mM HEPES, 1 mg/ml L-Glutamin kultiviert und im Verhältnis 1:40 gesplittet. Die ST 23132-Zellen wurden für die Stammerhaltung bei 37 °C in feuchter Atmosphäre, bestehend aus 7,5 % CO<sub>2</sub> und 92,5 % Luft in 75 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflaschen (Falcon) im RPMI-1640-Medium mit 10 % FCS, 1 % Gentamycin und 1 mg/ml L-Glutamin, versetzt und kultiviert. Die Zellen wurden nach 3 (1:5 Splitting) bis 4 (1:10 Splitting) Tagen analog zu den Caco 2-Zellen gesplittet oder geerntet.

## **2.6 Metabolische Markierung der Zellen mit <sup>75</sup>Se unter Pulse Chase-Bedingungen und Proteinanalyse im SDS-Polyacrylamidgel**

### **2.6.1 Markierung von Caco 2- und ST 23132-Zellen mit <sup>75</sup>Se**

Caco 2- und ST 23132-Zellen wurden in den entsprechenden Medien kultiviert und vor den Versuchen mehrere Tage bei 2 % FCS (Caco 2) und 5 % FCS (ST 23132) kultiviert (zur Adaptation an Selen-arme Bedingungen) und letztlich in Selen-freies (gleichbedeutend FCS-freies) Kulturmedium überführt. Nach 16 h (Caco 2) bzw. 12 h (ST 23132) in Selen-Depletion – unter der Annahme, dass in diesem Zeitraum das noch vorhandene Selen metabolisiert wurde – erfolgte die Zugabe von Natrium-<sup>75</sup>Se-Selenit (spezifische Aktivität 1,9 Ci/μg; bezogen von Research Reaktor Facility Univ.of Missouri Columbia, USA), um eine Endkonzentration von 10 nM zu erhalten.

#### **2.6.1.1 Pulse Chase**

Radioaktive Moleküle (*pulse*=Impuls) werden über einen kurzen Zeitraum den Zellen zur Verfügung gestellt, damit diese die Moleküle verwerten können. Anschließend erfolgt ein Ersatz der radioaktiven Moleküle durch nicht-radioaktive Moleküle (*chase*=Jagd). So kann radiographisch festgestellt werden, in welche Zellstrukturen die Moleküle mit Präferenz integriert werden. Im Pulse Chase-Experiment war die <sup>75</sup>Se-Selenit-Zugabe auf 1 h limitiert. Nach einem Mediumwechsel (mehrmaliges Waschen mit serumfreien Medium zur Auswaschung freier <sup>75</sup>Se-Moleküle) wurden die Zellen mit 100 nM „kaltem Selenit“ (= nicht radioaktiv) in FCS-freiem Medium über 23 h versorgt. Durch SDS-PAGE und Autoradiographie wurden die radioaktives Selenit enthaltenden Proteine dargestellt und mit den markierten Proteinen der über 24 h mit Natrium-<sup>75</sup>Se-Selenit inkubierten Zellen verglichen, um eine mögliche präferentielle Versorgung bestimmter Proteine mit Selenit zu beurteilen.

### **2.6.1.2 24 h-Inkubation mit <sup>75</sup>Se**

Bei dieser Methode erfolgte die Ernte der Zellen nach 24 h <sup>75</sup>Se-Selenit-Inkubation. In Kontrollversuchen wurden den Kulturmedien beider Zelllinien Insulin (5 mg/l) und Transferrin (40 mg/l) als FCS-Ersatz zugegeben (=IT-Medium). Zur Inhibierung von Proteasen wurde den Medien und Zellen nach der Aberntung in weiteren Kontrollversuchen 5 mM Pefabloc<sup>R</sup> SC (Merck 124839) zugesetzt.

Das Medium wurde abgesaugt und konserviert, um die sezernierten Selenoproteine untersuchen zu können. Nach mehrmaligem Waschen mit TBS erfolgte die Ernte der Zellen durch Zugabe von 500 µl 1 x SDS PAGE-Puffer und mechanischer Abtragung mit Cell-Scraper und Pipettus. Die darauf folgende Inkubation mit 20 U/ml Benzonase<sup>TM</sup> (Merck) über 1 h bei 37 °C diente der Hydrolysierung der Nukleinsäuren im Zellhomogenat.

### **2.7 Ex vivo Metabolisierung von Natrium-<sup>75</sup>Se-Selenit in Schleimhautbiopsien aus dem Gastrointestinaltrakt**

Zur Untersuchung des Einbaus von Selenit in verschiedene Proteine der gastrointestinalen Schleimhaut wurden Biopsien im Rahmen endoskopischer Eingriffe entnommen, in Medium überführt und darin 6 h, 21 h oder 45 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luft mit Natrium-<sup>75</sup>Se-Selenit inkubiert. Zellen und Überstände wurden mit SDS-PAGE nach Masse aufgetrennt und in anschließender Autoradiographie analysiert (s. 2.1.1).

### **2.8 Quantifizierung des <sup>75</sup>Se-Einbaus**

Zur Überprüfung des Einbaus von <sup>75</sup>Se in intra- und extrazelluläre Strukturen wurden einem 5 µl Aliquot des entsprechenden Zellhomogenats bzw. des Mediums 100 µl Aqua bidest. und 200 µl Ethanol zugegeben. Durch 15 min. Zentrifugation entstanden zwei Fraktionen (intrazelluläre Proteine und Zytosol bzw. extrazelluläre Proteine und Medium), die durch Umpipettierung des Überstandes in ein neues Cap aufgetrennt wurden. Die Messung der Aktivität in Pellet und Überstand erfolgte anschließend im γ-Counter (Canberra Packard Riastar). Die Summe der Aktivität (cpm) in den Pellets aus Zellhomogenat und Überstand entsprach prozentual dem <sup>75</sup>Se-Einbau in Proteine, die der Überstände dem nicht metabolisiertem <sup>75</sup>Se.

## **2.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

### **2.9.1 Theoretischer Hintergrund**

SDS ist ein anionisches Detergens, das an hydrophobe Regionen von Polypeptiden bindet und dadurch eine Dissoziation in Untereinheiten bei vielen multimeren Proteinen bedingt. Im Rahmen dieser Bindungsprozesse werden negative Ladungen, deren Anzahl mit den Molekulargewichten korrelieren, fixiert. Mercaptoessigsäure reduziert Disulfidbrücken unter Erhitzung zu Sulfhydrylgruppen und dissoziiert dadurch mit Disulfidbrücken verbundene Proteinuntereinheiten. Die Proteine können so mit der Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt werden. Diese Auftrennung erfolgt in Polyacrylamidgelen in einem Tris-Glycin-Puffersystem. Das Sammelgel dient der Konzentrierung der Proteine, um diese im Anschluß auf gleicher Linie im Trenngel laufen zu lassen.

### **2.9.2 Praktische Durchführung**

In dem Gießstand einer Biorad Protean II xi Cell Proteingelkammer wurden sukzessive Trenn- und Sammelgel gegossen. Zur Herstellung von 2 Gelen (16 %) wurden 12,2 ml Aqua bidest., 11,7 ml Acrylamid/Bisacrylamid 150:1 und 8 ml 4-fach Trenngelpuffer vermischt. Zur Polymerisation wurden 10,6 µl TEMED (BioRad) und 150 µl 10 % APS zugegeben. Nach Polymerisation des Trenngels wurde der durch Kondensation entstandene Wasserüberstand abgekippt. Anschließend wurde das Sammelgel gegossen (5,3 ml Aqua bidest.; 2,34 ml Acrylamid/Bisacrylamid 49:1; 2,6 ml 4-fach Sammelgelpuffer; 15,6 µl TEMED; 42 µl 10 % APS). Das Gel wurde in den mit Lower Buffer befüllten Puffertank gestellt und mit 1-fach Upper Buffer überschichtet (vor Gebrauch wurde der pH-Wert von 8,4 im 1-fach Upper Buffer mit 3 mM MAC (Sigma) eingestellt). Die viskösen Proteingemische wurden 5 min. gekocht, kurz auf Eis abgekühlt und in die Geltaschen pipettiert. Pro Geltasche wurden jeweils die gleiche Anzahl an cpm aufgetragen und mit Aqua bidest. die Volumenunterschiede ausgeglichen. Ergänzend wurden zwei Proteinstandards (6001 LA, Gibco; P-1677, Sigma) mit Proteingrößen zwischen 14,3 und 200 kDa. aufgetragen. Es erfolgte eine Elektrophorese bei 80 mA bis zum Erreichen der Sammelgelfront, im Anschluß 12 h bei 50 mA, um daraufhin die Spannung über 4 h auf 130 mA zu erhöhen, bis die Lauffront die untere Begrenzung des Trenngels erreicht hatte. Das Gel wurde für 3 h mit Coomassie Blue gefärbt und anschließend so lange entfärbt, bis die angefärbten Proteinbanden vom Hintergrund

unterschieden werden konnten. Es folgte eine zweistündige Trocknung des Gels 2 h bei 80 °C zwischen zwei Cellophanfolien im Gel-Trockner (BioRad). Zuletzt wurde das Gel auf einem Kodak X-OMAT-Film in einer mit Verstärkerfolien beschichteten Filmkassette (Kodak) bei -80 °C exponiert. Durch Vergleich des Autoradiogramms mit dem Coomassie-gefärbten Gel wurde die Größe der Selenit-markierten Proteinbanden ermittelt. Die Röntgenfilme wurden mit Hilfe des Bioprofil-Computer-Programms (Kodak) densitometrisch ausgewertet.

## **2.10 Northern Blot**

### **2.10.1 RNA-Extraktion**

Die angewandte Methodik zur RNA-Extraktion entspricht der Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion nach Chomczynski (Chomczynski P und Sacchi N 1987). Eine Modifizierung wurde lediglich auf quantitativer Ebene bei den chemischen Zusätzen vorgenommen.

#### **2.10.1.1 Zellkultur**

Nach dem Absaugen des Nährmediums erfolgte eine zweimalige Spülung mit je 10 ml PBS, anschließend eine Ablösung der Zellen mit 800 µl GTC-Lösung. Das viskose Gemisch wurde jeweils mit einem Cell scraper (Falcon) zentrisch zusammengekratzt und in eine sterile 2 ml Spritze (18 G Kanüle) aufgenommen. Die in ein 2 ml Eppendorf-Cap überführte Zellsuspension wurde mehrmals - zum Zwecke der mechanischen Zellyse - durch die Kanüle in die Spritze aufgezogen. Der Zellsuspension wurden schrittweise 36 µl 2 M Natriumacetat pH 4, 800 µl Phenol (TE-gesättigt) und 72 µl Chloroform/Isoamylalkohol zugeführt und jeweils gevortext. Nach 15 min. Kühlung (auf Eis) erfolgte die Phasentrennung der Suspension mittels Zentrifugation (10.000 g, 20 min., 4 °C). Die unterste Phase (entspricht der RNA-reichen, wässrigen Phase) wurde separat in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Cap umpipettiert, mit 1 ml Isopropanol versetzt und mehrere Stunden bei -20 °C gelagert. Das Präzipitat wurde erneut zentrifugiert (10.000 g, 20 min., 4 °C), der Überstand abgegossen. Das verbliebene RNA-Pellet wurde in 0,3 ml GTC-Lösung resuspendiert und erneut mit 1 ml Isopropanol mehrere Stunden bei -20 °C präzipitiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation (10.000 g, 20 min., 4 °C), Verwerfen des Überstandes, Zugabe von 1 ml 75 % Ethanol und erneute Sedimentation. Nach Abgießen des alkoholischen Überstandes wurde das RNA-Pellet in der SpeedVac (Univapo 150 H, Uniquip, Unijet II, Refrigerated Aspirator) vakuumgetrocknet und in 50

$\mu\text{l}$  Wassers gelöst. Die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde mit dem Uvicord III Photometer durchgeführt (s. 2.3.2). Das RNA-Konzentrat wurde bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert, um später weiteren Untersuchungen zugeführt zu werden.

#### **2.10.1.2 Biopsie-Gewebe**

Die Patienten, deren Gewebeproben in den Untersuchungen verwendet wurden, hatten vor dem jeweiligen endoskopischen Eingriff ihre schriftliche Einwilligung zum Verwendungszweck der geplanten Biopsien gegeben. Eine ausführliche mündliche Aufklärung war ergänzend durchgeführt worden. Die gewonnenen Gewebeproben (5 Biopsien aus einem anatomischen Abschnitt des Gastrointestinaltrakt pro Patient) wurden primär in flüssigem Stickstoff gefroren und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Verarbeitung wurden die Biopsien abgewogen und in ein steriles Glasgefäß überführt. Es wurde eine dem Biopsiegewicht entsprechende Menge an GTC-Lösung zugegeben und eine Homogenisierung des Gewebes mit dem Teflon-Potter (200 U/min., 1-2 min.) durchgeführt. Die folgende Extraktion entsprach dem Verfahren, welches für die Zellkulturen Anwendung fand (s. 2.3.1.1).

#### **2.10.2 Konzentrationsbestimmung von RNA**

Je  $1\ \mu\text{l}$  der gelösten RNA wurden  $499\ \mu\text{l}$  Ampuva zugesetzt und in Quarzküvetten im Uvicord III-Photometer gemessen. Als standardisierte Nullwertprobe wurden  $500\ \mu\text{l}$  Ampuva verwendet. Mit einem speziellen Messprogramm wurden die RNA-Konzentration und die Reinheit der RNA (errechnet durch den Quotienten aus den Absorptionswerten bei  $260\ \text{nm}$  und  $280\ \text{nm}$  (Sollwert 1,6-2,0)) bestimmt. Die gesamte RNA-Menge konnte durch Multiplikation mit dem Faktor 50 errechnet werden.

#### **2.10.3 Gelelektrophorese der RNA**

##### **2.10.3.1 Probegel**

$1\ \mu\text{g}$  Gesamt-RNA wurde in einem 1 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Laufkammer wurde mit  $1 \times$  TBE-Laufpuffer gefüllt. Das Probegel diente der optischen Beurteilung der RNA-Menge.

### **2.10.3.2 Blotgel**

Sämtliche Materialien waren vor Gebrauch mit RNAsen destruierenden Methoden (Elimination mittels 0,5 Mol/l NaOH-Bad) behandelt worden. Anschließend wurde das 1 % Formaldehyd-Agarosegel gegossen. 3,6 g Agarose wurden in 180 ml Ampuva aufgekocht und unter Schwenken aufgelöst. Nach leichter Abkühlung wurden 60 ml 5x Formaldehyd / MOPS Laufpuffer, 53,7 ml 37 % Formaldehyd und 7 µl Ethidiumbromid zugesetzt, um 300 ml in eine 13 x 25 cm Maxi-Gelkammer mit eingesetztem Kamm zu überführen. Nach Erhärtung des Gels wurde dieses in die mit 1 x MOPS-Laufpuffer gefüllte Gelkammer eingesetzt und somit vom Laufpuffer bedeckt. Jeder Probe (10-20 µg Gesamt-RNA) wurde 14 µl Laufpuffer zugegeben. Durch Konzentrationsunterschiede entstandene Volumendifferenzen wurden mit Ampuva ausgeglichen. Die nun volumenäquivalenten Proben wurden 15 min. im Wasserbad (65 °C) denaturiert und umgehend auf Eis gestellt. Danach wurde jede Probe in eine Geltasche pipetiert. In die erste Geltasche wurden stets 3 µl Weightmarker gegeben. Danach wurde die Gelelektrophorese über 12-14 h bei 30 V gefahren. Hierauf folgte das Baden wurde des Gels in 10 x SSC und Aqua dest., um das Formaldehyd auszuwaschen. Das Gel wurde unter UV-Licht fotodokumentiert und dem Diffusionsblotting zugeführt.

### **2.10.4 Diffusionsblot**

Über eine mit ca. 500 ml 10 x SSC gefüllte Glaswanne wurde eine Glasplatte gelegt. Ein in seiner Breite exakt der Breite des Gels angepasster Streifen Filterpapier wurde mit 10 x SSC durchtränkt und in Längsrichtung so über die Glasplatte gelegt, dass die beiden Enden des Streifens deutlich im 10 x SSC-Puffer hängen. Das Gel wurde mit seiner Oberseite in Längsrichtung auf den Filterstreifen platziert. Eine der Gelfläche exakt angepasste Nylonmembran (Hybond, Amersham) wurde in 10 x SSC getränkt und flächendeckend auf das Gel gelegt. Auf die Nylonmembran kamen mehrere Lagen (1. Lage in 10 x SSC getränkt!) Filterpapier (Whatman paper). Die Papierlagen wurden mit einer Glasplatte beschwert. Während des bis zu 14 h dauernden Diffusionsvorgangs wurden nasse Filterpapiere mehrmals durch neue, trockene ausgetauscht, um eine rasche Diffusion aufrecht zu erhalten. Danach wurde die Schichtseite (RNA-haltig) der Nylonmembran markiert und die Ribonukleinsäuren durch UV-Bestrahlung an die Membran fixiert. Unter der UV-Lampe (Visualisierung der RNA-Banden) wurde der Streifen mit der den Weightmarker führenden Bahn abgetrennt und an beiden Streifen durch seitliches Einschneiden

die Laufföhe der ribosomalen Banden (28 S und 18 S) markiert. Der Streifen mit dem Bandenmarker wurde gefärbt und in Folie eingeschweißt.

### **2.10.5. Northern-Hybridisierung mit cDNA**

Die RNA-enthaltende Nylonmembran wurde in eine Schraubflasche gegeben, welche mit 10-15 ml Prähybridisierungslösung (Rapid hybbuffer, Amersham oder selbst hergestellt (s. 2.1)) gefüllt worden war. Die Flasche wurde im Hybridisierungssofen unter gleichmäßiger Rotation über mind. 3 h bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde die jeweilige radioaktiv ( $\alpha^{32}\text{P}$ ) markierte cDNA-Sonde zupipettiert und die Hybridisierung über mindestens 6 h fortgeführt. Nach Entsorgung der radioaktiven Lösung wurden die Membranen mindestens 30 min. bei Raumtemperatur mit 2 x SSC, 1 % SDS gewaschen. Es folgten mehrere Waschschrirte unter steigender Temperatur (bis 75 °C), sinkendem Salzgehalt (bis 0,01 x SSC, 0,1 % SDS), sowie kürzeren Zeitintervallen. Die Variablen der Waschbedingungen (Temperatur, Salzgehalt, Zeit) unterschieden sich abhängig von der Sonde, der Membran und der Inkubationsdauer stark. Sobald mit dem  $\beta$ -Counter eine Signalformation, welche sich deutlich von den Umgebungssignalen der restlichen Membranfläche unterschied, detektiert werden konnte, wurde der Waschvorgang beendet und die feuchte Membran in Folie geschweisst. Schließlich wurde sie bei -80 °C in einer metallenen Filmkassette einem Kodak X-Omat- Film exponiert.

### **2.10.6 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden**

#### **2.10.6.1 Labeling mit „Rediprime Kit“ (Amersham)**

Es wurden für jeden Reaktionsansatz 25-50 ng der doppelsträngigen DNA-Sonden zu einer dem Sondenvolumen angepassten Ampuva-Menge (Gesamtvolumen: 45  $\mu\text{l}$ ) pipettiert.

Das die doppelsträngige DNA-Sonden enthaltende Gefäß wurde 5 min. im kochenden Wasserbad platziert, um eine Dissoziierung in Einzelstrang-DNA zu erreichen. Die umgehende Kühlung des Gefäßes auf Eis stabilisiert die Einzelstränge. Die Einzelstrangsonde wurde zusammen mit 50  $\mu\text{Ci} \cong 5 \mu\text{l}$  [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dCTP-Nukleotid (110 TBq/mmol) in ein „Rediprime Kit“-Gefäß gegeben und bei 37 °C 15 min. inkubiert.

#### **2.10.6.2 Reinigung der radioaktiven DNA-Sonde**

Nach dem Labeling wurden die Sonden durch Gelsäulen-Filtration von den freien, radioaktiven (dCTP) und nicht radioaktiven (dATP, dTTP, dGTP) Nukleotiden gereinigt. Die Säulen wurden in Eigenarbeit zusammengebaut. Hierbei wurde eine Insulinspritze (die

Nadelspitze war zuvor entfernt worden) mit Sephadex (Pharmacia), welches in TE-Puffer gelöst war, repetitiv aufgefüllt und zentrifugiert. Durch die Zentrifugation (1 min., 1000 rpm) konnte nicht gebundenes TE entfernt und eine funktionelle Sephadex G 25 Säule aufgebaut werden. Auf diese Säule wurden das Reaktionsgemisch und 2 x 50 µl TE („Laufpuffer“) gegeben und nach Zentrifugation (1 min., 1000 rpm) das Eluat konserviert. Von diesem wurden 2 µl entnommen und in 4 ml Szintillatorlösung (UltimaGold, Packard) pipettiert. Somit konnte in einem  $\beta$ -Counter (TRI-CARB 1600 TR, Canberra, Packard) die Aktivität (in cpm) gemessen werden. Mit diesem Wert wurde die spezifische Aktivität (cpm/ $\mu$ g DNA) errechnet. Für die Northern-Hybridisierung wurden 1.000.000 cpm für 1 ml Hybridisierungslösung eingesetzt.

### **2.10.7 Verwendete cDNA-Sonden**

Bei der Detektion der mRNA verschiedener Selenoproteine mittels Northern-Hybridisierung wurden folgende cDNA-Sonden verwendet: cGPx, GPx-GI, pGPx, SeP, TrxR1, SeW. Die cDNA-Sonde der cGPx bestand aus einem 850 bp langen DNA-Fragment einer Rattenleber (Ho YS et al. 1988). Die Sonde der GPx-GI (bp 1-971) wurde von Dr. F. F. Chu (Duarte, USA) bereitgestellt (Chu FF et al. 1993). Die TrxR1-Sonden bestanden aus einem 1,4 kb großen Produkt (über ddPCR konstruiert) oder alternativ aus einem 2,3 kb großen Produkt, welches über 5'-RACE konstruiert worden war. Beide TrxR1-Sonden wurden von Dr. N. Schütze zur Verfügung gestellt (Schütze N et al. 1998 (a)). Die SeW-Sonde (bp 1-758) wurde von Dr. M. Beilstein (Corvallis, USA) bereitgestellt (Vendeland SC et al. 1995). Die mit RT-PCR aus der mRNA von HepG2-Zellen klonierte SeP-Sonde stammte aus der Arbeitsgruppe von Prof. Köhrle. Für die reverse Transkription wurden die Primer ID1 (-33 bis -14 der humanen SeP-cDNA (Hill KE et al. 1991) und ID3 (875 bis 894) (E. Fekete, eigene Arbeitsgruppe) verwendet, die anschließende Amplifikation wurde mit PCR durchgeführt. Das RT-PCR-Produkt (927 bp) wurde in die SmaI-Schnittstelle von pBKSII+ eingefügt und das Plasmid in E.coli DH5 $\alpha$  transfiziert. Die cDNA-Sonde wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI ausgeschnitten (Dr. I. Dreher, eigene Arbeitsgruppe). Auch die pGPx-Sonde wurde durch Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe mit RT-PCR aus humaner Nieren-mRNA und HepG2-mRNA hergestellt. Die reverse Transkription erfolgte mit dem Primer pGPx antisense (536 bis 514) der humanen pGPx-cDNA (70 bis 90) (Yoshimura S et al. 1994), die Amplifikation mit PCR. Nach der Gelelektrophorese wurde die PCR-Bande aus dem Gel eluiert und in den TA-Vektor kloniert. Das Ausschneiden der pGPx-cDNA aus dem

Plasmid erfolgte wiederum mit dem Restriktionsenzym EcoRI. Zur Kontrolle des erfolgreich durchgeführten RNA-Blottings und der Gleichmäßigkeit der aufgetragenen RNA-Mengen wurden Hybridisierungen mit folgenden cDNA-Sonden durchgeführt: GAPDH,  $\beta$ -Aktin oder 18 rRNA. Diese Gene werden von den verschiedenen Zellen relativ konstant exprimiert und sind daher als Kontrollgene geeignet. Die GAPDH-cDNA entstammte einer humanen fetalen Leber (ATCC; Nr. 57091), die  $\beta$ -Aktin cDNA (1200 bp Insert + 150 bp des pBluescript Vectors (Dr. Mazoub, Boston, USA) aus Rattengewebe.

#### **2.10.8 Restriktion der cDNA aus Plasmiden**

Als Restriktionsenzyme für das Ausschneiden von cGPx-cDNA und SeW-cDNA aus Plasmiden wurden SmaI (Reaktionstemperatur: 25 °C) und EcoRV (Reaktionstemperatur: 37 °C) (beide von Gibco) gemäß dem Protokoll eingesetzt (3 U Enzym/ $\mu$ g DNA). Nach mind. 6 h Reaktionsdauer wurde ein 5-fach Stop-Puffer zugesetzt und eine horizontale Auftrennung im 1 % Agarosegel (mit Ethidiumbromid 500 ng/ml versetzt) durchgeführt. Mit Hilfe des mitgelaufenen Weight-Markers wurde unter der UV-Lampe das entsprechende Plasmidfragment mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die cDNA wurde aus dem Gelstück durch Versetzen mit dem Nucleotrap-Kit (Macherey - Nagel) entsprechend dem High speed-Protokoll isoliert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Metabolisierung von Natrium-<sup>75</sup>Se-Selenit in Caco 2- und ST 23132-Zellen

Zur Untersuchung des Einbaus von Selenit in verschiedene Proteine von Caco 2- und ST 23132-Zellen wurde das Medium der Zellen zunächst auf 2 % FCS reduziert, um eine Adaptation der Zellen an selenarme Bedingungen zu erzielen. Beide Zelllinien reagierten mit Wachstumsverzögerung (Abb. 3.1). Nach 3 Tagen erfolgte schließlich die FCS-Depletion für 12 h (ST 23132) oder 16 h (Caco 2), um den Zellen die Verarbeitung des noch vorhandenen Selen zu ermöglichen. Anschließend wurden die Zellen mit Natrium-<sup>75</sup>Se-Selenit inkubiert.

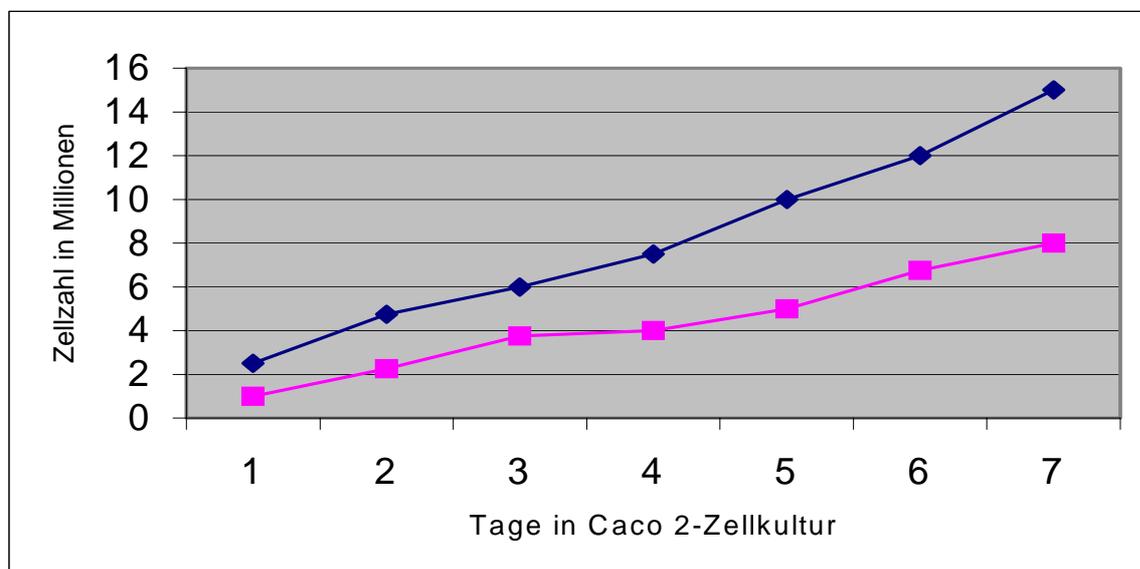


Abb. 3.1

Erreichte Zellzahlen in Millionen pro Tage in Zellkultur (Caco 2).

**Legende:** blau = Zellen kultiviert in 10 % FCS, rosa = Zellen kultiviert in 2 % FCS

#### 3.2 Pulse Chase-Versuch bei Caco 2-Zellen

Nach einstündiger Inkubation der Caco 2-Zellen mit 10 nM Natrium-<sup>75</sup>Se-Selenit (*pulse*), erfolgte nach einem Mediumwechsel die Zugabe von 100 nM kaltem Selenit (*chase*) zum FCS-depletierten Medium. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet.

Im Pulse Chase-Experiment konnte keine hierarchische Metabolisierung des radioaktiven Selenits festgestellt werden. Die beiden prominentesten Banden der zellulären Proteine im Bereich 50-60 kDa und 20-25 kDa wiesen auch bei 24h <sup>75</sup>Se-Inkubation die stärksten Signale auf. Lediglich Banden im Bereich 30-45 kDa konnten in der Autoradiographie des Pulse Chase-Experiments nicht detektiert werden. Alle anderen Banden waren zu jenen der 24 h <sup>75</sup>Se-Inkubation bezüglich der Laufhöhe identisch, wenn auch von der Intensität der Signale

deutlich schwächer. Bei den extrazellulären Proteinen wurden zwei Banden mit schwacher (ca. 60 kDa) und extrem schwacher (Bereich 10-14 kDa) Intensität detektiert – beide waren nur in dem Medium der *pulse*-Phase zu finden, nicht jedoch in der *chase*-Phase. Die Bande mit 60 kDa war nach 24 h <sup>75</sup>Se-Inkubation signalintensiver als nach 1 h, die Bande im niedermolekularen Bereich (10-14 kDa) war nur bei den extrazellulären Proteinen (Ausnahme: *chase*-Phase) zu sehen. Aufgrund der relativ schwachen Intensität der Banden werden nur Autoradiogramme nach 24 h <sup>75</sup>Se-Inkubation gezeigt (Abb. 3.2 und 3.3).

### **3.3 Metabolisierung von Natrium-<sup>75</sup>Se-Selenit in Caco 2-Zellen nach 24 h Inkubation**

Im Autoradiogramm der zellulären Proteine konnten mindestens 10 Banden detektiert werden (Abb. 3.2). Die Molekulargewichte der Proteinbanden wurden mit Proteinstandards ermittelt und konnten teilweise bekannten Proteinen zugeordnet. 5 Banden waren im ungefähren Bereich 40-70 kDa, die mittlere, signalintensivste zeigte eine Masse von etwa 58 kDa und könnte damit den Selenoproteinen SeP und/oder TrxR1/TrxR2 entsprechen. Eine eindeutige Feststellung, welches der beiden Proteine vorliegt oder ob beide Proteine in Form einer Doppelbande vorliegen, kann aufgrund des beinahe gleichen Molekulargewichts nicht getroffen werden. Im Bereich 20-25 kDa waren mindestens 3 Banden sichtbar, wobei das intensivste Signal etwa der Masse 22 kDa entsprach und damit der GPx-GI, für die genau dieses Molekulargewicht beschrieben wird, zuordenbar ist. Das Signal mit der Masse von 24 kDa entspricht wahrscheinlich der pGPx, die in der Literatur mit einem MG 25 kDa beschrieben wird (Köhrle J 1995). Die Bande mit MG 23 kDa dürfte die cGPx darstellen. Möglicherweise stellt die Bande im Bereich MG 14, die in einem Kontrollversuch in 3 Banden differenziert werden konnte, ein Korrelat zu Sel15 (Gladyshev VN et al. 1998 (a)) dar. Die Bande im Bereich 18 kDa könnte dem Protein Sel18 oder SelT (Behne D und Kyriakopoulos A 2001) entsprechen. Für die Banden im Bereich 26-45 kDa ist keine Zuordnung zu bereits bekannten Selenoproteinen möglich.

Im Überstand wurden insgesamt 4 Banden detektiert, davon 2 im Bereich 50-60 kDa. Die höher laufende Bande könnte das sezernierte SeP, die tiefere Bande TrxR1 darstellen. Die Bande im Bereich 24 kDa könnte der ebenfalls sezernierten pGPx entsprechen. Ob die Bande im Bereich 14 kDa mit dem intrazellulären Selenoprotein mit MG 14 kDa in Zusammenhang steht und somit Sel15 repräsentiert, bleibt noch zu klären.

Durch die Zugabe von Pefabloc<sup>R</sup> und/oder IT-Medium ergaben sich keine Änderungen im Bandenmuster. Eine Übersicht zur Zuordnung der beschriebenen Banden zu bestimmten Selenoproteinen findet sich in Tab. 3.1.

### 3.4 Metabolisierung von Natrium-<sup>75</sup>Se-Selenit in ST 23132-Zellen nach 24 h Inkubation

In den ST 23132-Zellen liegt bei den zellulären Selenoproteinen ein identisches Bandenmuster zu den Caco 2-Zellen vor, bei den extrazellulären Proteinen hingegen konnte keine Bande MG 24 kDa nachgewiesen werden. Durch die Zugabe von Pefabloc<sup>R</sup> und/oder IT-Medium ergab sich eine quantitative Bandenreduktion von 4 auf 1 im Massenbereich 26-50 kDa.

Abb. 3.2a

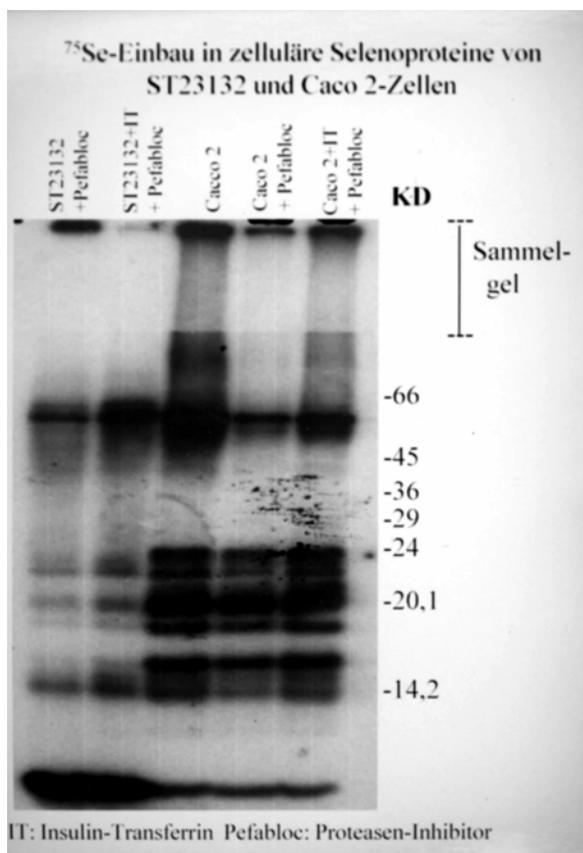


Abb. 3.2b

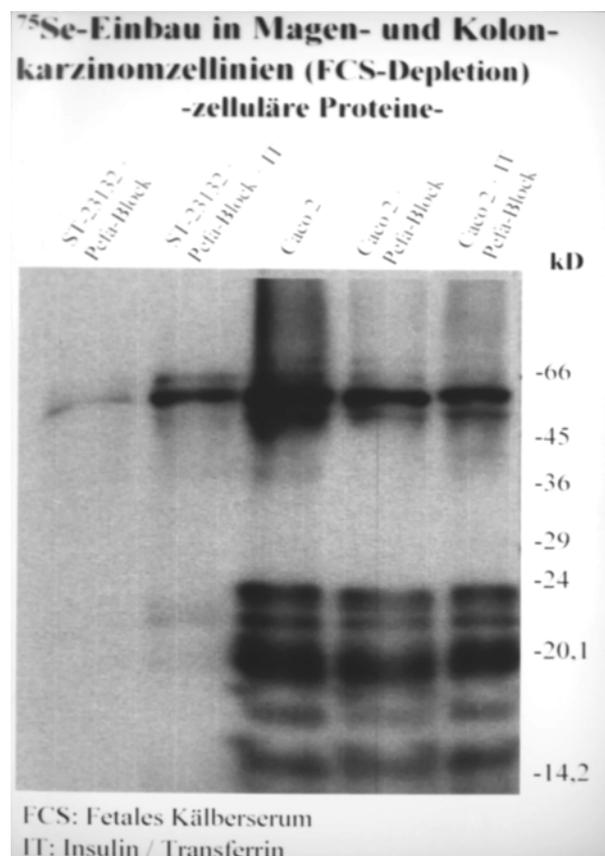
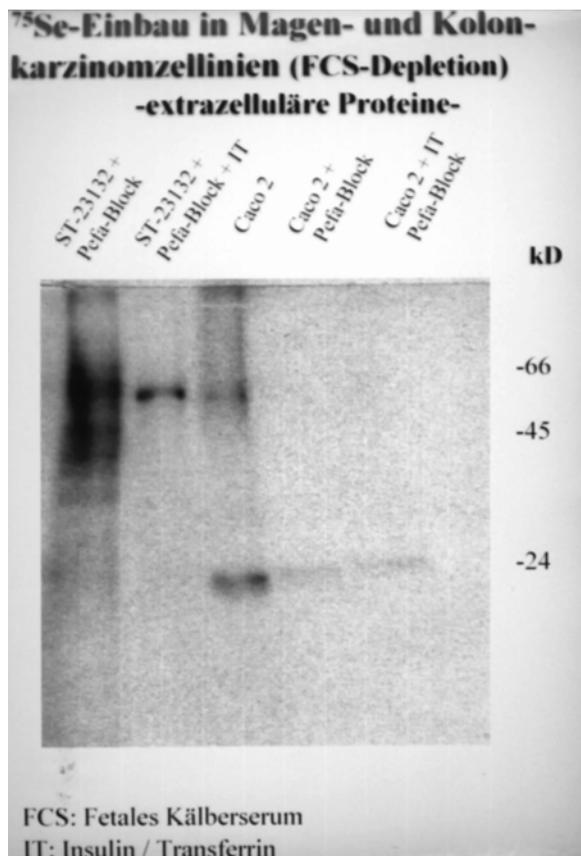


Abb. 3.2

Autoradiogramm des SDS-PAGE intrazellulärer Proteine von Caco 2- und ST 23132-Zellen nach <sup>75</sup>Se-Inkubation (a = Gesamtgel, b = Ausschnitt des relevanten Proteingrößenbereiches)



**Abb. 3.3**

Autoradiogramm des SDS-PAGE extrazellulärer Proteine von Caco 2- und ST 23132-Zellen nach <sup>75</sup>Se-Inkubation

Aufgrund der Viskosität der einzelnen Proben war eine quantitative Äquivalenz der cpm in den einzelnen Geltaschen nicht gewährleistet. Somit blieb die Aussagefähigkeit der Signalintensität auf intrazelluläre Unterschiede der einzelnen Proben beschränkt. Die massiven interzellulären Differenzen bezüglich der Intensität einzelner Banden bedingten, dass nicht alle beschriebenen Banden gezeigt werden. Eine Übersicht zur Zuordnung der beschriebenen Banden zu bestimmten Selenoproteinen findet sich in Tab. 3.1.

Banden mit MG (kDa)	Caco 2		ST 23132		Zuordnung zu bekannten Selenoproteinen
	Z	EZ	Z	EZ	
>60	3	1	2-5	1	glykosyliertes SeP?, TrxR3?, Artefakte?
50-60	1+1	1	1+1	1	SeP/ TrxR1 (jeweils 57 kDa), Bande <56 kDa unbekannt
26-50	1	∅	1-4	∅	unbekannt, Artefakte durch Proteasen?, trunkiertes SeP?
24	1	1	1	1	pGPx (25 kDa)
23	1	1?	1	1	cGPx (23 kDa)?
22	1	∅	1	∅	GPx-GI (22 kDa)
~20	∅/1	∅	∅	∅	unbekannt/SelT?
~18	1	∅	1	∅	unbekannt/Sel18?
~16	1	∅	1	∅	unbekannt/SelX?
~14	1	∅/1	1	∅/1	Sel15?

**Tab. 3.1**

Bandenmuster von Selenoproteinen in Caco 2- und ST 23132-Zellen nach Metabolisierung von Natrium-<sup>75</sup>Se-Selenit

**Legende:** ∅ = keine Bande erkennbar, Z = zellulär, EZ = extrazellulär

Die Anzahl der Banden in einem bestimmten Masse-Bereich (angegeben in kDa) wird mit Zahlen angegeben. Unterschiedliche quantitative Befunde werden jeweils mit kleinster und größter Anzahl aufgeführt. Fett gedruckte Zahlen stehen für definierte Proteine unter mehreren Banden.

### 3.5 Ex vivo Metabolisierung von Natrium-<sup>75</sup>Se-Selenit in Schleimhautbiopsien aus dem Gastrointestinaltrakt

Die Biopsien aus unauffälliger Kolonmukosa, tubulovillösem Kolonadenom und jeweils unauffälliger Korpus- und Antrumschleimhaut des Magens wurden mit SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie analysiert.

In Magenkorpus und -antrum fielen im Bereich 50-66 kDa eine starke und eine schwache Bande auf, wobei erstere analog zu den Zellkulturen SeP und/oder TrxR zuordenbar war. Auch hier ist eine Unterscheidung beider Proteine aufgrund ihres ähnlichen Molekulargewichts von 57 kDa nicht möglich. Die schwächere, höher laufende Bande könnte dem p66-Protein (Dreher I 1997) oder der TrxR3 (Behne D und Kyriakopoulos A 2001) entsprechen. Im Bereich 20-25 kDa waren 2 Banden detektierbar, die den Isoenzymen der GPx-Familie zuordenbar sind. Im Bereich < 20 kDa fanden sich 2 weitere Banden. Die signalintensivere und bei ca. 15 kDa liegende Bande könnte in Analogie zu den Zellkulturen Sel15 entsprechen (Gladyshev VN et al. 1998 (a)).

Die Schleimhautbiopsien des Kolons zeigten bei einer insgesamt schwächeren Bandenintensität lediglich 3 klar abgrenzbare Banden im Bereich 50-60 kDa (SeP und/oder TrxR1/TrxR2), bei ca. 24 kDa (GPx-Isoenzym) bzw. 15 kDa (Sel15).

Das Bandenmuster und die Signalintensität der Banden beim Kolonadenom entsprachen dem der normalen Kolonmukosa. Lediglich die Bande im Bereich 24 kDa zeigte ein vergleichsweise sehr starkes Signal. Ob das Signal der GPx-GI, deren mRNA in Adenomen sehr stark exprimiert wird (Mörk H et al. 2000), entspricht, kann mit diesem Versuch nicht festgestellt werden.

Sowohl in der Mukosa des Magenantrums, als auch in der des Kolonadenoms wurde darüber hinaus eine 29 kDa-Bande detektiert. Als mögliche Zuordnungen kommen Deiodasen, eine trunkierte SeP-Isoform (Himeno S et al. 1996) oder ein Proteolyse-Produkt in Frage.

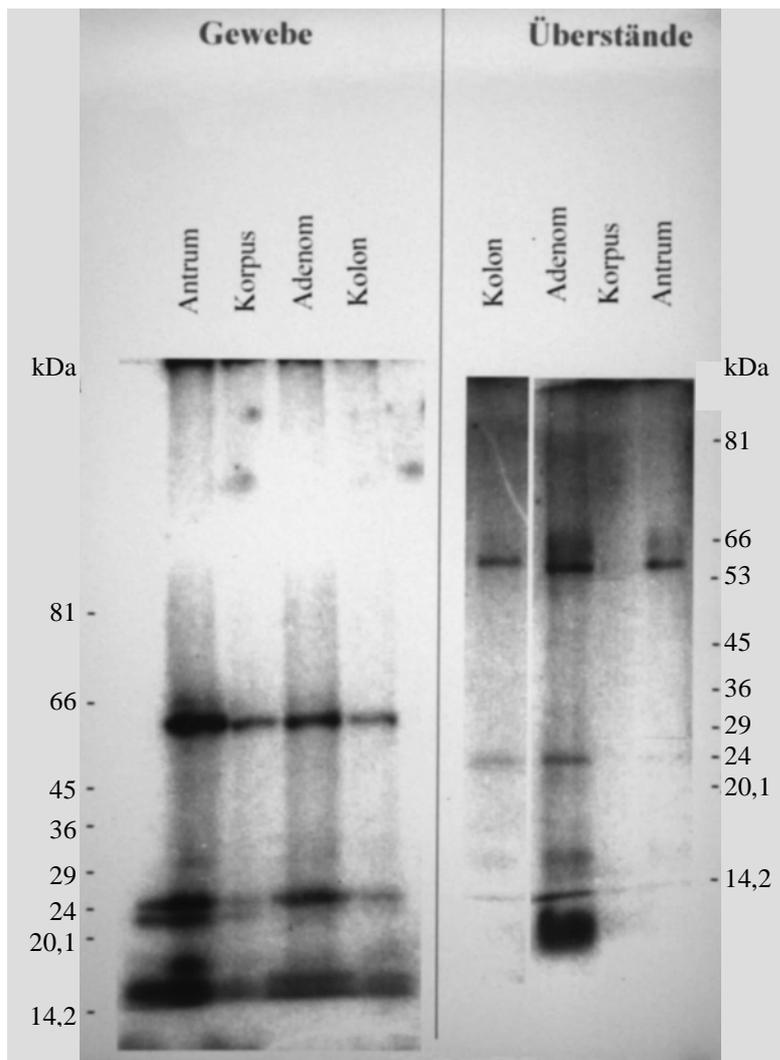
Auch die Überstände der Gewebebiopsien wiesen ein einheitliches Bandenmuster auf, welches als Korrelat der sezernierten Selenoproteine anzusehen ist. Eine breite, unscharfe Bande bei 66 kDa könnte einem glykosylierten SeP entsprechen. Eine Bande bei etwa 57 kDa kann sezerniertem SeP, eine weitere, bei 20-24 kDa, am wahrscheinlichsten der sezernierten pGPx und eine dritte, bei ca. 14 kDa, möglicherweise Sel15 zugeordnet werden. Die in Abb. 3.4 sichtbaren Banden sind in Tab. 3.2 abermals zusammengefasst.

Banden mit MG (kDa)	Antrum		Korpus		Kolon		Adenom		Zuordnung zu bekannten Selenoproteinen
	Z	EZ	Z	EZ	Z	EZ	Z	EZ	
> 60	1	1	1?	1	∅	1	1?	1	glykosyliertes SeP?, TrxR3?
50-60	1	1	1	1	1	1	1	1	SeP und/oder TrxR1/TrxR2
29	1	∅	∅	∅	∅	∅	1	∅	Deiodase?, trunkiertes SeP?
20-24	2	1	2	1	1	1	1	1	GPx-Isoenzyme
16-18	2	∅	2?	∅	2?	1	2?	1	Sel18?, SelX?, Proteolyse-Produkte?
14/15	1	1	1	1	1	1	1	1	Sel15?

**Tab. 3.2**

Bandenmuster von Selenoproteinen in Gewebebiopsien aus Magenantrum und -korpus, Kolonmukosa und Kolonadenom nach ex-vivo Metabolisierung von Natrium-<sup>75</sup>Se-Selenit

**Legende:** ∅ = keine Bande erkennbar, Z = zellulär, EZ = extrazellulär, ? = fragliche Bande/n



**Abb. 3.4**

Autoradiogramm des SDS-PAGE intra- und extrazellulärer Proteine nach ex vivo Metabolisierung von Natrium-<sup>75</sup>Se-Selenit in Schleimhautbiopsien unauffälliger Kolonmukosa, eines tubulovillösem Kolonadenoms sowie unauffälliger gastraler Korpus- und Antrumschleimhaut

### 3.6 Expression von Selenoproteinen in Zelllinien und Geweben

#### 3.6.1 Selenoproteine in Caco 2- und ST 23132-Zellen

Die Zelllinien wurden mit Northern-Hybridisierung auf die Expression von mRNA der Selenoproteine cGPx, pGPx, GPx-GI, TrxR1, SeW und SeP untersucht. In Caco 2- und ST 23132-Zellen wurde die mRNA der Selenoproteine pGPx, GPx-GI, TrxR1 und SeP detektiert (Tab. 3.3, Abb. 3.8), für cGPx und SeW konnten keine Signale nachgewiesen werden.

	Caco 2	ST 23132
cGPx	∅	∅
pGPx	++	*(Mörk H et al.1998)
GPx-GI	+	+++
TrxR1	+++	+++
SeW	∅	n.u.
SeP	++	∅/+*(Mörk H 1998)

**Tab. 3.3**

Detektion von mRNA verschiedener Selenoproteine im Northern-Blotting

**Legende:** +++ = starkes Signal, ++ = gut sichtbares Signal, + = schwaches Signal, ∅ = kein Signal,

\* = in anderen Arbeiten beschriebenes Signal, n.u. = nicht untersucht

#### 3.6.2 Selenoproteine in der quergestreiften Muskulatur der Ratte

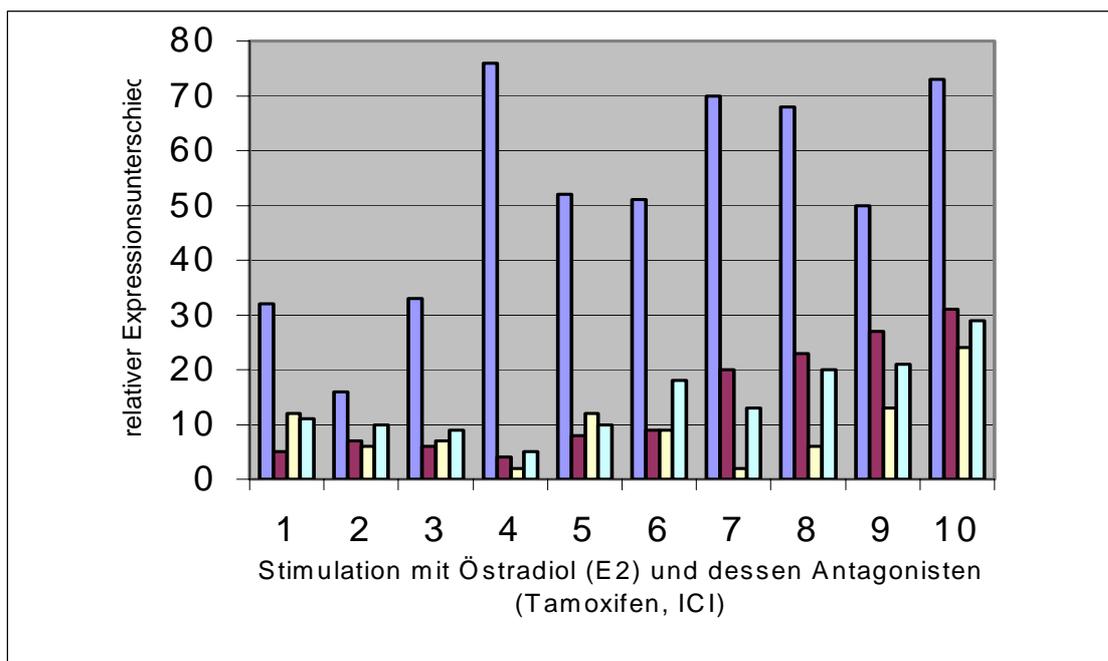
Im aufgearbeiteten Muskelstück konnten in der Northern-Hybridisierung keine Selenoproteine detektiert werden.

#### 3.6.3 Regulation der mRNA-Transkription von Selenoproteinen durch Östradiol und Östrogenantagonisten in Caco 2-Zellen

Die Caco 2-Zellen wurden in diesem Experiment bei Zellkonfluenz 24 h unter den standardisierten Kulturbedingungen mit unterschiedlichen 17-β-Östradiol-Konzentrationen, Tamoxifen  $10^{-7}$  M, ICI 164,384  $10^{-7}$  M oder kombiniert mit 17-β-Östradiol und Tamoxifen oder ICI 164,384 (ein synthetisches 7-α-Alkyl-Östrogen-Analogon) inkubiert.

Als Kontrolle der Transkriptmenge wurde mit 18S-rRNA und GAPDH-cDNA hybridisiert. Diese zeigten in sämtlichen Proben optisch ähnlich starke Banden (Ausnahme Bande 2: E<sub>2</sub>  $10^{-6}$ ). Die GPx-GI-Transkription blieb durch die verschiedenen Östradiol-Konzentrationen im Vergleich zu unbehandelten Zellen unverändert, stieg bei alleiniger Tamoxifengabe und

kombinierter Applikation von  $E_2$   $10^{-7}$  M und Tamoxifen  $10^{-7}$  M sowie  $E_2$   $10^{-7}$  M und ICI  $10^{-7}$  M (kombiniert) in ähnlichem Maße leicht an. Die Zugabe von 50  $\mu$ l Ethanol induzierte die größte Steigerung an GPx-GI-mRNA-Transkription. Die pGPx erreichte lediglich bei Zugabe von  $E_2$   $10^{-7}$  M, der Kombination  $E_2$   $10^{-7}$  M und Tamoxifen  $10^{-7}$  M oder 50  $\mu$ l Ethanol das Transkriptionsniveau der unbehandelten Zellen. Die densitometrische Auswertung bestätigte diese optische Beurteilung und wies zugleich bei Zugabe von 50  $\mu$ l Ethanol erneut eine Transkriptionssteigerung nach. Das densitometrisch festgestellte hohe Transkriptionsniveau bei Zugabe von  $E_2$   $10^{-9}$  M war aufgrund der schlechten Filmqualität in der Bandenumgebung zurückhaltend zu interpretieren. Die TrxR1-mRNA-Expression sank mit fallenden  $E_2$ -Konzentrationen zunehmend gegenüber den unbehandelten Zellen ab, lag bei Tamoxifen- und ICI- bzw. bei kombinierter Gabe mit  $E_2$  in etwa auf deren Transkriptionsniveau. 50  $\mu$ l Ethanol waren auch hier der stärkste Transkriptionsstimulus.



**Abb. 3.5**

Regulation von Selenoproteinen **weinrot** durch Östradiol und dessen Antagonisten

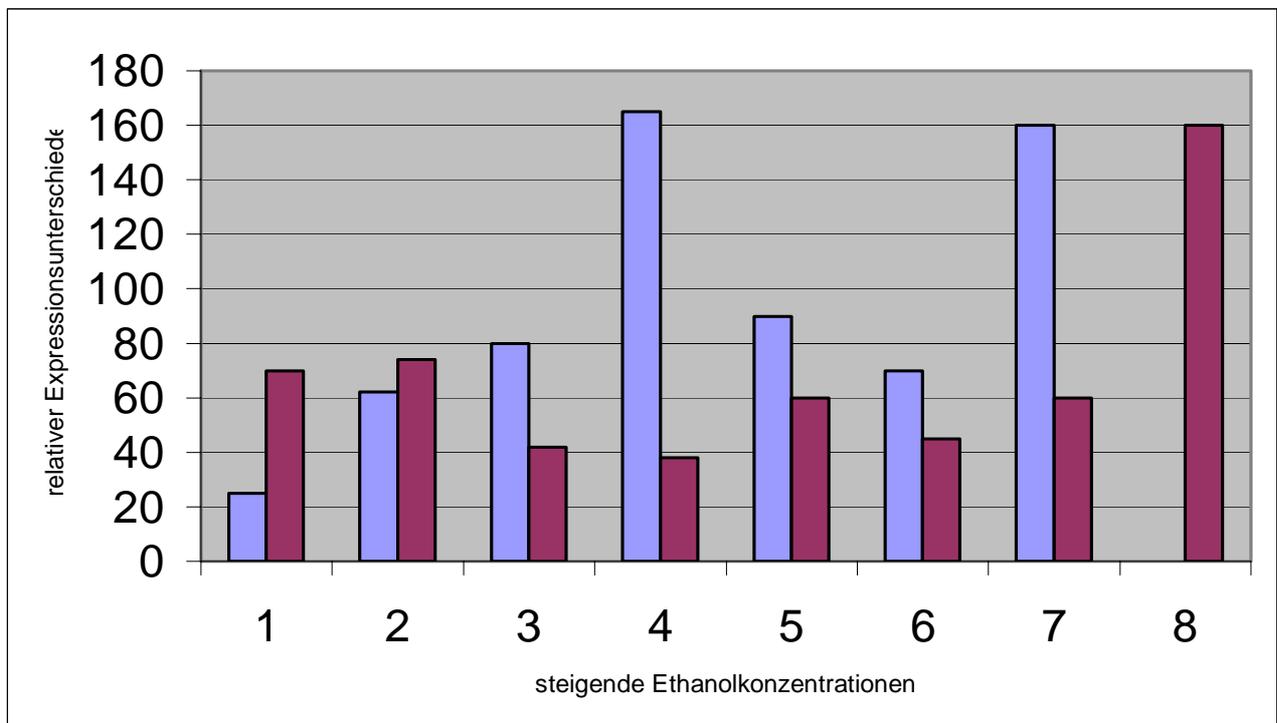
**Legende:** blau = GAPDH, = GPX-GI, gelb = pGPx, turkis = TrxR1

1 = Kontrolle, 2 =  $E_2$  $10^{-6}$ , 3 =  $E_2$  $10^{-7}$ , 4 =  $E_2$  $10^{-8}$ , 5 =  $E_2$  $10^{-9}$ , 6 = ICI, 7 = Tamoxifen, 8 =  $E_2$  $10^{-7}$  + ICI, 9 =  $E_2$  $10^{-7}$  + Tamoxifen, 10 = Ethanol,

### 3.6.4 Regulation der mRNA-Transkription von Selenoproteinen durch Ethanol in Caco 2-Zellen

Das in den Stimulationsversuchen verwendete Östradiol war in Ethanol gelöst. Durch Zugabe von steigenden Ethanolkonzentrationen sollte überprüft werden, ob Ethanol selbst eine regulative Wirkung auf die Transkription von Selenoproteine-kodierende-mRNA ausübt.

Die zur Verfügung stehende Stammlösung von Östradiol ( $E_2$ ) war  $10^{-3}$  M konzentriert, so dass 20  $\mu$ l für eine Endkonzentration von  $10^{-6}$  M (bzw. 2  $\mu$ l für  $10^{-7}$  M) in 20 ml Nährmedium benötigt wurden. Die damit in den Östradiol-Stimulationsversuchen additiven Ethanolzugaben von 2 bzw. 20  $\mu$ l (als Lösungsmittel für Östradiol) fanden auch in diesem separaten Versuch Einzug. Bei einer Gabe von 2  $\mu$ l Ethanol waren keine auffälligen Expressionsänderungen bei den mRNAs von GPx-GI, pGPx, TrxR1 und SeP gegenüber den unbehandelten Caco 2-Zellen (Kontrolle) feststellbar. SeW und cGPx waren auch in diesen Versuchen nicht nachweisbar. Im Kontrollversuch zeigte sich ein deutlicher Signalunterschied für GPx-GI innerhalb der unbehandelten Caco 2-Zellen (Abb. 3.4. Kontrolle I und II) und eine Verminderung der pGPx-Expression bei Gabe von 2  $\mu$ l Ethanol.



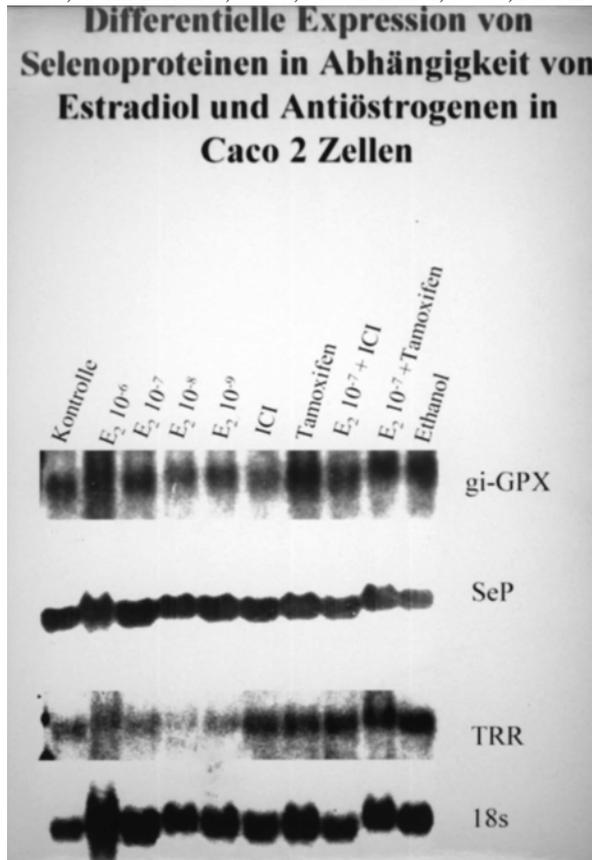
**Abb. 3.6**

Regulierung der mRNA-Expression von GPx-GI und pGPx durch Ethanol ( $C_2$ )

**Legende:** blau = pGPx, weinrot = GPx-GI

1 = Kontrolle I, 2 = Kontrolle II, 3 = 0,002 ml Ethanol, 4 = 0,01 ml Ethanol, 5 = 0,02 ml Ethanol,

6 = 0,05 ml Ethanol, 7 = 0,1 ml Ethanol, 8 = 0,2 ml Ethanol



**Abb. 3.7**

Regulation der mRNA-Transkription von Selenoproteinen durch Ethanol, Östradiol und Östrogenantagonisten in Caco 2-Zellen

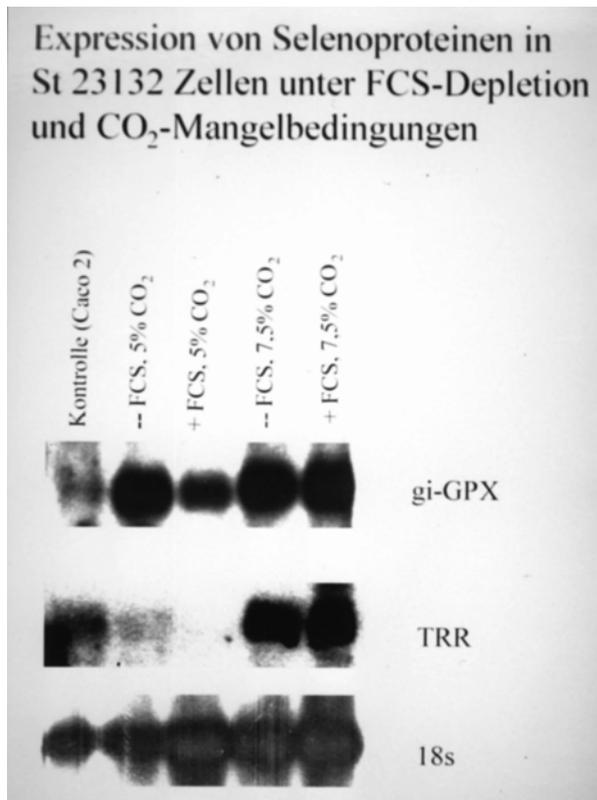
**Legende:** Kontrolle = Caco-2 unbehandelt, E<sub>2</sub>10<sup>-6</sup> = Östradiol 10<sup>-6</sup>, E<sub>2</sub>10<sup>-7</sup> = Östradiol 10<sup>-7</sup>, E<sub>2</sub>10<sup>-8</sup> = Östradiol 10<sup>-8</sup>, E<sub>2</sub>10<sup>-9</sup> = Östradiol 10<sup>-9</sup>, ICI = ICI 10<sup>-7</sup>, Tamoxifen = Tamoxifen 10<sup>-7</sup>, E<sub>2</sub>10<sup>-7</sup> + ICI = Östradiol 10<sup>-7</sup> + ICI 10<sup>-7</sup>, E<sub>2</sub>10<sup>-7</sup> + Tamoxifen = Östradiol 10<sup>-7</sup> + Tamoxifen 10<sup>-7</sup>, Ethanol = 20µl, TRR = TrxR1, gi-GPx = GPx-GI

Der Zusatz von 20 µl Ethanol führte zu einer Verminderung der mRNA-Expression aller detektierten Selenoproteine. Die densitometrisch beobachtete, massive Hochregulierung von GPx-GI (im Kontrollversuch) erschien bei kritischer Betrachtung der entsprechenden Bande am Röntgenfilm (Schmierbildung unter- und oberhalb der Bande) fragwürdig. Bei Erhöhung der Ethanolkonzentration (Zugabe von 50-200 µl) zeigte sich ein sehr uneinheitliches Bild bezüglich vermehrter oder verminderter mRNA-Transkription. Einzig die GPx-GI vermochte unter diesen zunehmend toxischen Bedingungen ihr Transkriptionsniveau annähernd zu halten. Die Bande bei Gabe von 100 µl Ethanol war aufgrund der starken Schmierbildung nicht auswertbar.

### **3.6.5 Einfluss von CO<sub>2</sub> und FCS auf die Expression von Selenoproteinen in ST 23132-Zellen**

ST 23132-Zellen wurden standardisiert bei 10 % CO<sub>2</sub>, 90 % Luft und 10 % FCS kultiviert (Vollmers HP et al. 1993). In den Brutschränken des Institutes, in welchen alle Versuche durchgeführt wurden, musste der CO<sub>2</sub>-Gehalt aus logistischen Gründen auf 7,5% gehalten werden, wodurch die Vitalität und Proliferation der Zellen nach subjektiver Einschätzung nicht negativ beeinflusst wurden. Für die Metabolisierungsversuche mit Natrium-<sup>75</sup>Se-Selenit war eine mehrtägige Reduzierung der FCS-Konzentration auf 2 % (Konditionierung) und anschließend ein völliger FCS-Entzug (zur Selen-Depletion) über 12 h im Rahmen der <sup>75</sup>Se-Metabolisierung notwendig. Zusätzlich musste aus logistischen Gründen eine weitere CO<sub>2</sub>-Reduzierung auf 5 % während der 12 stündigen <sup>75</sup>Se-Inkubation vorgenommen werden. Es galt nun zu klären, inwieweit diese „Stressfaktoren“ das intrazelluläre Expressionsmuster der Selenoproteine auf der Transkriptionsebene verschieben und damit ein falsches Bild über das Proteinmuster vorgeben würden. Mit diesem Hintergrund wurden die ST 23132-Zellen auf quantitative Veränderungen bei der mRNA-Expression verschiedener Selenoproteine bei CO<sub>2</sub>-Reduzierung und/oder FCS-Depletion untersucht.

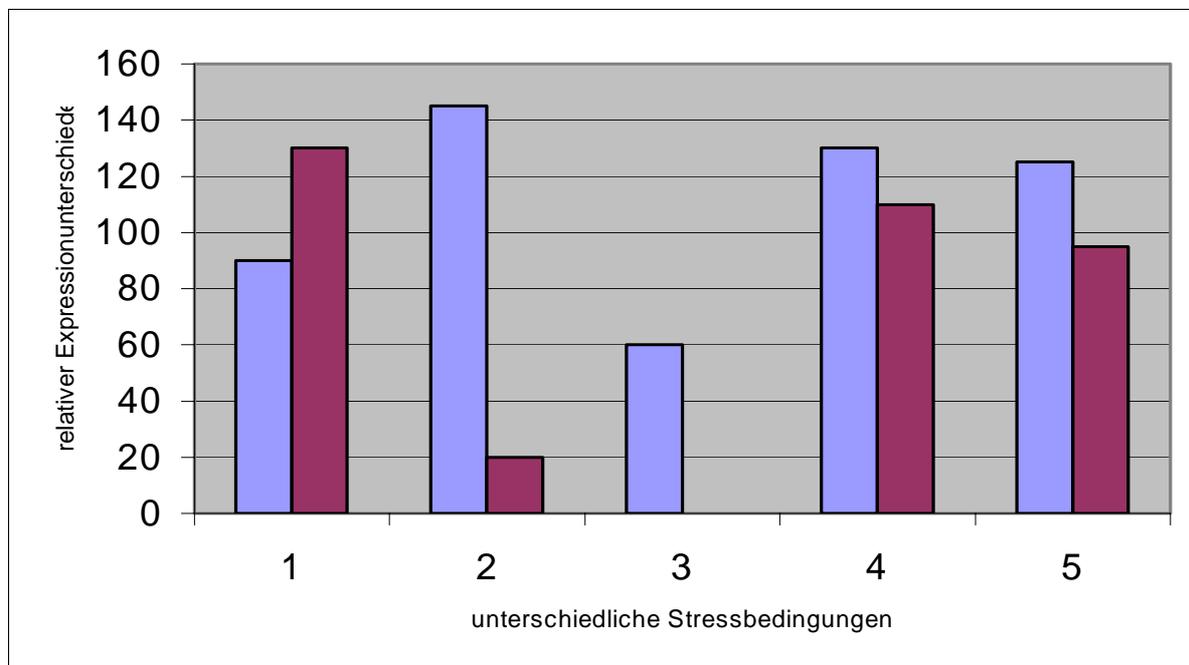
Es konnten keine Banden nach Hybridisierung mit cDNA-Sonden für SeP, pGPx und cGPx detektiert werden. Die 18s-Hybridisierung, welcher auch als densitometrischer Referenzwert diente, zeigte, dass aus allen Proben RNA extrahiert worden war. Aufgrund großer Schwankungen der eingesetzten RNA-Mengen basierte die Beurteilung der Signalunterschiede auf den densitometrischen Daten. Die unter standardisierten Bedingungen kultivierten Caco 2- und ST 23132-Zellen zeigten kaum quantitative Unterschiede bei der Expression von GPx-GI und TrxR1. Die Stressfaktoren bedingten tendenziell eher eine Steigerung der GPx-GI-mRNA-Expression sowie eine unbeeinflusste oder, bei vermindertem CO<sub>2</sub>-Gehalt, reduzierte TrxR1-mRNA Expression (Abb. 3.5).



**Abb. 3.8**

Einfluss von CO<sub>2</sub> und FCS auf die Expression von Selenoproteinen in ST 23132-Zellen

**Legende:** Kontrolle = Caco 2 und ST 23132 (+ FCS, 7,5 % CO<sub>2</sub>), -FCS = Nährmedium ohne FCS, 5 % CO<sub>2</sub> = verminderter und damit suboptimaler CO<sub>2</sub>-Gehalt im Brutschrank, TRR = TrxR1, gi-GPx = GPx-GI



**Abb. 3.9**

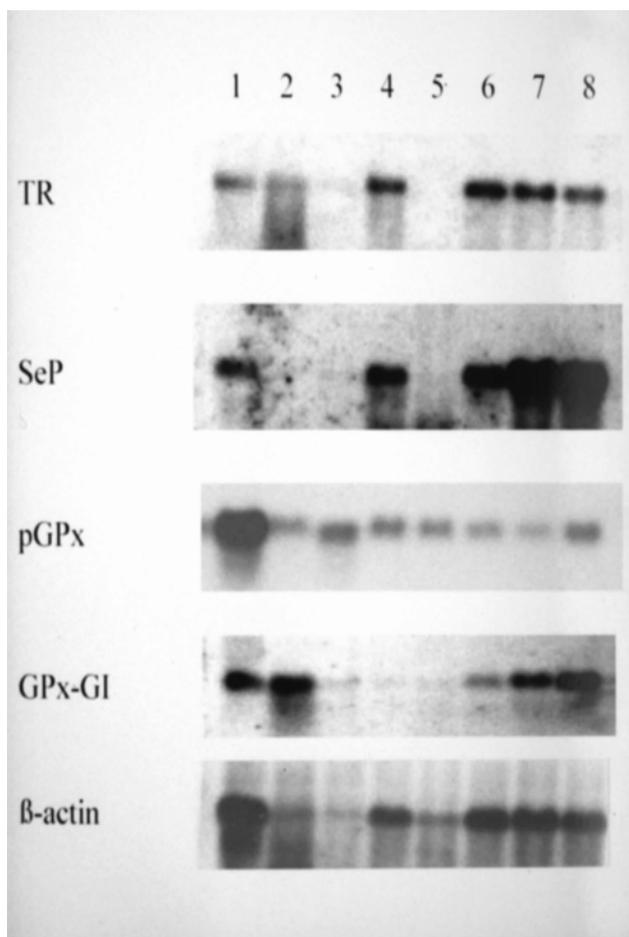
Stressinduzierte mRNA-Expression von GPx-GI und TrxR1 bei ST 23132-Zellen

**Legende:** blau = GPx-GI, weinrot = TrxR1, 1 = Caco 2, 2 = -FCS 5 % + CO<sub>2</sub>, 3 = +FCS 5 % + CO<sub>2</sub>, 4 = -FCS 7,5 % + CO<sub>2</sub>, 5 = +FCS 5 % + CO<sub>2</sub>

### 3.7 mRNA-Expression von Selenoproteinen im menschlichen Gastrointestinaltrakt

#### 3.7.1 mRNA-Expressionsmuster der Selenoproteine in den verschiedenen Abschnitten des gesunden menschlichen Gastrointestinaltrakts

In dieser Untersuchung fanden ausschließlich Biopsien von Patienten Einzug, deren Routine-Biopsien histologisch keine Pathologie zeigten und deren makroskopischer Schleimhautaspekt endoskopisch unauffällig war. Systemische Erkrankungen (z. B. Stoffwechselerkrankungen, Malignome) und systemisch bzw. lokal im Gastrointestinaltrakt wirkende Medikamente stellten Ausschlusskriterien dar.



**Abb. 3.10**

mRNA-Expressionsmuster der Selenoproteine in den verschiedenen Abschnitten des gesunden menschlichen Gastrointestinaltrakts

**Legende:** 1 = Ösophagus, 2 = Magenkörper, 3 = Magenantrum, 4 = Duodenum, 5 = terminales Ileum, 6 = Kolon ascendens, 7 = Kolon descendens, 8 = Rektum, TR = TrxR1

Die Biopsien von 5-10 verschiedenen Patienten (5 Biopsien pro Abschnitt) wurden entsprechend ihres Entnahmeortes gepoolt. Die Gewebepools aus Ösophagus, Magenkorpus, Magenantrum, Duodenum, terminalem Ileum, Kolon ascendens, Kolon descendens und Rektum wurden der RNA-Extraktion zugeführt und nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit spezifischen cDNA-Sonden mittels Northern-Hybridisierung auf die mRNA verschiedener Selenoproteine untersucht.

Nach Hybridisierung mit cGPx und SeW zeigten sich keine spezifischen Signale, hingegen fand sich für TrxR1, SeP, GPx-GI und pGPx eine differentielle mRNA-Expression. TrxR1- und SeP-mRNA fanden sich in Ösophagus, Duodenum, Kolon und Rektum. In Antrum und terminalem Ileum waren keine Signale, im Korpus nur TrxR1 detektierbar. Die SeP Signale in Ösophagus, Duodenum und besonders in Kolon und Rektum waren sehr intensiv (Abb. 3.9). pGPx wies ein deutliches Signal im Ösophagus und etwas schwächere, gleichmäßige Signale in allen anderen Abschnitten auf. Bei der GPx-GI wurden in Ösophagus, Antrum, Kolon und Rektum starke, in Korpus, Duodenum und terminalem Ileum lediglich sehr schwache Signale gefunden. Die Ergebnisse konnten in weiteren Biopsieanalysen reproduziert werden. Die Northern-Blots sind in Abb. 3.10 dargestellt, Tab. 3.3 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

	GPx-GI	pGPx	cGPx	TrxR1	SeP	SeW
Ösophagus	+	+	∅	+	+	∅
Antrum	+	+	∅	+	∅	∅
Korpus	+	+	∅	+	∅	∅
Duodenum	∅	+	∅	+	+	∅
terminales Ileum	∅	+	∅	∅	∅	∅
Kolon ascendens	+	+	∅	+	+	∅
Kolon descendens	+	+	∅	+	+	∅
Rektum	+	+	∅	+	+	∅

**Tab. 3.4**

Zusammenfassung der mRNA-Expression verschiedener Selenoproteine in unterschiedlichen Abschnitten des menschlichen Gastrointestinaltrakts

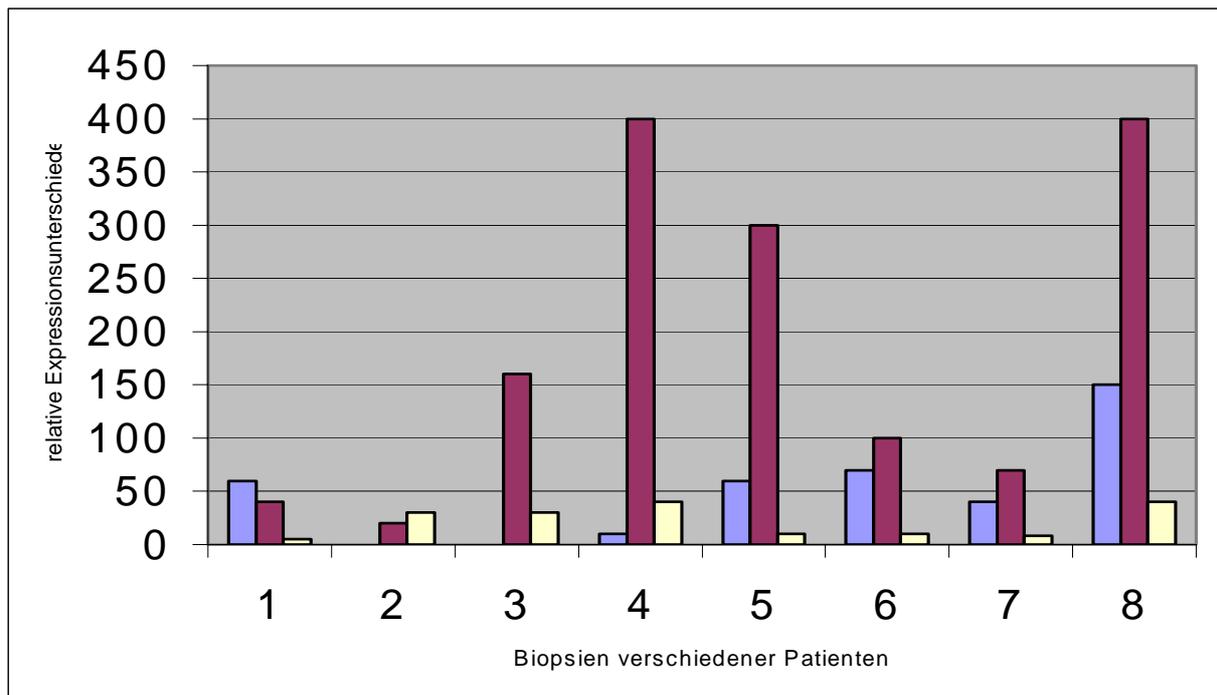
**Legende:** += mRNA im Northern-Blot nachweisbar, ∅ = mRNA nicht nachweisbar

### **3.7.2 Veränderungen des mRNA-Expressionsmusters der Selenoproteine in Magenmukosa bei verschiedenen gastralen Erkrankungen**

Aus Magenkorpus und Magenantrum wurden bei Patienten mit Erkrankungen des Magens endoskopisch Biopsien (je 5 Biopsien pro Abschnitt) entnommen, um mittels Northern-Hybridisierung die Expression verschiedener Selenoproteine zu untersuchen. Auf diesem Weg sollte überprüft werden, ob in pathologisch veränderter Magenschleimhaut im Vergleich zu gesunder Mukosa ein verändertes Expressionsmuster verschiedener Selenoproteine vorliegt. Die untersuchten Biopsien setzten sich zusammen aus Typ B-Gastritis, Typ A-Gastritis, Magenkarzinom (Narbenkarzinom im Antrum) und Magenlymphom (histopathologische Diagnosen), wobei aus dem Magenmalignom aus dem tumorfreien benachbarten Gewebe biopsiert wurde. Als Referenzprobe wurde eine histologisch unauffällige Mehrfachbiopsie verwendet. Im Ergebnis wurden keine Banden nach Hybridisierung mit cGPx und SeW gefunden. Aufgrund der schlechten Filmqualität mit schwachen Banden werden nur die densitometrischen Daten gezeigt (Abb. 3.11, 3.12). Die Hybridisierung mit GAPDH diente als quantitative Referenz der mRNA. Im Magenantrum und -korpus fanden sich TrxR1, pGPx und GPx-GI. Die GAPDH-Hybridisierung zeigte, dass alle Biopsien mRNA (Antrum > Korpus) enthielten. TrxR1 wurde in allen Biopsien des Antrums exprimiert. Die Hp-negativen Gastritisbiopsien waren aus technischen Gründen nicht auswertbar. Den densitometrischen Werten zufolge wurde die TrxR1, verglichen mit gesunder Antrumschleimhaut, in den pathologisch veränderten Antrumbiopsien vermindert exprimiert, lediglich bei Typ A-Gastritis fand sich eine gesteigerte TrxR1-Expression. Die GPx-GI konnte in allen Antrumbiopsien detektiert werden: Sie war optisch (Röntgenfilm), wie auch densitometrisch in allen (Ausnahme Patient Nr. 2 mit Hp-negativer Gastritis) krankhaft veränderten Antrumbiopsien gegenüber der gesunden Mukosa vermehrt exprimiert. Die pGPx-mRNA im Antrum wurde in allen Proben mit relativ schwachen Banden detektiert. Eine vermehrte mRNA-Bildung fand sich bei den Biopsien mit pathologischen Veränderungen wie Hp-negativer und Typ A-Gastritis. Bei der Hp-positiven Gastritisbiopsien des Antrums blieb die pGPx-Expression gegenüber gesunder Antrumschleimhaut unverändert.

TrxR1 und pGPx wurden in sämtlichen Korpusbiopsien mit krankhaften Mukosaveränderungen gegenüber der gesunden Korpuschleimhaut vermindert exprimiert. Ein gegenläufiges Bild bot sich bei der Betrachtung der GPx-GI-Expression. Mit Ausnahme der Korpusbiopsien mit dem histopathologischen Befund einer Hp-negativen Gastritis

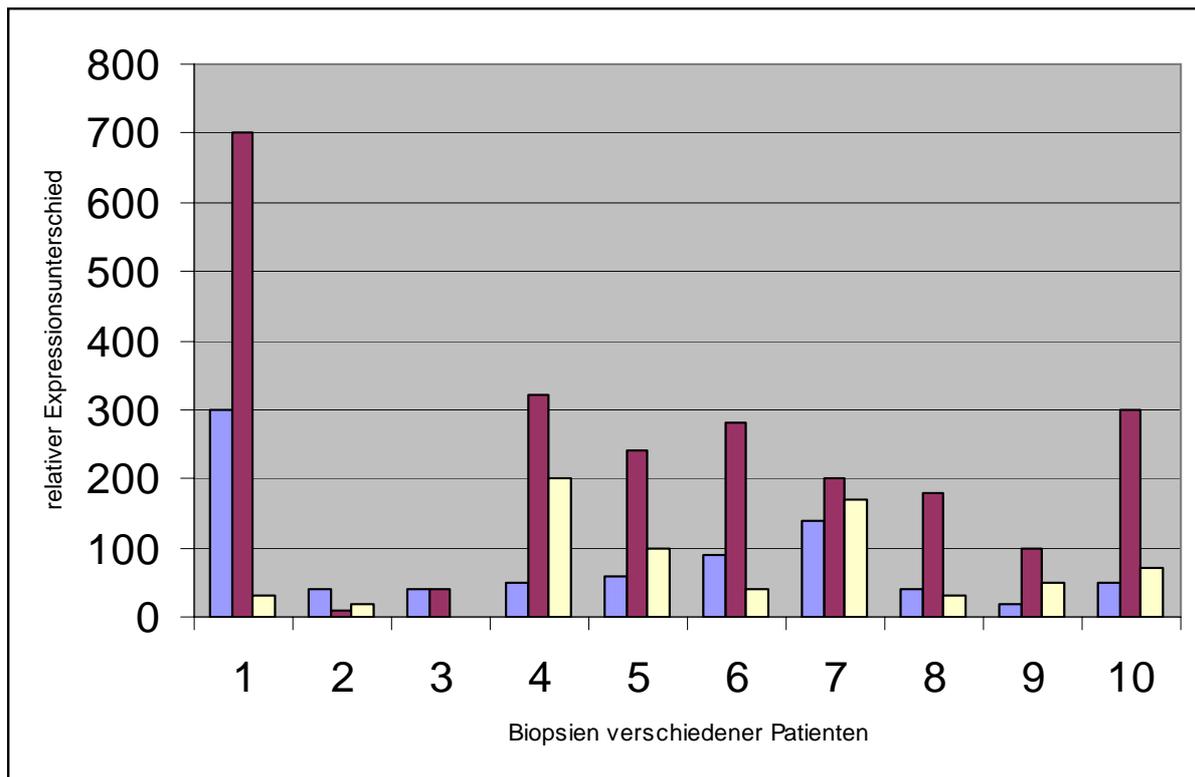
(uneinheitlich gesteigerte, verminderte oder fehlende GPx-GI-Expression) wiesen alle anderen pathologisch veränderten Korpusbiopsien eine gesteigerte GPx-GI-Transkription auf. Die Deskription dieser Befunde basierte maßgeblich auf der densitometrischen Auswertung, welche aufgrund von zahlreichen, individuellen Einstellungsmöglichkeiten häufig Untersucher-abhängig ist.



**Abb. 3.11**

mRNA Expression von TrxR1, GPx-GI, pGPx in pathologischen Antrumbiopsien,

**Legende:** blau = TrxR1, weinrot = GPx-GI, gelb = pGPx, 1 = gesunde Mukosa, 2-4 = Gastritis ohne Hp-Nachweis, 5-7 = Hp-positive Gastritis, 8 = Typ A-Gastritis



**Abb. 3.12**

mRNA-Expression von TrxR1, GPx-GI und pGPx in pathologischen Korpusbiopsien

**Legende:** blau = TrxR1, weinrot = pGPx, gelb = GPx-GI, 1 = gesunde Mukosa, 2-4 = Gastritis ohne Hp-Nachweis, 5-7 = Hp-positive Gastritis, 8 = Typ A-Gastritis, 9 = Magen-Lymphom, 10 = Magenkarzinom

## 4. Diskussion

### 4.1 Metabolisierung von Natrium-<sup>75</sup>Se-Selenit in Caco2- und ST 23132-Zellen

#### 4.1.1 Pulse Chase-Versuch bei Caco 2-Zellen

Im Pulse Chase-Experiment war keine hierarchische Metabolisierung des radioaktiven Selenits feststellbar. Die beiden prominentesten Banden der zellulären Proteine im Bereich 50-60 kDa als mutmaßliche Repräsentanten von SeP und/oder TrxR1/TrxR2 und bei 20-25 kDa (Glutathionperoxidasen) wiesen auch bei 24 h <sup>75</sup>Se-Inkubation die stärksten Signale auf. Lediglich Banden im Bereich von 30-45 kDa konnten in der Autoradiographie des Pulse Chase-Experiments nicht detektiert werden - alle anderen Banden waren zu denen der 24 h <sup>75</sup>Se-Inkubation bezüglich der Laufhöhe identisch, wenn auch von der Intensität der Signale deutlich schwächer. Bei den extrazellulären Proteinen wurden zwei Banden mit schwacher (ca. 60 kDa) und extrem schwacher Intensität (Bereich 10-14 kDa) gefunden. Beide sind lediglich in dem Medium der *pulse*-Phase zu finden, die *chase*-Phase zeigt kein markiertes extrazelluläres Protein.

Die Differenzen der Bandenintensitäten bei Kurzzeitexposition (*pulse*), fehlender Exposition (*chase*) und Langexposition (24 h-Inkubation) mit radioaktivem Selenit als markiertes Substrat deuten auf eine kontinuierliche Translation der detektierten Selenoproteine ohne präferenzielle Versorgung bestimmter Proteine hin. Die fehlenden Banden im Bereich 30-45 kDa in der *pulse*-Phase, für die es in der Literatur keine passenden publizierten Daten gibt, dürften Proteinfragmenten entsprechen, die im Rahmen der beobachteten, zunehmenden Wachstumsverzögerung und der Apoptose durch Proteasen bedingt entstanden sind. Für diese Annahme spricht die Reduzierung der intrazellulären Banden von 4 auf 1 im beschriebenen Bereich nach Zugabe eines Proteasen-Inhibitors (Pefabloc<sup>R</sup>) in das Nährmedium bei 24 h-Inkubationen. Auch Dreher beobachtete bei <sup>75</sup>Se-Inkubation von LLC-PK 1-Zellen (Nierenzellen) eine zeitabhängige Proteolyse mit dem zeitweise Auftreten einer Bande >30 kDa bei zeitgleichem Intensitätsverlust einer primären Bande im Bereich 66 kDa (Dreher I 1997). In der Arbeit von Tujebajeva bedingten andere Protease-Inhibitoren kein verändertes Bandenmuster der Selenoproteine verschiedener Zelllinien (Tujebajeva R et al. 2000).

#### 4.1.2 Metabolisierung von Natrium-<sup>75</sup>Se-Selenit in Caco 2- und ST 23132-Zellen nach 24 h-Inkubation

Die signalintensivste Bande im Bereich 40-70 kDa der zellulären Proteine hat die Masse von etwa 58 kDa und könnte damit den Selenoproteinen SeP und/oder TrxR1/TrxR2 entsprechen. Eine

eindeutige Feststellung, welches der beiden Proteine vorliegt oder ob beide Proteine in Form einer Doppelbande vorliegen, kann aufgrund des beinahe gleichen Molekulargewichts nicht getroffen werden. Die eindeutige Festlegung, ob die Bande TrxR1 oder TrxR2 repräsentiert, kann aufgrund des identischen Molekulargewichts nicht getroffen werden, wenngleich die Datenlage klar für TrxR1 spricht (TrxR2 ist die mitochondriale Isoform, TrxR1 mit all seinen Funktionen (Kap. 1.5.2.) wurde als Protein bereits in zahlreichen Geweben intra- und extrazellulär nachgewiesen). In der Literatur wird das Molekulargewicht der TrxR1 mit 57 kDa (Tamura T und Stadtman TC 1996) bzw. 58,1 kDa (Miller S et al. 2002) und das von SeP (abhängig von der jeweiligen Zelllinie) mit 57-60 kDa (Tujebajeva R et al. 2000) angegeben. Tujebajeva und Mitarbeiter wiesen ebenso nach, dass Deglykosylierung von SeP die molekulare Masse um bis zu 19 kDa reduzieren kann und spekulieren darüber hinaus, dass trunkiertes oder deglykosyliertes SeP Molekulargewichte zwischen 26 und 61 kDa aufweisen kann (Tujebajeva R et al. 2000). Da auf mRNA-Ebene lediglich die Caco 2-Zellen SeP und TrxR1, die ST 23132 hingegen nur TrxR1 exprimierten, könnte es sich bei dem nach extrazellulär sezernierten Protein durchaus um TrxR1 handeln.

Die 3 Banden im Bereich 20-25 kDa entsprechen der GPx-GI (22 kDa), der cGPx (23 kDa) und der pGPx (24 kDa), wobei letztere in der Literatur mit einem MG von 25 kDa beschrieben wird (Köhrle J 1995). Andererseits konnte die cGPx-mRNA im Rahmen dieser Arbeit weder in Zellkulturversuchen noch im menschlichen Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden. Konträr hierzu steht die Arbeit von Tham und Mitarbeitern, in welcher eine cGPx-Expression in humaner Kolonschleimhaut nachgewiesen wurde (Tham DM et al. 1998). Bei der Zuordnung der 24 kDa-Bande muss ebenso die PHGPx, deren Molekulargewicht mit 24,4 kDa angegeben wird (Miller S et al. 2002), in Erwägung gezogen werden. Da die PHGPx jedoch gegenüber den anderen Glutathionperoxidasen in den meisten Geweben (Ausnahme Testes) und Zelllinien vermindert exprimiert wird, erscheint dies unwahrscheinlich. Möglicherweise stellt die Bande im Bereich MG 14 kDa ein Korrelat zu dem neu beschriebenen Selenoprotein Sel15 mit einem Molekulargewicht von 15 kDa (Gladyshev VN et al. 1998 (a), Behne D und Kyriakopoulos A 2001) dar. Wie in 3.2.5 gezeigt wurde, wird GPx-GI-mRNA unter FCS-Entzug (gleichbedeutend mit Selenmangel) vermehrt exprimiert. Dieser Befund wird in der Literatur in vitro (Caco 2- Zellen) bestätigt, im Gastrointestinaltrakt von Ratten bleibt die GPx-GI-Genexpression unter Selenmangel jedoch unverändert (Wingler K et al. 1999).

Für die Banden im Bereich 26-45 kDa ist keine Zuordnung zu bereits bekannten Selenoproteinen möglich. Diese sind, wie in 4.1.1 erläutert, als Proteolyseprodukte zu betrachten. In der bereits zitierten Arbeit von Tujebajeva wurde in mit <sup>75</sup>Se gelabelten CHO-Zellen ebenfalls eine

zusätzliche 45 kDa-Bande beschrieben und als trunkierte SeP-Form interpretiert (Tujebajeva R et al. 2000).

Zusammenfassend kann postuliert werden, dass beide Zelllinien analog GPx-GI, cGPx, pGPx, Sel15 und SeP und/oder TrxR1 exprimieren und kontinuierlich cGPx, pGPx, Sel15 und SeP und/oder TrxR1 sezernieren. Damit steht neben der bereits etablierten humanen Kolonkarzinomzelllinie Caco 2 die Magenkarzinomzelllinie ST 23132 als geeignetes in vitro-Modell zur Untersuchung molekularer Regulationsmechanismen von Genexpression und funktioneller Aktivität zur Verfügung.

## **4.2 Ex vivo Metabolisierung von Natrium-<sup>75</sup>Se-Selenit in Schleimhautbiopsien aus dem Gastrointestinaltrakt**

### **4.2.1 Magen**

Die in Magenkorpus und -antrum detektierte intra- und extrazelluläre Bande im Massenbereich 50-66 kDa könnte SeP und/oder TrxR1 darstellen, eine Unterscheidung bezüglich des Molekulargewichtes ist, wie in 4.1.2 ausgeführt, wiederum nicht möglich. In der eigenen Arbeit konnte die SeP- und TrxR1-mRNA in beiden Magenkompartimenten (Kap. 3.3.1, 3.3.2), in den gepoolten Mukosabiopsien jedoch die TrxR1-mRNA nur im Antrum nachgewiesen werden (Kap. 3.3.1, Mörk H et al. 1998 ). Damit erscheint eine Translation von SeP und TrxR1 im humanen Magen als sicher. Bei einer höher laufenden Bande könnte glykosyliertes SeP vorliegen (J. Köhrle, pers. Mitteilung), TrxR3 (MG 65 kDa) erscheint aufgrund seiner bevorzugten Expression im Hoden der Maus nicht das korrespondierende Selenoprotein für diese Bande darzustellen. Der Einsatz von Polyhistidin-spezifischen Antikörpern zum SeP-Nachweis im Western-Blot (Tujebajeva R et al. 2000) könnte zur genaueren Analyse der 60 kDa-Bande dienlich sein.

Die im Magenantrum detektierte Bande mit 29 kDa ist einerseits bezüglich des Molekulargewichtes als möglicher Vertreter der Deiodasen, für deren Untereinheiten die Molekulargewichte 27 kDa (5'-DI), 29 kDa (5'-DII) und 32 kDa (5-D) angegeben werden (Köhrle J 2000), interpretierbar, andererseits wurde bisher noch keine Deiodase im humanen Magen nachgewiesen. Eine trunkierte SeP-Isoform (Himeno S et al. 1996, Tujebajeva R et al. 2000) oder ein Proteolyseprodukt sind als alternative Erklärung denkbar (J. Köhrle, pers. Mitteilung). Auf der Grundlage der eigenen Ergebnisse zum Verteilungsmuster der Selenoproteine im humanen Gastrointestinaltrakt mittels Northern-Hybridisierung (Kap. 3.3.1, Mörk H et al. 1998) sind die 2 intrazellulären Banden im Massenbereich 20-24 kDa als pGPx und GPx-GI interpretierbar. Eine cGPx-Expression war im humanen Magen nicht

nachweisbar (Kap. 3.3.1, Mörk H et al. 1998), eine PHGPx-Expression wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, ist allerdings für den humanen Magen bisher noch nicht beschrieben worden. Die extrazelluläre Bande könnte pGPx sein, da dessen Sekretion in das extrazelluläre Kompartiment bekannt ist (Takahashi K et al. 1987), wobei der humane Magen als additiver Produktionsort für pGPx neben der Niere erstmals in dieser Arbeit beschrieben wurde (Kap. 3.3.2, Mörk H et al. 1998). Die beiden intrazellulären Banden im Massenbereich 16-18 kDa könnten proteolytischer Natur sein; vorstellbar wäre auch eine Assoziation zu dem von Behne beschriebenen 18 kDa Selenoprotein (Behne D und Kyriakopoulos A 2001). Ob die intra- und extrazellulär detektierbare Bande im Bereich 14/15 kDa Sel15 (Gladyshev VN et al. 1998 (a), Behne D und Kyriakopoulos A 2001) entsprechen könnte, bleibt noch zu untersuchen.

Zusammenfassend können eine gastrale Transkription und Translation und wohl teilweise luminal Sekretion von SeP, TrxR1, pGPx und GPx-GI angenommen werden, was angesichts des hohen oxidativen bursts auch sinnvoll erscheint. Allen vier Selenoproteinen werden antioxidative Funktionen attestiert, womit ihre Präsenz in der Magenmukosa essentiell sein könnte. Weiterhin ist ein weitgehend konformes Expressionsmuster von Selenoproteinen des Magens und der Magenkarzinomzelllinie ST 23132 festzustellen. Eine teilweise Übertragbarkeit von in vitro-Daten auf in vivo-Situationen wird hierdurch legitim.

#### **4.2.2 Kolon und Kolonadenom**

In der Kolonschleimhaut waren 3 klar abgrenzbare Banden intra- und extrazellulär feststellbar, die im Bereich 50-60 kDa SeP und/oder TrxR, und 15 kDa Sel15 zugeordnet werden könnten. Ob das Signal im Bereich 20-24 kDa der GPx-GI, deren mRNA in Adenomen stark exprimiert wird, oder der pGPx, deren mRNA in Adenomen unverändert nachweisbar ist (Mörk H et al. 2000), entspricht, kann mit diesem Versuch nicht festgestellt werden. Das intra- und extrazelluläre Bandenmuster beim Kolonadenom entsprach dem der normalen Kolonmukosa, die Signalintensität der Banden war im Bereich 50-60 kDa gleich. Jedoch erscheint die Bande im Bereich 20-24 kDa beim Adenom gegenüber der umgebenden Mukosa deutlich stärker (intra- und extrazellulär). Das vermutete Sel15 hat ebenso beim Adenom eine stärkere Signalintensität.

Aufgrund der Befunde von Mörk ist anzunehmen, dass die 57 kDa-Bande in der adenomatösen Schleimhaut schwerpunktmäßig der TrxR1 entspricht, da die TrxR1-mRNA in der Schleimhaut kolorektaler Adenome gegenüber normaler Kolonschleimhaut unverändert bleibt, die SeP-mRNA jedoch deutlich vermindert exprimiert wird (Mörk H et al. 2000). Die Daten derselben Arbeit legen auch den Schluss nahe, dass das Signal im Bereich 20-24 kDa

der GPx-GI entspricht, deren mRNA - wie bereits erwähnt - in Adenomen stark transkribiert wird. Tham und Mitarbeiter zeigten in Metabolisierungsexperimenten mit <sup>35</sup>S-Methionin und anschließenden Western-blotting in humanen Kolonbiopsien eine Expression von cGPx und pGPx, wobei letztere zusätzlich sezerniert wird (Tham D et al. 1998). Unter Berücksichtigung der zuletzt zitierten Arbeit muss bei der Interpretation der 20-24 kDa Bande Zurückhaltung geübt werden. Eine bessere Unterscheidung wäre mittels Western-blotting denkbar.

Der im Rahmen dieser Arbeit erbrachte Nachweis einer breiten Genexpression (SeP, TrxR1, pGPx und GPx-GI) und Translation von Selenoproteinen in der kolorektalen Mukosa führte zu der Frage, ob in kolorektalen Adenomen ein verändertes Expressions- oder Funktionsmuster derselben vorliegt. Ein erstes Indiz für eine verstärkte Expression von Selenoproteinen, welche mit der Karzinogenese in Verbindung gebracht werden, wie beispielsweise die GPx-GI (Chu FF et al. 1996) oder Sel15 (Kuramaswany E et al. 2000), ergab sich somit aus diesem Versuch. Mörk ging dieser angedeuteten Verknüpfung von veränderter Selenoproteinexpression bei Kolonadenomen nach und konnte später eine inverse Regulierung von SeP-mRNA ( ↓ ) und GPx-GI-mRNA ( ↑ ) in der Mukosa von Adenomen nachweisen (Mörk H et al. 2000). Die Frage, ob eine Reduzierung der lokalen SeP-Produktion zugunsten einer vermehrten GPx-GI-Bildung stattfindet oder die SeP-Verringerung eine Art Erstereignis mit einhergehender erhöhter Anfälligkeit für oxidative Zellschäden darstellt, wird in Kap. 4.4.1 nochmals ausführlich diskutiert. Der GPx-GI käme dann eine Art „Ausputzerrolle“ zu.

### **4.3 Expression von Selenoproteinen in Zelllinien und Geweben**

#### **4.3.1 Selenoproteine in Caco 2- und ST 23132-Zellen**

In dieser Arbeit konnte in keiner der verwendeten Zelllinien mittels Northern-Hybridisierung cGPx oder SeW nachgewiesen werden. Caco-2 Zellen zeigten eine deutliche Expression der pGPx-mRNA, die pGPx konnte auch in den ST 23132 Zellen erstmals nachgewiesen werden. GPx-GI- und TrxR1-Signale waren in Caco 2- und ST 23132-Zellen, SeP in Caco 2-Zellen, nicht aber in ST 23132 nachweisbar. Mörk konnte zwischenzeitlich auch in ST 23132-Zellen die SeP-mRNA nachweisen (Mörk H 1998). Die SeP-Expression in HepG2-Zellen (humane Leberzellkarzinom-Zelllinie) war bereits publiziert worden (Dreher I 1997). Hiermit wurde erstmals für die beiden gastrointestinalen Tumorzelllinien Caco-2 und ST 23132 ein Expressionsmuster bekannter Selenoproteine erstellt. Aufgrund der breit gefächerten Expression von Selenoproteinen (mit Ausnahme von SeW und cGPx) eignen sich beide Zelllinien als in vitro-Modell zu Studien über molekulare Regulationsmechanismen von Genexpression und

funktioneller Enzymaktivität gastrointestinaler Selenoproteine. Wie bereits in Kap. 4.1.2 angeführt, zementiert die in dieser Arbeit nachgewiesene Translation vieler Selenoproteine in den Zelllinien (insbesondere bei ST 23132) deren Etablierung als repräsentative Zellkultur für das entsprechende gastrointestinale Kompartiment. Letzteres kann auch durch die gute Übereinstimmung der in vivo- und in vitro-Daten bezüglich der Genexpression untermauert werden.

Aus technischen Gründen konnte eine interne Kontrolle (Muskelgewebe der Ratte) zum Nachweis von SeW-mRNA nicht adäquat eingesetzt werden. Da die RNA-Ausbeute minimal war, konnten keine Northern-Signale detektiert werden.

#### **4.3.2 Regulation der mRNA-Transkription von Selenoproteinen durch Östradiol und Östrogenantagonisten in Caco 2-Zellen**

Aufgrund der möglichen kanzeroprotektiven Effekte von Selen (Clark LC et al. 1996) und Östrogenen (Calle EE et al. 1995) im unteren Gastrointestinaltrakt, die sich in einer deutlich geringeren Inzidenz kolorektaler Karzinome widerspiegeln, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Östrogenen auf die Genexpression verschiedener Selenoproteine untersucht. In diesem Zusammenhang sollten auch, schon aufgrund seiner überragenden Stellung bei der hormonellen Therapie des Mammakarzinoms, die molekulare Wirkung des partiellen Östrogenantagonisten Tamoxifen und des reinen Östrogenrezeptorantagonisten ICI hinsichtlich Genexpression verschiedener Selenoproteine untersucht werden. Zudem soll Tamoxifen zu einer Erhöhung des relativen Risikos für die Entwicklung kolorektaler Karzinome führen (Grodstein F et al. 1999). Da zum Zeitpunkt der Projektplanung und -durchführung keinerlei publizierte Daten oder eigene Erfahrungen über eine Interaktion von Östrogen mit Selenoproteinen auf genomischer oder proteinchemischer Ebene existierten, sollte eine Art Screening durchgeführt werden, um erste Ansatzpunkte für dann folgende, fundiertere Fragestellungen zu finden.

##### **Östradiol (E<sub>2</sub>)**

Die Zugabe von steigenden E<sub>2</sub>-Konzentrationen zum Nährmedium hatte keinen Effekt auf die Expression der GPx-GI-mRNA. Sowohl pGPx als auch TrxR1 reagierten mit einer leichten Verminderung der jeweiligen Genexpression.

##### **Tamoxifen**

Während Tamoxifen zu einer beinahe um den Faktor 4 gesteigerten GPx-GI- und einer leicht erhöhten TrxR1-Genexpression führte, wurde bei der pGPx eine Reduzierung der Transkription induziert

## **ICI**

Der reine Östrogenrezeptorantagonist führte, wie Tamoxifen, zu einer gesteigerten GPx-GI- und TrxR1-Genexpression sowie zu einer verminderten pGPx-Expression. Die GPx-GI-Induktion war dabei lediglich um den Faktor 2 erhöht.

## **Kombinierte Gabe von Östradiol (E<sub>2</sub>) mit Tamoxifen oder ICI**

Beide Kombinationen führten zu einer starken Induktion der GPx-GI-mRNA (Faktor 4-5), einer leichten Induktion der TrxR1-mRNA, wohingegen die Transkription der pGPx unbeeinflusst blieb.

## **Ethanol**

Die eindrucksvolle Erhöhung der Genexpression aller drei Selenoproteine, insbesondere aber der GPx-GI-mRNA (Faktor 6) ließ sich in den Kontrollversuchen nicht reproduzieren. Es zeigte sich vielmehr ein uneinheitliches Bild mit teilweise reduzierter GPx-GI-mRNA-Expression unter Ethanolzugabe. Lediglich die pGPx wurde durch Ethanol vermehrt transkribiert. Bezüglich der Tatsache, dass regelmäßiger Alkoholkonsum einen Risikofaktor für das kolorektale Karzinom darstellt, ist die Frage, ob dies auch im Zusammenhang mit einer GPx-GI-Überexpression stehen könnte, noch nicht abschließend beantwortet.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Regulation der GPx-GI-mRNA auf Genebene mit den epidemiologischen Daten einhergeht. Tamoxifen (wie auch ICI), ob alleine oder kombiniert mit Östradiol verabreicht, führte zu einer deutlich gesteigerten GPx-GI-Genexpression. Da in kolorektalen Adenomen die GPx-GI-Genexpression deutlich erhöht ist (Mörk H et al. 2000) und Tamoxifen die Inzidenz von kolorektalen Karzinomen erhöht (Grodstein F et al. 1999), könnte diese mögliche molekulare Genregulierung mit der epidemiologischen Beobachtung in einem kausalen Zusammenhang stehen. Umgekehrt kann die Beobachtung, dass Östradiol die GPx-GI-Genexpression reduziert, als Hinweis für die, dem Östradiol zugeschriebenen, kanzeroprotektiven Effekte, gewertet werden. In prospektiven Studien mit langjährig durchgeführter ERT konnte eine signifikante Reduktion der Inzidenz und Mortalität kolorektaler Karzinome gezeigt werden (Calle EE et al. 1995). Ebenso vermag Östrogen den IGF-1-Spiegel im Plasma zu senken - IGF-1 gilt als ein mit der kolorektalen Karzinogenese assoziiertes Mutagen (Grodstein F et al. 1999).

Die pGPx könnte durch Östrogen und Östrogenantagonisten negativ, durch Ethanol jedoch konzentrationsunabhängig positiv reguliert werden. Das erstellte Expressionsmuster von pGPx erscheint jedoch zu unstimmig, um bei fehlenden Kontrolldaten Schlüsse auf eine

Östrogen-gesteuerte Regulation zu schließen. pGPx-assoziierte epidemiologische Daten, welche pGPx mit Krankheitsbildern in Verbindung bringen, fehlen.

Analog zu GPx-GI verursachte Tamoxifen (wie auch ICI), ob alleine oder kombiniert mit Östradiol verabreicht, bei TrxR1 eine gesteigerte Genexpression. Diese Induktion der TrxR1-mRNA war weitaus moderater als bei der GPx-GI. Ebenso wurde umgekehrt eine Östradiol-induzierte Drosselung der TrxR1-Transkription beobachtet. Für die TrxR1 wird eine situationsabhängige Assoziation mit karzinogenen Prozessen beschrieben. Hier findet sich eine erhöhte TrxR-Enzymaktivität in verschiedenen Tumorzelllinien und -geweben (Gallegos A et al. 1997). Die TrxR1-Hemmung der Selen-induzierten PKC-Inaktivierung kann als weiteres Indiz für die zweifelhafte Rolle der TrxR1 in der Tumorphathogenese gewertet werden. Die durch Selenverbindungen wie z. B. Methylselenensäure hemmbare PKC nimmt eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion der Karzinogenese ein (Gopalakrishna R und Gundimeda U 2002).

Aufgrund des primären Ansatzes, mittels in Screeningverfahren angelegter Stimulationsversuche von Östrogen, partiellen und reinen Östrogenantagonisten potentielle regulative Interaktionen mit Selenoproteinen aufzuspüren, wurde primär auf weiterführende, vertiefende Versuche verzichtet. Damit bietet es sich für ein zukünftiges Projekt an, den angedeuteten molekularen cross-talk zwischen Östradiol als Vertreter der Steroidhormone einerseits, und den Selenoproteinen GPx-GI und TrxR1 andererseits zu verifizieren und weiter zu analysieren. Dies könnte durch die Assoziation der E<sub>2</sub>/GPx-GI-Interaktion mit wichtigen enzymatischen Dysregulationen in der Karzinogenese von erheblicher Bedeutung sein.

#### **4.4 Expressionsmuster verschiedener Selenoproteine im humanen Gastrointestinaltrakt**

Zahlreiche epidemiologische (Schrauzer GN et al. 1977, Jansson B 1985, Yu S et al. 1985) sowie tierexperimentelle Daten (Reddy BS et al. 1994, El-Bayoumy K et al. 1995, Jao SW et al. 1996, Nelson RL et al. 1996) zeigen einen Zusammenhang zwischen nutritivem Selenmangel und der Inzidenz gastrointestinaler Tumoren. Die randomisiert, prospektiv, doppelblind durchgeführte plazebo-kontrollierte Interventionsstudie von Clark (Clark LC et al. 1996) zeigte bei einer täglichen Supplementation von 200 µg Selen eine signifikante Reduktion der Tumormortalität um 52 % und der Inzidenz von kolorektalen (-64 %), Prostata-(-69 %) und Bronchialkarzinomen (-40 %). Die Clark-Studie demonstrierte erstmals, dass nicht allein Selenmangel ein erhöhtes Krebsrisiko darstellt, sondern die additive Selengabe an

normal selenversorgte Patienten einen signifikanten kanzeroprotektiven Effekt hat. Einschlusskriterium für die Studie war die positive Anamnese eines nicht-melanomartigen Hautkarzinoms. Zusätzlich weist die Region (Ostküste, USA), in welcher das Gesamtkollektiv lebt, Selenmangel in Boden und Getreide sowie eine relativ hohe Inzidenz für nicht-melanomartige Hautkarzinome und hohe Krebsmortalität auf. Somit bestand im Patientenkollektiv per se eine erhöhte Krebsinzidenz, weshalb eine generelle Übertragbarkeit der Daten auf andere Kollektive und Populationen nicht korrekt wäre. In der Follow-up-Studie (insgesamt 7,9 a) der 1996 entblindeten Clark-Studie reduziert sich die zuvor für alle Probanden festgestellte Risikominderung hinsichtlich der Erkrankung an Bronchialkarzinomen auf die Patienten mit geringen Basalwerten an Selenkonzentration im Serum (Reid ME et al. 2002).

Da nach allen bisherigen Erkenntnissen Selen seine molekularen Wirkmechanismen über seine Integration in Form von Selenocystein im aktiven Zentrum der bisher charakterisierten Selenoproteine entfaltet, liegt die Vermutung nahe, dass die zellulären und extrazellulären Selenoproteine zumindest partiell für den kanzeroprotektiven Effekt verantwortlich sind. Diese Hypothese leitet sich aus der Kenntnis über die Funktion einiger Selenoproteine im antioxidativen Stoffwechsel ab. Hierbei ist der Schutz vor DNA-Schäden durch reaktive Sauerstoffintermediate (ROI) als entscheidende Funktion beim Zusammenhang zwischen alimentärer Selenversorgung und der Karzinogenese im Gastrointestinaltrakt zu sehen. Systematische Daten über die unterschiedliche Expression von Selenoproteinen in den unterschiedlichen Kompartimenten des Gastrointestinaltrakts waren bisher nur aus Tiermodellen bekannt (Chu FF et al. 1992). In der vorliegenden Arbeit sollte erstmals geklärt werden, ob es für den menschlichen Gastrointestinaltrakt ein spezifisches Expressionsmuster der bisher charakterisierten Selenoproteine gibt.

In den bereits diskutierten Zellkulturversuchen (5.1, 5.2) deutete sich eine Tamoxifen-Regulation der GPx-GI an, was bei einer möglichen Beteiligung der GPx-GI an der kolorektalen Karzinogenese (Mörk H et al. 2000) von Bedeutung sein könnte.

In den Metabolisierungsversuchen mit radioaktivem Natrium-<sup>75</sup>Se-Selenit (4.1, 4.2) in Zelllinien und kultivierten Gewebeproben aus Magen und Kolon wurden zahlreiche Banden intra- und extrazellulär detektiert, welche einigen bekannten Selenoproteinen zugeordnet werden konnten. Für die Selenoproteine SeP, TrxR, pGPx und GPx-GI wurden somit neben der Transkription (mRNA-Signale) auch die korrespondierenden Proteine im menschlichen Gastrointestinaltrakt nachgewiesen.

Die mRNA-Expression der Selenoproteine SeP, TrxR1, pGPx und GPx-GI konnte in verschiedenen Kompartimenten des oberen und unteren menschlichen Gastrointestinaltrakts nachgewiesen werden. Da bisher keine Daten über Individuum-spezifische gastrointestinale Expression von Selenoproteinen existierten, wurden primär gepoolte Gewebeproben verschiedener Individuen mittels Northern-Hybridisierung untersucht. Für die verschiedenen gastrointestinalen Lokalisationen zeigten sich differenzielle Expressionsmuster (Mörk H et al. 1998 (b)). Die Selenoproteine PHGPx, 5'-DI, 5'-DII und 5-D wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Die Hybridisierungen mit cGPx und SeW zeigten keine Signale.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene Genexpression von pGPx in verschiedenen gastrointestinalen Abschnitten stellt die Erstbeschreibung für pGPx im menschlichen Gastrointestinaltrakt dar. Der Verdauungstrakt ist damit neben dem proximalen Nierentubulus ein weiterer Produktionsort für pGPx. Im ösophagealen Plattenepithel war die pGPx-Genexpression deutlich stärker als im kubischen Zylinderepithel der verschiedenen gastrointestinalen Abschnitten. Damit scheint eine epithelspezifische Ausstattung mit Glutathionperoxidasen vorzuliegen. Während für das Kolon eine luminale pGPx-Sekretion gesichert ist (Tham DM et al. 1998), steht dieser Nachweis für den Ösophagus noch aus. Obwohl eine basale Sekretion in das Plasma (analog zum proximalen Tubulus, welcher pGPx ins Plasma, nicht aber in den Urin sezerniert) denkbar wäre, erscheint eine luminale Sekretion hinsichtlich der physiologisch vorhandenen ROI (z. B. durch physiologischen Reflux) sinnvoll.

#### **4.4.1 SeP im humanen Gastrointestinaltrakt**

SeP-mRNA wurde mit relativ starken Signalen in der Mukosa von Kolon und Rektum, etwas schwächeren in der von Ösophagus und Duodenum nachgewiesen. In der Mukosa von Korpus- und Antrum ventriculi waren jeweils nur eine schwache, im terminalen Ileum hingegen keine Expression nachweisbar. Eine Synthese und Sekretion des Proteins ist aufgrund der nachgewiesenen Proteinbanden bei den <sup>75</sup>Se-Markierungsversuchen für die gastrointestinalen Zelllinien und die Primärkulturen (Kap. 4.1, 4.2) postulierbar. Zwischenzeitlich wurde der posttranslationale SeP-Nachweis im humanen unteren Gastrointestinaltrakt mit Western-Blot erbracht (Mörk H et al. 2000). Die Funktion von SeP generell und speziell in gastrointestinalen Geweben ist weitgehend unbekannt. Die anfänglich für SeP diskutierte Funktion als Transport-, Speicher- und Verteilungsprotein von Selen basierte auf dem hohen SeP-Anteil am Plasma-Selen (70 %), wird durch die in vitro-Beobachtung, dass SeP die GPx-Aktivität optimiert (Saito Y und Takahashi K 2002) gestützt.

Aufgrund der breiten Gewebeverteilung müssen aber zusätzliche Funktionen angenommen werden. SeP wird in Zellkulturen unter Selenmangelbedingungen gegenüber der cGPx bevorzugt mit Selen versorgt. Damit könnte ebenso der cGPx die postulierte Selen-Speicherfunktion zukommen (Hill KE et al. 1992, Gross M et al. 1995). Der Schutzeffekt von SeP gegenüber Paraquat- oder Diquat- induzierter Lebernekrose führte zum Postulat einer extrazellulären antioxidativen Schutzfunktion (Burk RF et al. 1995). Die Rolle von SeP als extrazelluläres Antioxidanz wird auch durch die Reduktion der Oxidations- und Nitrosylierungsreaktivität von Peroxynitrit ( $\text{OONO}^\cdot$ ) durch plasmatisches SeP gestützt. Peroxynitrit ( $\text{OONO}^\cdot$ ) ist ein reaktives Intermediat, welches in vivo durch die Reaktion von Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}^\cdot$ ) mit dem Superoxid-Anion ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) entsteht (Arteel GE et al. 1998). Saito wies erstmals nach, dass SeP in Anwesenheit von Glutathion Lipidperoxide reduzieren kann (Saito Y et al. 1999). Damit besitzt SeP eine der PHGPx ähnliche enzymatische Funktion in extrazellulären Flüssigkeiten. Die Beteiligung von SeP am antioxidativen Defense-System wird durch die, neben den 10 Selencysteinresten in einem SeP-Protein integrierten, 17 Cysteinreste weiter untermauert (Burk RF und Hill KE 1994). Die Bedeutung von SeP als Schwermetall-Detoxifikanz bedarf noch weiterer experimenteller Analysen (Mostert V 2000).

Die Rolle von SeP im Plasma wurde durch den immunhistochemischen Nachweis einer in vivo-Bindung von SeP an das Endothel neu beleuchtet. Dies könnte die Erklärung für einen suffizienten Schutz des Gefäßendothels gegenüber von aktivierten Makrophagen/neutrophilen Granulozyten gebildeten Radikalen wie beispielsweise Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}^\cdot$ ) sein (Burk RF et al. 1997). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen selbst kein SeP exprimieren (Anema SM et al. 1999), so dass Niere und Leber weiterhin als Hauptproduktionsorte anzusehen sind. Als, aus dieser Arbeit abgeleitete, neue Erkenntnis ist der Nachweis von lokaler SeP-Synthese in zahlreichen Kompartimenten des humanen Gastrointestinaltrakt zu sehen. Dies kann möglicherweise bei dem derzeitigen Kenntnisstand über die SeP-Funktion als lokaler eigenständiger Defense-Mechanismus gewertet werden. In Transfektionsexperimenten mit dem SeP-Promotor zeigte sich eine Verringerung der Promotoraktivität durch verschiedene proinflammatorische Zytokine ( $\text{IL } 1\beta$ ,  $\text{TNF } \alpha$ ,  $\text{IF } \gamma$ ,  $\text{TGF-}\beta_1$ ) im Sinne einer negativen Akut-Phase-Reaktion. Diese Cytokin-induzierte verminderte SeP-Expression (Dreher I et al. 1997 (a), Mostert V et al. 2001) könnte die Erklärung für die niedrigen Blut-Selenspiegel sein, welche bei zahlreichen akuten oder chronischen, benignen und malignen Erkrankungen beobachtet wurden (Köhrle J 1996). SeP wird in Nierenzellen der Ratte durch Dexamethason vermehrt exprimiert, was als weiteres Indiz für die (noch

genauer zu definierende) Rolle von SeP bei inflammatorischen Prozessen zu werten ist (Tujebajeva R et al. 2000).

In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass SeP im Rahmen der kolorektalen Karzinogenese vermindert gebildet wird. Da die GPx-GI jedoch hochreguliert, TrxR1 und pGPx jedoch unverändert bleiben, scheint diese lokale Regulation unabhängig von der individuellen Selenversorgung abzulaufen (Mörk H et al. 2000). Spezielle, lokal in den Adenomen wirkende Cytokine mit negativer Regulation von SeP sind nicht bekannt. Das komplett gegensätzliche Expressionsmuster von SeP und GI-GPx könnte einerseits ein Epiphänomen im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz darstellen, andererseits wäre auch eine Mutation im SeP-Gen denkbar, da die Gen-Lokalisation von SeP auf Chromosom 5q31 (Hill KE et al. 1996) eine direkte Nähe zum APC-Gen hat. Das APC-Gen nimmt eine Schlüsselrolle bei der karzinomatösen Entartung von Adenomen ein.

Auf der Grundlage dieser Befunde kann die Hypothese formuliert werden, dass der Abfall in der SeP-Expression ein anfängliches Ereignis in der Adenom-Karzinom-Sequenz darstellt und mit der dadurch bedingten erhöhten Anfälligkeit gegenüber oxidativen DNA-Schäden einer weiteren Progression der Entartung von Adenomen den Weg ebnet. Die primäre Verringerung der SeP-Expression im Rahmen der durch oxidativen Stress induzierten, renalen Karzinogenese wurde auch im Rattenmodell gezeigt. Allerdings wurden neben SeP bei zahlreichen anderen Genen, welche antioxidative Proteine kodieren, veränderte Expressionsmuster gefunden (Tanaka T et al. 2000). Der Befund einer verminderten lokalen SeP-Expression in kolorektalen Adenomen steht mit einigen Arbeiten im Einklang, welche eine Korrelation von erniedrigten Plasma- bzw. Blut-Selenspiegeln und kolorektalen Adenomen fanden (Rumi G et al. 1992, Clark LC et al. 1993, Russo MW et al. 1997, Fernandez-Banares F et al. 2002). Dieser Zusammenhang ist in dem hohen SeP-Anteil am Plasma-Selen zu sehen. Die Arbeitsgruppe um Nelson konnte diesen statistischen Trend in deren Untersuchung jedoch nicht bestätigen (Nelson RL et al. 1995).

In einer neueren, groß angelegten Fall-Kontroll-Studie wurde erstmals eine direkte Assoziation niedriger SeP-Plasmaspiegel mit einem erhöhten Risiko für Karzinome des Respiration- und Verdauungstraktes nachgewiesen. Ebenso wurde eine inverse Korrelation von Tabakkonsum und SeP-Plasmaspiegeln gezeigt, was mit lokalen inflammatorischen Prozessen im Respirationstrakt erklärt werden kann (Persson-Moschos M et al. 2000). Die bereits weiter oben beleuchtete Rolle von SeP als negatives Akut-Phase-Protein könnte auch eine Erklärung dafür sein, weshalb im Kolon und Rektum, die aufgrund der physiologischen

Keimbesiedlung bevorzugte Orte der Radikalenbildung sind, die Expression von SeP im Gegensatz zum bakteriell nicht besiedelten terminalen Ileum ausgeprägt ist. Für eine fundierte Interpretation des gastrointestinalen Expressionsmusters bedarf es weiterer Erkenntnisse über die Proteinfunktion und die Expressions-Modulation von SeP. Mit den bekannten Daten über die Funktion einer „cell-defense“ läßt sich die geringe SeP-Expression in der gastralen Mukosa nicht interpretieren. Auch die Frage, warum das vom oxidativen burst weitgehend verschonte ösophageale Plattenepithel SeP-mRNA exprimiert, muss bei dem derzeitigen Wissensstand unbeantwortet bleiben. Mörk konnte auch im präneoplastischen Barrett-Epithel des Ösophagus keine veränderte SeP-Expression feststellen (Mörk H et al. 1998(b)). Da der Barrett-Ösophagus eine Zylinderepithelmetaplasie – eine Transformation von differenziertem Plattenepithel zu kubischem Epithel – ist und eine fakultative Präkanzerose für ein Adenokarzinom darstellt, erscheint ein Vergleich zwischen der SeP-Expression in Platten- und Barrettepithel schwierig. Vielleicht nimmt damit SeP zumindest im Anfangsstadium der Karzinogenese des ösophagealen Schleimhautepithels keine regulative Funktion ein, andererseits könnte SeP in diesem Stadium durch sein antioxidatives Potential eine weitere Progression der Karzinogenese stoppen oder protraahieren.

Diese Hypothese steht auch nicht im Widerspruch zur Linxian-Interventionsstudie, in welcher die kombinierte supplementative Gabe von  $\beta$ -Carotin, Vitamin E und Selen (50  $\mu$ g/d) zu einer Senkung der Gesamtmortalität und der Mortalität des Magen-, nicht aber des Ösophaguskarzinoms führte (Blot WJ et al. 1993). Zum einen waren vor Studienbeginn keine Selenspiegel im Blut zur Verifizierung einer vorbestehenden Selendefizienz bestimmt worden, zum anderen waren keine speziellen Risikofaktoren wie beispielsweise der Barrett-Ösophagus bekannt. Auch wurden beinahe alle Ösophaguskarzinome als Plattenepithelkarzinome klassifiziert. Die Autoren gingen auf der Basis anderer Untersuchungen von deutlich erniedrigten  $\beta$ -Carotin- und Vit. E-Spiegeln, allenfalls aber marginal erniedrigten Selenspiegeln im Plasma aus. Demnach dürften die SeP-Spiegel bei bekannter präferentieller Versorgung gegenüber anderen Selenoproteinen mit Selen bei den Risikopatienten für ein Plattenepithelkarziom nicht wesentlich vermindert gewesen sein, sondern unter Selensupplementierung eher erhöht. Ein kleiner Nachteil der Linxianstudie ist, dass nicht klar entschieden werden kann, ob die eindrucksvolle Senkung der Mortalität am Magenkarzinom von 21 % auf Selen,  $\beta$ -Carotin oder Vit. E bzw. die Kombination aller drei Stoffe zurückzuführen ist. Der Magen als Ort der SeP-Expression wäre ein geeignetes Zielgewebe der Selensupplementierung bei Postulierung des antioxidativen Potentials von

SeP. Der Bedarf an lokaler Protektion gegen oxidativen Stress läßt das Vorkommen von SeP im Duodenum als durchaus sinnvoll erscheinen.

Trotz zahlreicher neuerer in vitro-Daten zum antioxidativen Potential von SeP bleiben noch viele Fragen hinsichtlich seiner biologischen Funktion unbeantwortet; dies gilt insbesondere für die in vivo Wirkung. So ist die Datenlage zur Expression und Funktion von SeP im Gastrointestinaltrakt noch zu dünn, um für pathophysiologische Modelle Verwendung zu finden.

#### **4.4.2 Thioredoxin-Reduktase im humanen Gastrointestinaltrakt**

Die zytosolische Thioredoxin-Reduktase (TrxR) ist der Gruppe der NADPH/H<sup>+</sup>-abhängigen Disulfid-Oxidoreduktasen zugehörig. Zu den Funktionen der TrxR zählen die Proteinfaltung (durch Spaltung von Disulfidbrücken), die Modulation des zellulären Redoxsystems (Reduktion von oxidiertem Trx) und der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP1. Die TrxR steuert damit Prozesse bei Zellwachstum, -differenzierung und -protektion. In eigenen Untersuchungen fand sich eine TrxR1-mRNA-Expression in allen Kompartimenten des humanen Gastrointestinaltrakts mit Ausnahme des terminalen Ileums. Eine TrxR1-Expression im Antrum ventriculi war nicht konstant nachweisbar, die Ursachen hierfür sind unbekannt. Analog dazu wurde durch unsere Arbeitsgruppe in allen untersuchten gastrointestinalen Kompartimenten TrxR-Aktivität nachgewiesen (Mörk H et al. 1998), was eine Translation der TrxR1-mRNA nahelegt. Dies entspricht der Bande im Bereich 50-60 kDa der Antrum-, Korpus- und Kolon-Biopsien beim Labeling mit <sup>75</sup>Se. Aufgrund des ähnlichen Proteingewichts ist – wie bereits in Kap. 4.1.2, 4.2.1, 4.2.2 diskutiert – eine sichere Unterscheidung zwischen TrxR und SeP beim SDS-PAGE nicht möglich.

Die Tatsache, dass dieselbe Bande auch extrazellulär detektierbar ist, sprach beim Vorhandensein von nur einer Bande beim bisherigen Kenntnisstand eher für die Existenz von SeP. Die neue Entdeckung, dass TrxR auch extrazellulär sezerniert wird (Soderberg A et al. 2000), relativiert diese Annahme. Die ubiquitäre gastrointestinale TRxR-Aktivität und die damit korrelierende TrxR1-mRNA-Expression erlauben die Hypothese, dass die TrxR im Gastrointestinaltrakt eine zytoprotektive Funktion ausübt. Bis dahin war eine TrxR1-Expression nur für das Kolon beschrieben (Berggren M et al. 1996). Darüber hinaus ist eine wichtige Funktion von TrxR im Rahmen der Karzinogenese anzunehmen, da gezeigt wurde, dass TrxR-mRNA in Kolonkarzinom-Zelllinien vermehrt exprimiert wird und TrxR-Aktivität ebenso deutlich gesteigert ist. Die TrxR-mRNA-Expression erhöhte sich zusätzlich durch induzierte Hypoxie (Berggren M et al. 1996). In einer weiteren Arbeit wurde nachgewiesen,

dass TrxR in Tumorzelllinien vermehrt gebildet wird und mit verminderter Apoptoserate und Sensibilität gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika einhergeht (Baker A et al. 1997). Die mit erhöhter TrxR-Enzymaktivität auftretende, gesteigerte Transkription sowie Translation in zahlreichen Tumorzelllinien könnte auf eine TrxR-Dysregulation im Rahmen der Karzinogenese deuten. Die Proteinaktivierung in diesen Zelllinien war durch Selen stimulierbar (Gallegos A et al. 1997). Gladyshev fand in Tumorzellen eine gesteigerte TrxR- und im Kontrast dazu eine verminderte cGPx-Expression sowie eine p53 assoziierte inverse Regulierung beider Proteine. Transfektion von nicht alterierten p53 bedingte eine gesteigerte Apoptose mit einer vermehrten cGPx-Expression und zugleich verminderter TrxR-Expression in den Tumorzellen (Gladyshev VN et al. 1998 (b)). Die Daten der Arbeitsgruppen von Gallegos und Gladyshev dürfen als guter Beleg gelten, dass eine Simplifizierung der Kanzeroprotektion von Selen über die Selenoproteine mit gleichsinniger alleiniger antioxidativer Wirkung unzulässig ist. Bei einer solchen Funktion wäre eine gleichsinnige Expression der Enzyme zu erwarten.

So zeigten die Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe eine nur marginal gesteigerte TrxR-Aktivität und unveränderte TrxR1-Expression im präneoplastischen Adenomgewebe gegenüber normaler Kolonschleimhaut (Mörk H et al. 2000). Unsere Arbeitsgruppe konnte beim präneoplastischen Barrett-Epithel des Ösophagus – einer fakultativen Präkanzerose – eine unveränderte TrxR1-Expression bei jedoch gesteigerter (Faktor 2,7) TrxR-Aktivität gegenüber gesundem ösophagealem Plattenepithel zeigen (Mörk H et al. 1998 (b)). Darauf aufgebaute Experimente ergaben eine inverse Regulierung von pGPx und GPx-GI im Barrett-Epithel gegenüber dem normalen ösophagealen Plattenepithel (Kap. 4.4.3.1 und 4.4.3.2, Mörk H et al. 2003). Sowohl die eigene Arbeitsgruppe als auch Gallegos und Mitarbeiter konnten keine klare Korrelation bei der TrxR von mRNA-Level und Enzymaktivität feststellen (Gallegos A et al. 1997). Selen könnte somit lokal die TrxR gewebespezifisch auf dem Niveau der Enzymspezifität stimulieren.

Der TrxR könnte somit im beinahe gesamten Gastrointestinaltrakt eine Regulationsfunktion zukommen, mit welcher Proliferation einerseits, Apoptose andererseits initiiert werden können. Ab einem bisher noch unbekanntem Punkt im Prozess der Karzinogenese scheint die TrxR überwiegend ungünstige Funktionen wie Apoptose- und Chemotherapieresistenz auszuüben. Im Stadium der adenomatösen Schleimhautveränderung des unteren Gastrointestinaltrakts und des Barrett-Ösophagus sind diese negativen Funktionen offenbar noch supprimiert.

### **4.4.3 Gluthationperoxidasen im humanen Gastrointestinaltrakt**

#### **4.4.3.1 Gastrointestinale Gluthationperoxidase im humanen Gastrointestinaltrakt**

Die Detektion der GPx-GI-mRNA in der Mukosa von Ösophagus, Korpus und Antrum ventriculi sowie Kolon und Rektum stellen zusammen mit dem fehlenden GPx-GI-mRNA-Nachweis in Duodenum und terminalem Ileum ein bislang nicht bekanntes differenzielles Expressionsmuster dar. Aus bisherigen Studien waren lediglich die Expression in humaner Kolonmukosa sowie in Ösophagus-, Dünndarm- und Kolonschleimhaut der Ratte bekannt (Chu FF et al. 1993). Das Expressionsmuster ähnelt dem der TrxR1, so dass auch hier eine bedarfsorientierte Transkription und Translation des Gens denkbar ist. Offenbar ist der Bedarf an protektiven Substanzen im terminalen Ileum und im Duodenum niedriger als an Orten, an welchen aufgrund dichter bakterieller Besiedlung und zeitlich gesehen langer Exposition gegenüber Darminhalt die lokale Toxizität durch luminale oxidative Noxen erhöht ist.

Die Frage nach dem jeweiligen Beitrag der beiden gastrointestinal exprimierten Isoformen GPx-GI und pGPx (cGPx-mRNA konnte nicht detektiert werden) zur Neutralisation von ROI im menschlichen Digestionstrakt muss derzeit noch unbeantwortet bleiben. Im Kolon von Ratten haben GPx-GI und cGPx etwa den gleichen Anteil an der GPx-Aktivität (Esworthy RS et al. 1998). Durch unsere Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass die funktionelle GPx-Aktivität, welche eine summative Wirkung der verschiedenen GPx-Isoformen repräsentiert, nur teilweise mit den mRNA-Daten korreliert.

Während in Kolon und Rektum eine starke GPx-GI-mRNA mit einer hohen GPx-Aktivität einher ging, war im Ösophagus bei ausgeprägter GPx-GI- und pGPx-Expression nur eine niedrige GPx-Aktivität messbar (Mörk H et al. 1998). Ebenso wurde im Mausmodell gezeigt, dass die GPx-GI-mRNA-Expression im Kolon nicht streng mit der lokalen GPx-Aktivität korreliert. Die Autoren postulieren eine unterschiedliche Substratspezifität von GPx-GI und cGPx als Ursache für diesen Befund (Chu FF et al. 1997). In der selben Arbeit wurde eine positive Korrelation zwischen den GPx-GI-mRNA-Level und der Resistenz gegenüber chemisch induzierten Kolonkarzinomen nachgewiesen. Als Erklärung wird eine GPx-GI bedingte Verminderung der cGPx-Expression und damit gesteigerte Apoptose der genomisch alterierten Kolonzellen herangezogen. Eine koinzidente Translation beider Isoenzyme scheint trotz der angeführten Daten zum teils widersprüchlichen Verhältnis GPx-GI-/pGPx-Expression zur GPx-Aktivität plausibel. Durch die pGPx-Sekretion könnten relevante Mengen im GPx-Aktivitätsassay des Gewebes fehlen und somit (abhängig vom Ausmaß der Sekretion) die teilweise relativ niedrige GPx-Aktivität bedingen. Eine weitere Erklärung für

eine geminderte Translation von GPx-GI und pGPx könnte die aus Zellkulturen bekannte Selenregulation der GPx-Aktivität sein.

Durch unsere Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass in den Zelllinien Caco 2 und ST 23132 unter Selenmangelbedingungen die GPx-Aktivität signifikant erniedrigt ist während additive Selenitzugabe in das Kulturmedium mit einer gesteigerten GPx-Aktivität einhergeht. Analog zu anderen Zelllinien (HepG2, hFOB) zeigt Selenit keinen regulatorischen Effekt auf die Transkription der beiden Isoenzyme (Mörk H 1998). Diese Selenregulation der GPx-Translation wird über das SECIS-Element (Kap. 1.2) gesteuert (Weiss SL und Sunde RA 1997). Basierend auf den Daten von Selendepletionsversuchen in Tiermodellen postuliert Brigelius-Flohé für GPx-GI die Führungsrolle innerhalb der Hierarchie der GPx-Familie (Brigelius-Flohé R 1999), was deren elementare Bedeutung für den menschlichen Gastrointestinaltrakt erahnen lässt.

In, auf den Ergebnissen dieser Arbeit abgeleiteten Experimenten wurde für GPx-GI eine gesteigerte Expression in den prämaligen Geweben von kolorektalen Adenomen (Mörk H et al. 2000 (a) und Barrett-Ösophagus (Mörk H et al. 2003) gegenüber dem normalen Gewebe nachgewiesen. Derzeit wird darin eine Schutzfunktion, welche die Transformation von Mataplasie zu Dysplasie protrahiert oder verhindert, gesehen. Inwieweit weitere Alterationen im Expressionsmuster der gastrointestinalen Selenoproteine im Rahmen der folgenden Transformationsprozesse auftreten, gilt es noch zu untersuchen.

#### **4.4.3.2 Plasmatische Gluthationperoxidase im humanen Gastrointestinaltrakt**

Für die pGPx-mRNA liegt eine Expression in allen untersuchten Kompartimenten des Gastrointestinaltrakts vor. Bisher lagen keine Daten zur gastrointestinalen Expression von pGPx beim Menschen vor. Allerdings publizierte Tham zeitgleich den Nachweis der pGPx-mRNA sowie des Proteins intra- und extrazellulär im menschlichen Dickdarm (Tham DM et al. 1998). Auf spezielle Lokalisationen der entnommenen und untersuchten Proben wurde in dieser Publikation nicht eingegangen, jedoch wurde mit in-situ-Hybridisierung das apikale villöse Drüsengewebe als hauptsächlicher Produktions- und Sekretionsort identifiziert. Die luminalen Sekretion wird als extrazellulärer antioxidativer Schutz gewertet. Diese Feststellung ist insofern wichtig, da hiermit ein weiterer Produktionsort neben dem proximalen Nierentubulus und anderen beschriebenen Geweben (Kap. 1.5.1.2) entdeckt wurde.

Die im Vergleich zu den restlichen gastrointestinalen Abschnitten sehr starke Expression von pGPx in den ösophagealen Gewebeproben ist möglicherweise durch das Plattenepithel des Ösophagus bedingt. Da der Ösophagus sowohl chemischem (z. B. durch physiologischen

gastralen Säure-Reflux) als auch mechanischem Stress ausgesetzt ist, wäre eine lumenwärts gerichtete Protektion des Epithelverbandes durchaus sinnvoll. Die aus den Daten der vorliegenden Arbeit abgeleiteten Folgeuntersuchungen zeigten eine deutlich verminderte pGPx-Transkription in der Mukosa des Barrett-Ösophagus. Im Gegensatz hierzu wurde die GPx-GI verstärkt exprimiert (Mörk H et al. 2003). Diese mutmaßliche Schwächung des extrazellulären „defense-system“ könnte auf längere Sicht hin ROI-induzierte Schäden ermöglichen und damit zur malignen Transformation des Barrett-Epithels führen.

In der Embryonalentwicklung der Maus wird pGPx in verschiedenen embryonalen Geweben (anfänglich im Trophoblasten, später auch in Dezidua, Dottersack, fetaler Haut) exprimiert. In erwachsenen Tieren kommt pGPx neben den bekannten Geweben auch in der Haut, den Villi des Gastrointestinums und im Fettgewebe vor (Kingsley PD et al. 1998). Damit könnte der pGPx in der Embryonalphase eine Rolle im feto-maternalen crosstalk, im adulten Gewebe eine Funktion beim Lipidtransport oder -metabolismus zukommen.

Die auffallende Expression und Sekretion von pGPx an Grenzflächen führt neuerdings zu der Spekulation, dass pGPx einen extrazellulären Modulator für das Maß an extrazellulär wirksamen Lipoxigenasen darstellen könnte (Brigelius-Flohé R 1999). Ein die Lipoxigenasen dämpfendes System könnte die obligatorische Lipoxigenase-induzierte Bildung von Leukotrienen und Thromboxanen drosseln und damit dem lokalen circulus vitiosus des übermäßigen „oxidative burst“ vorbeugen. Im Gegensatz zu anderen Selenoproteinen ist für pGPx keine alterierte Expression im Rahmen der Karzinogenese bekannt.

#### **4.4.3.3 Cytosolische Gluthationperoxidase im humanen Gastrointestinaltrakt**

Die fehlende Nachweisbarkeit von cGPx im gesamten humanen GI-Trakt mit zwei unabhängigen Sonden könnte ein Hinweis darauf sein, dass bei der Spezies Mensch die lokale epitheliale Zytrotektion durch die anderen Isoenzyme der GPx-Familie (GPx-GI und pGPx) suffizient gewährleistet ist. Tham hingegen fand eine cGPx-Expression und Proteinbildung im menschlichen Dickdarmepithel (Tham DM et al. 1998). Da Chu die cGPx-mRNA im Gastrointestinaltrakt von Nagetieren überzeugend nachgewiesen hat, kann eine artspezifische Genexpression zugrunde liegen (Chu et al. 1997). Brigelius-Flohé konnte im Gastrointestinaltrakt von selendepletierten Ratten GPx-GI, aber keine cGPx nachweisen und interpretierte dies als exemplarisch für die Hierarchie der Glutathionperoxidasen im Gastrointestinaltrakt (Brigelius-Flohé R 1999).

In den eigenen <sup>75</sup>Se-labeling Experimenten könnten die in gastrointestinalen Zell- und Primärkulturen gefundenen Proteinbanden im Bereich von 22/23 kDa nach den bisherigen

Erkenntnissen (Behne D und Kyriakopoulos A 2001) neben der GPx-GI auch der cGPx entsprechen. Hierbei muss wiederum die Tatsache, dass es sich bei den Zelllinien um Tumorzellen mit folglich veränderten Genom handelt, beachtet werden. Ob die fehlende Nachweisbarkeit der cGPx-mRNA im Northern-Blot die Realität widerspiegelt oder das Resultat eines in dieser Fragestellung zu wenig sensitiven Verfahrens ist, könnte mittels PCR-Analyse wahrscheinlich hinreichender geklärt werden. Bei der Betrachtung der cGPx-Expression im Vergleich zu anderen Selenoproteinen (SeP, PHGPx, 5'-DI) unter Selendepletion in verschiedenen Tierversuchen scheint cGPx (analog zu PHGPx) für Gehirn sowie reproduktive und endokrine Organe, nicht aber für viszerale Organe von Bedeutung zu sein (Brigelius-Flohé R 1999). Der Gastrointestinaltrakt war in diesen Versuchen nicht untersucht worden. Da jedoch bis heute keine relevante Expression im humanen GI-Trakt gezeigt werden konnte, dürfte hier die cGPx im Vergleich zu anderen Selenoproteinen und Organen keine größere Rolle spielen.

Versuche mit Knockout-Mäusen deuten darauf hin, dass cGPx für eine normale Entwicklung nicht essentiell ist, aber mit einem erhöhten Maß an oxidativem Stress wichtiger wird. Bezüglich der Funktion der cGPx wird derzeit eine Bedeutung bei der Initiierung der Zytokin-induzierten Signaltransduktion einerseits, eine elementare Rolle bei der Apoptose-Steuerung andererseits diskutiert (Chu FF et al. 1997, Brigelius-Flohé R 1999). Die Absenkung der Konzentration an Hydroperoxiden durch cGPx nimmt in Zellkulturen den Stimulus für Apoptose-Initiierung und Cyclooxygenase-Bildung.

#### **4.5 Veränderungen des Expressionsmusters der Selenoproteine in der Magen-Mukosa bei verschiedenen gastralen Erkrankungen**

Eine relativ verminderte mRNA-Bildung liegt wahrscheinlich in sämtlichen Magenbiopsien mit pathologischen Veränderungen vor, ist aber in den Hp-positiven Biopsien marginal. Eine den unterschiedlichen Krankheitsentitäten zuzuordenbare Transkriptions-Verminderung erscheint aufgrund der Anzahl der Biopsien verfrüht. Auffällig ist jedoch die sehr starke Reduzierung der mRNA-Bildung von TrxR1, pGPx und besonders GPx-GI bei Magenlymphom und Typ A Gastritis. Die mRNA-Level dieser Proteine sind bei der Hp-positiven Typ B Gastritis mäßig erniedrigt. Diese Erstbefunde sollten Anlass und Grundlage sein, für die jeweiligen Krankheitsbilder nach pathophysiologischen Regulationsmustern der Selenoproteine zu suchen, wie dies bereits für Kolonadenom (Mörk H et al. 2000) und Barrett-Ösophagus (Mörk H et al. 2003) geschehen ist. Einschränkend sollte nochmals betont werden, dass die Interpretation der Banden maßgeblich auf der densitometrischen

Auswertung, welche aufgrund von zahlreichen individuellen Einstellungsmöglichkeiten Untersucher-abhängig ist, basierte.

#### **4.6 Ausblick**

Neben dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Expressionsmuster bereits identifizierter Selenoproteine im menschlichen Gastrointestinaltrakt wurde der Versuch unternommen, in gastrointestinalen Zellkulturen Ansatzpunkte für Regulationsmechanismen dieser Proteine zu detektieren. Wie auch in anderen Zellkulturen deutete sich dabei eine partielle Hormonsensitivität eines Selenoproteins an. Die beobachtete Hochregulation der GPx-GI durch Tamoxifen im Gastrointestinaltrakt könnte den molekularen Brückenschlag zwischen der epidemiologisch beschriebenen positiven Korrelation von Tamoxifen und der Inzidenz an Kolonkarzinomen sowie der beobachteten GPx-GI-Überexpression in kolorektalen Adenomen darstellen. Mit dieser Hypothese soll auf die Notwendigkeit hingewiesen werden, auf der Grundlage valider Daten, wie beispielsweise der „Clark-Studie“, einerseits weitere klinische Studien folgen zu lassen, andererseits auf molekularer Ebene die Funktion der zahlreichen Selenoproteine zu erforschen. Für die erste Forderung sei die neu angelegte australische Interventionsstudie zur Prävention des Prostatakarzinoms (APPOSE-trial: australian prostate cancer prevention trial), in welcher die Patienten des Versuchsarmes (anamnestisch Prostata-Karzinom in der Familie) 200 µg Selen/d über 10 Jahre einnehmen (Costello AJ 2001), angeführt.

Die Notwendigkeit, bei sämtlichen bekannten und noch zu klassifizierenden Selenoproteinen molekulare und regulative Charakteristika zu identifizieren, kann exemplarisch an SeP aufgezeigt werden. Obwohl SeP bereits vor ca. 20 Jahren entdeckt wurde, ist die funktionelle Charakterisierung bei weitem noch nicht abgeschlossen. Unter Berücksichtigung der noch zu wenig bekannten molekularen Eigenschaften sämtlicher Selenoproteine muss auf die Gefahr, dass Selen undifferenziert und unkontrolliert als Allheilmittel eingesetzt wird, hingewiesen werden.

Die positiven Daten der „Clark-Studie“ bezüglich der prophylaktischen Wirkung von Selen gegenüber einzelnen Tumorentitäten, sollte nicht zu vereinfachten Interpretationen des Wirkungspotentials von Selen und daraus abgeleitetem unselektiven Einsatz bei verschiedenen Krankheitsbildern führen. Bei der HIV-Infektion zeigt sich beispielhaft, dass die Einstufung der Glutathionperoxidase-Familie als reines antioxidatives Schutzsystem zu kurz gegriffen ist. Einerseits ist die verminderte GSH und GPx-Aktivität in affektierten CD4<sup>+</sup> Lymphozyten und Lymphknoten belegt. Dies führt konsekutiv durch die erhöhten

Hydroperoxid-Spiegel zur Apoptose-Induktion, was auf den ersten Blick eine sinnvolle immunologische Reaktion gegenüber infizierten Zellen darstellt. Andererseits ist dies genau der Pathomechanismus, welcher zum deletären Abfall der CD4+-Zellen führt. Klinisch führte dieser Widerspruch zum Paradigmenwechsel von anfänglich propagierter Gabe antioxidativer Substanzen zur derzeitigen Favorisierung der Tolerierung eines gewissen Maßes an oxidativem Stress. Dieses Beispiel zeigt deutlich, dass den Glutathionperoxidasen ergänzend die Aufgabe zukommt, den Spiegel an essentiellen Hydroperoxydoxidasen den jeweiligen Erfordernissen anzupassen.

So sollten, unter Berücksichtigung der biologischen Wirkung des Selens auf diverse Organsysteme und biologische Funktionen, Empfehlungen zum prophylaktischen, supplementativen und therapeutischen Einsatz von Selen auf der Grundlage molekularbiologischer und klinischer Studien erfolgen.

## 5. Zusammenfassung

Von den bisher entdeckten Selenoproteinen im Organismus von Eu- und Prokaryonten sind nur wenige Proteine hinsichtlich ihrer biologischen Funktion weitgehend analysiert. Mit zunehmenden Erkenntnisgewinn über Funktion und Regulation einzelner Selenoproteine kristallisiert sich eine Gewebsspezifität heraus. Über die Genexpression von Selenoproteinen im Gastrointestinaltrakt des Menschen gibt es nur wenige Daten. Da für die kontinuierliche nutritive Selensupplementation ein eindrucksvoller präventiver Effekt auf die Inzidenz kolorektaler Karzinome nachgewiesen wurde, erscheint der Gastrointestinaltrakt als wichtiges Zielorgan für Selen und Selenoproteine. In der vorliegenden Arbeit wurden molekularbiologische und proteinbiochemische Untersuchungen zur Genexpression und Funktion einzelner Selenoproteine im Gastrointestinaltrakt durchgeführt. Dabei wurden mit Selenoprotein P (SeP), Thioredoxinreduktase (TrxR1) und den beiden Isoformen der Glutathionperoxidase GPx-GI und pGPx erstmals vier verschiedene gastrointestinale Selenoproteine auf mRNA-Ebene identifiziert. Hier zeigte sich ein differenzielles Expressionsmuster in den verschiedenen Kompartimenten des humanen Verdauungstraktes. Dieser Befund bildete die Grundlage für weitere Untersuchungen, in welchen veränderte Expressionsmuster der Selenoproteine in gastrointestinalen Präkanzerosen wie kolorektale Adenome oder Barrett-Ösophagus nachgewiesen werden konnten. Analog hierzu fand sich eine Expression dieser Selenoproteine in den humanen Kolon- und Magenkarzinomzelllinien Caco 2 und ST23132, was diese als geeignetes Zellkultursystem zur Untersuchung der Regulation der Genexpression ausweist. Die Detektion der zu den genannten Proteinen zugehörigen Banden in metabolischen Markierungsversuchen mit  $^{75}\text{Se}$  (in Zellkultur und gastrointestinalen Schleimhautbiopsien) ist als Nachweis der Translation dieser Gene zu werten. Von besonderem Interesse ist die Rolle der GPx-GI bei der gastrointestinalen Karzinogenese. Die aus epidemiologischen Daten als Karzinogene einzustufenden Stoffe Ethanol und Tamoxifen bewirken in der Zellkultur eine gesteigerte Genexpression der GPx-GI. Die vermehrte Bildung von GPx-GI wurde auch in kolorektalen Adenomen, einer fakultativen Präkanzerose, gefunden. Der Stellenwert der veränderten Genexpression von gastrointestinalen Selenoproteinen im Rahmen der Karzinogenese bleibt noch weiter zu untersuchen. Eine Wirkung von Östrogen auf die gastrointestinalen Selenoproteine war nicht nachweisbar. Diese Frage war Gegenstand dieser Arbeit, da für Östrogen (wie auch für Selen) epidemiologisch ein Schutzeffekt gegen kolorektale Karzinome bekannt ist. Zu den zukünftig weiter zu klärenden Fragen gehört insbesondere die weitere Aufklärung der biologischen Funktionen von Selenoproteinen.

## 6. Literaturverzeichnis

Anema SM, Walker SW, Howie FA, Arthur JR, Nicol F, Beckett GJ. Thioredoxin reductase is the major selenoprotein expressed in human umbilical vein endothelial cells and is regulated by protein kinase C. *Biochem J* 1999; 342: 111-117

Arteel GE, Mostert V, Oubrahim H, Briviba K, Abel J, Sies H. Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration. *Biol Chem* 1998; 379: 1201-1205

Avissar N, Ornt DB, Yagil Y, Horowitz S, Watkins RH, Kerl EA, Takahashi K, Palmer IS, Cohen HJ. Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am J Physiol* 1994; 266: 367-375

Babbs CF. Free radicals in the etiology of colorectal cancer. *Free Rad Biol Med* 1990; 8: 191-200

Baker A, Payne CM, Briehl MM, Powis G. Thioredoxin, a gene found overexpressed in human cancer, inhibits apoptosis in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1997; 57: 5162-5167

Bao Y, Williamson G. Alpha-Tocopherol enhances the peroxidase activity of hemoglobin on phospholipid hydroperoxide. *Redox Rep* 1997; 3:325-330

Beath O, Draize JH, Eppson HF, Gilbert CS, McCreary OC. Certain poisonous plants of Wyoming activated by selenium and their association with respect to soil types. *J Amer Pharm Assoc* 1934; 23: 94-97

Beck MA, Kolbeck PC, Rohr LH, Shi Q, Morris VC, Levander OA. Benign human enterovirus becomes virulent in selenium-deficient mice. *J Med Virol* 1994; 43: 166-170

Behne D, Wolters W. Distribution of selenium and glutathione peroxidase in the rat. *J Nutr* 1983; 113: 456-461

Behne D, Hilmert H, Scheid S, Gessner H, Elger W. Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1988; 966: 12-21

Behne D, Kyriakopoulos A. Effects of dietary selenium on the tissue concentrations of type I iodothyronine 5'-deiodinase and other selenoproteins. *Am J Clin Nutr Suppl* 1993; 57: 310-312

Behne D, Weiss-Novak C, Westphal C, Gessner H, Kyriakopoulos A. Studies on the distribution and characteristics of new selenium-containing proteins. *Analyst* 1995; 120: 823-825

Behne D, Kyriakopoulos A. Mammalian selenium-containing proteins. *Annu. Rev. Nutr.* 2001; 21: 453-473

- Beilstein MA, Vendeland SC, Barofsky E, Jensen ON, Whanger PD. Selenoprotein of rat muscle binds glutathione and an unknown small molecular weight moiety. *J Inorg Biochem* 1996; 61: 117-124
- Beno I, Staruchova M, Volovova K, Batovsky M. Increased antioxidant enzyme activities in the colorectal adenoma and carcinoma. *Neoplasma* 1995; 42: 265-269
- Berggren M, Gallegos A, Gasdaska JR, Gasdaska PY, Warneke J, Powis G. Thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in human tumors and cell lines, and the effect of serum stimulation and hypoxia. *Anticancer Res* 1996; 16: 3459-3466
- Bermano G, Nicol F, Dyer JA, Sunde RA, Beckett GJ, Arthur JR. Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats. *Biochem J* 1995; 311: 425-430
- Berry MJ, Banu L, Chen YY, Mandel SJ, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR. Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3'untranslated region. *Nature* 1991; 353: 273-276
- Biesalski HK, Berger MM, Brätter P, Brigelius-Flohé R, Fürst P, Köhrle J, Oster O, Shenkin A, Viell B, Wendel A. Kenntnisstand Selen - Ergebnisse des Hohenheimer Konsensusmeetings. *Akt Ernähr Med* 1997; 22: 224-231
- Björnstedt M, Xue J, Huang W, Akesson B, Holmgren A. The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient donors to human plasma glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1994; 269: 29382-29384
- Blot WJ, Li J-Y, Taylor PR, Guo W, Dawsey S, Wang GQ, Yang CS, Zheng SF, Gail M, Li GY, Yu Y, Liu B, Tangrea J, Sun Y, Liu F, Fraumeni JF, Zhang JH, li B. Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J Nat Cancer Inst* 1993; 85: 1483-1492
- Böck A, Forchhammer K, Heider J, Leinfelder W, Sawers G, Veprek B, Zinoni F. Selenocysteine: the 21st amino acid. *Mol Microbiol* 1991; 5: 515-520
- Bösl MR, Takaku K, Oshima M, Nishimura S, Taketo MM. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (*Trsp*). *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5531-5534
- Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* 1995; 18: 1033-1077
- Brigelius-Flohé R, Aumann KD, Blöcker H, Gross G, Kiess M, Klöppel KD, Maiorino M, Roveri A, Schuckelt R, Ursini F, Wingender E, Flohé L. Phospholipid hydroxyperoxide glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1994; 269: 7342-7348

Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 951-965

Burguera JL, Villasmil LM, Burguera M, Carrero P, Rondon C, de-Abel-de-la-Cruz AM, Brunetto MR, Gallignani M. Gastric tissue selenium levels in healthy persons, cancer and non cancer patients with different kind of mucosal damage. *J Trace Elem Biol* 1995; 9: 160-164

Burk RF and Hill KE. Selenoprotein P. A selenium-rich extracellular glycoprotein. *J Nutr* 1994; 124: 1891-1897

Burk RF, Hill KE, Awad JA, Morrow JD, Kato T, Cockell KA, Lyons PR. Pathogenesis of diquat-induced liver necrosis in selenium deficient rats: assessment of the roles of lipid peroxidation and selenoprotein P. *Hepatology* 1995; 21: 561-569

Calle EE, Miracle-McMahill HL, Thun MJ, Heath CW. Estrogen replacement therapy and risk of fatal colon cancer in a prospective cohort of postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 517-523

Celi FS, Canettieri G, Yarnall DP, Burns DK, Andreoli M, Shuldiner AR, Centanni M. Genomic characterization of the coding region of the human type II 5'-deiodinase gene. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 141: 49-52

Chambers I, Frampton J, Goldfarb P, Affara N, McBain W, Harrison PR. The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the „termination“ codon, TGA. *EMBO J* 1986; 5: 1221-1227

Chasseur C, Suetens C, Nolard N, Begaux F, Haubruge E. Fungal contamination in barley and Kashin-Beck disease in Tibet. *Lancet* 1997; 350: 1074

Cheng WH, Ho YS, Ross DA, Han A, Combs GF, Lei XG. Overexpression of cellular glutathione peroxidase does not affect expression of plasma glutathione peroxidase and phospholipidhydroperoxide glutathione peroxidase in mice offered diets adequate or deficient in selenium. *J Nutr* 1997; 127: 675-680

Chomczynski P, Sacchi N. Single-Step Method of RNA-Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159

Chu FF, Esworthy SE, Doroshov HK, Doan J, Lie XF. Expression of plasma glutathione peroxidase in human liver in addition to kidney heart and breast in humans and rodents. *Blood* 1992; 79: 3233-3238

Chu FF, Doroshov JH, Esworthy RS. Expression characterization and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem* 1993; 268: 2571-2576

Chu FF. The human glutathione peroxidase genes GPX2, GPX3, and GPX4 map to chromosomes 14, 5, and 19, respectively. *Cytogenet Cell Genet* 1994; 66: 96-98

Chu FF, de Silva HAR, Esworthy RS, Roteva KK, Walters CE, Roses A, Rao PN, Pettenatti MJ. Polymorphism and chromosomal localization of the GI-form of the human glutathione peroxidase GPX2 on 14q24.1 by in situ hybridization. *Genomics* 1996; 32: 272-276

Chu FF, Esworthy RS, Ho YS, Bermeister M, Swiderek K, Elliott RW. Expression and chromosomal mapping of mouse GPx2 gene encoding the gastrointestinal form of glutathione peroxidase, GPX-GI. *Biomed Environm Sci* 1997; 10: 156-162

Clark LC, Hixson LJ, Combs GF Jr, Reid ME, Turnbull BW, Sampliner RE. Plasma selenium concentration predicts the prevalence of colorectal adenomatous polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1993; 2: 41-46

Clark LC, Combs GF Jr., Turnbull BW et al. (for the Nutritional Prevention of Cancer Study Group). Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma in the skin. *JAMA* 1996; 276: 1957-1963

Combs GF, Clark LC, Turnbull BW. Cancer prevention by selenium: Evidence from a randomized clinical trial. In *Fo Onkologie* 1999; 2: 3-6

Cooper AJL, Kristal BS. Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol Chem* 1997; 378: 793-802

Costello AJ. A ranomised, controlled chemoprevention trial of selenium in familial prostate cancer: rationale, recruitment, and design issues. *Urology* 2001; 57:182-184

Cowan DB, Weisel RD, William WG, Mickle DAG. Identification of oxygen responsive elements in the 5'-flanking region of the human glutathione peroxidase gene. *J Biol Chem* 1993; 268: 26904-26910

Croteau W, Whittemore SK, Schneider MJ, St. Germain DL. Cloning and expression of cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem* 1995; 270: 16569-16575

Dickson RC, Tomlinson RH. Selenium in blood and human tissues. *Clin Chim Acta* 1967; 16: 311-321

Di Domenico M, Castoria G, Bilancio A, Migliaccio A, Auricchio F. Estradiol activation of human colon carcinoma-derived Caco-2 cell growth. *Cancer Res* 1996; 56: 4516-4521

Dreher I. Molekularbiologische Untersuchungen eukaryontischer Selenoproteine und Charakterisierung des humanen Selenoprotein P-Promoters. Dissertation, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg 1997

Dreher I, Jakobs TC, Köhrle J. Cloning and characterization of the human selenoprotein P promoter. *J Biol Chem* 1997; 272: 29364-29371 (a)

Dreher I, Schmutzler C, Jakob F, Köhrle J. Expression of selenoproteins in various rat and human tissues and cell lines. *J Trace Elem Med Biol* 1997; 11: 83-91 (b)

Eberle B, Haas HJ. Purification of selenoprotein Ph from human plasma. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 1993; 7: 217-221

Eide TJ. Risk of colorectal cancer in adenoma-bearing individuals within a defined population. *Int J Cancer* 1986; 38: 173-176

El-Bayoumy K, Upadhyaya P, Chae YH, Sohn OS, Rao CV, Fiala E, Reddy BS. Chemoprevention of cancer by organoselenium compounds. *J Cell Biochem Suppl* 1995; 22: 62-100

Esworthy RS, Swiderek K, Ho YS, Chu FF. Selenium-dependent glutathione peroxidase-GI is a major glutathione peroxidase activity in the mucosal epithelium of rodent intestine. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1381: 213-226

Fan S, Wang J-A, Yuan R, Ma Y, Meng Q, Erdos MR, Pestell RG, Yuan F, Auburn KJ, Goldberg ID, Rosen EM. BRCA 1 inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells. *Science* 1999; 284: 1354-1356

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767

Fernandez-Banares F, Cabre E, Esteve M, Mingorance MD, Abad-Lacruz A, Lachica M, Gil A, Gassull MA. Serum selenium and risk of large size colorectal adenomas in ageogeographical area with a low selenium status. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:2103-2108

Flohé L, Günzler W, Schock HH. Glutathione peroxidase. A selenoenzyme. *FEBS Letters* 1973; 32: 132-134

Forchhammer K, Leinfelder W, Böck A. Identification of a novel translation factor necessary for the incorporation of selenocysteine into protein. *Nature* 1989; 342: 453-456

Foster LH, Sumar S. Selenium in health and disease: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1997; 37: 211-228

Franke K, Potter W. A new toxicant occurring naturally in certain samples of plant food stuffs. IX. Toxic effects of orally ingested selenium. *J Nutr* 1935; 10: 213-221

Gärtner R, Angstwurm M. Die Bedeutung von Selen in der Intensivmedizin. *Med Klin* 1999; 94: 54-57

Gärtner R, Albrich W, Angstwurm M. The effect of a selenium supplementation on the outcome of patients with severe systemic inflammation, burn and trauma. *BioFactors* 2001;14: 199-204

- Gallegos A, Berggren M. Mechanisms of the regulation of thioredoxin reductase activity in cancer cells by the chemopreventive agent selenium. *Cancer Research* 1997; 57: 4965-4970
- Gasdaska PY, Gasdaska JR, Cochran S, Powis G. Cloning and sequencing of a human thioredoxin reductase. *FEBS Letters* 1995; 373: 5-9
- Gibson R S. Assessment of trace element status in humans. *Prog Food Nutr Sci* 1989; 13: 67-111
- Gladyshev VN, Jeang K-T, Wootton JC, Hatfield DL. A new human selenium-containing protein. *J Biol Chem* 1998; 273: 8910-8915 (a)
- Gladyshev VN, Factor VN, Housseau F, Hatfield DL. Contrasting patterns of regulation of the oxidant selenoproteins, thioredoxin reductase and glutathione peroxidase, in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251: 488-493 (b)
- Gopalakrishna R, Gundimeda U. Antioxidant regulation of protein kinase C in cancer prevention. *J Nutr* 2002; 132: 3819-3823
- Grodstein F, Newcomb PA, Stampfer MJ. Postmenopausal hormone therapy and the risk of colorectal cancer: a review and meta-analysis. *Am J Med* 1999; 106: 574-82
- Gross M, Oertel M, Köhrle J. Differential selenium dependent expression of type I 5'-deiodinase and glutathione peroxidase in porcine epithelial kidney cell line LLC-PK1. *Biochem J* 1995; 306: 851-856
- Guimarares MJ, Peterson D, Vicari A, Cocks BG, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Ferrick DA, Kastalein RA, Bazan JF, Zlotnik A. Identification of a novel selD homolog from eucaryotes, bacteria, and archea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism? *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 15086-15091
- Gupta S, Narang R, Krishnaswami K, Yadav S. Plasma selenium levels in cancer patients. *Indian J Cancer* 1994; 31:192-197
- Hartfiel W, Bahners N. Selenium deficiency in the Federal Republic of Germany. *Biol Trace Elem Res* 1988; 15: 1-12
- Heider J, Baron C, Böck A. Coding from distance: dissection of the mRNA determinants required for the incorporation of selenocysteine into protein. *EMBO J* 1992; 11: 3759-3766
- Hill KE, Lloyd RS, Yang JG, Read R, Burk RF. The cDNA for rat selenoprotein P contains 10 TGA codons in the open reading frame. *J Biol Chem* 1991; 266: 10050-10053
- Hill KE, Lyons PR, Burk RF. Differential regulation of rat liver selenoprotein mRNAs in selenium deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 185: 260-263

- Hill KE, Lloyd RS, Burk RF. Conserved nucleotide sequences in the open reading frame and 3' untranslated region of selenoprotein P mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 537-541
- Hill KE, Dasouki M, Phillips JA, Burk RF. Human selenoprotein P gene maps to 5q31. *Genomics* 1996; 36: 550-551
- Hill KE, McCollum GW, Boeglin ME, Burk RF. Thioredoxin reductase activity is decreased by selenium deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 234: 293-295
- Himeno S, Chittum HS, Burk RF. Isoforms of selenoprotein P in rat plasma. *J Biol Chem* 1996; 271: 15769-15775
- Ho YS, Howard AJ, Crapo JD. Nucleotide sequence of a rat glutathione peroxidase cDNA. *Nucleic Acid Res* 1988; 16: 5207
- Ho YS, Magnenat JL, Bronson RT, Cao J, Gargano M, Sugawera M, Funk CD. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J Biol Chem* 1997; 272: 16644-16651
- Holmgren N, Björnstedt M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* 1995; 252: 199-208
- Hubert N, Walczak R, Carbon P, Krol A. A protein binds the selenocysteine insertion element in the 3'-UTR of selenoprotein mRNAs. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 464-469
- Imlay JA, Chin SM, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* 1988; 240: 640-642
- Jakobs TC, Koehler MR, Schmutzler C, Glaser F, Schmid M, Köhrle J. Structure of the human type I iodothyronine 5'-deiodinase gene and localization to chromosome 1p32-p33. *Genomics* 1997; 42: 361-363
- Janne PA; Mayer RJ. Chemoprevention of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342: 1960-1968
- Jansson B. Geographic mappings of colorectal cancer rates: a retrospect of studies, 1974-1984. *Cancer Prev Det* 1985; 8: 341-348
- Jao SW, Shen KL, Lee W, Ho YS. Effect of selenium on 1,2-dimethylhydrazine-induced intestinal cancer in rats. *Dis Colon Rectum* 1996; 39: 628-631
- Jornot L, Junod AF. Hyperoxia, unlike phorbol ester, induces glutathione peroxidase through a protein kinase-independent mechanism. *Biochem J* 1997; 326: 117-123
- Jumarie C, Malo C. Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. *J Cell Physiol* 1991; 149: 24-33

Kalcklösch M, Kyriakopoulos A, Hammel C, Behne D. A new selenoprotein found in the glandular epithelial cells of the rat prostate. *Biochem Biophys Res Comm* 1995; 217: 162-170

Kingsley PD, Whitin JC, Cohen HJ, Palis J. Developmental expression of extracellular glutathione peroxidase suggest antioxidant roles in deciduum, visceral yolk sac, and skin. *Mol Reprod Dev* 1998; 49: 343-355

Kirkpatrick DL, Ehrmantraut G, Stettner S, Kunkel M, Powis G. Redox active disulfides: the thioredoxin system as a drug target. *Oncol Res* 1997; 9: 351-356

Köhrle J. Selen- und Jodversorgung – Endokrinologische Zusammenhänge. In Kruse-Jarres J: Mineralstoffe, Spurenelemente, Vitamine: Risikofaktoren – Meßverfahren – Präventivmaßnahmen. Kongreßband vom VII. Stuttgarter Mineralstoff-Symposium 1995; 61-105

Köhrle J. Non-thyroidal health hazards of selenium deficiency. In Braverman LE, Köhrle J, Eber O, Langsteger W (eds): *Thyroid and trace elements, 6th Thyroid Symposium*, Graz, Austria 1996; 58-72, Blackwell Wissenschaft

Köhrle J. Editorial: Selen in der Onkologie: Ein essentielles Spurenelement auf dem Prüfstand. In *Fo Onkologie* 1999; 2: 2

Köhrle J. The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 1853-1863

Kozumbo WJ, Muehlematter D, Jorg A, Emerit I, Cerutti P. Phorbol-ester-induced formation of a clastogenic factor from human monocytes. *Carcinogenesis* 1987; 8: 521-526

Krämer K, Look MP, Chrissafidou A, Karsten S, Arends J. Selen und Tumorerkrankungen. *Akt Ernähr-Med* 1996; 21: 103-113

Kumaraswamy E, Malykh A, Korotkov KV, Kozyavkin S, Hu Y, Kwon SY, Moustafa ME, Carlson BA, Berry MJ, Lee BJ, Hatfield DL, Diamond AM, Gladyshev VN. Structure-expression relationships of a 15-kDa selenoprotein gene. Possible role of the protein in cancer etiology. *J Biol Chem* 2000; 275: 35540-35547

Kyriakopoulos A, Kalcklösch M, Weiss-Novak C, Behne D. Studies on 16 kDa selenium-containing proteins enriched by means of preparative electrophoresis. *Electrophoresis* 1993; 14: 108-111

Leal M, Diaz J, Serrano E, Abellan J, Carbonell LF. Hormon replacement therapy for oxidative stress in postmenopausal women with hot flushes. *Obstet Gynecol* 2000; 95: 804-809

- Lee BJ, Rajagopalan M, Kim YS, You KH, Jacobson KB, Hatfield D. Selenocysteine tRNA [Ser]<sup>Sec</sup> gene is ubiquitous within the animal kingdom. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 1940-1949
- Lee BJ, Park S, Park J, Chittum HS, Hatfield D. Molecular biology of selenium and its role in human health. *Mol Cells* 1996; 6: 509-520
- Leinfelder W, Zeherlein E, Mandrand-Berthelot MA, Böck A. Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine. *Nature* 1988; 331: 723
- Lesson A, Metha A, Singh R, Chisolm GM, Driscoll DM. A RNA-binding protein recognizes a mammalian selenocysteine insertion sequence element required for cotranslational incorporation of selenocysteine. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 1977-1985
- Levander OA. Kongressband des Selen-Weltkongresses, Peking 1996.
- Low SC, Harney JW, Berry MJ. Cloning and functional characterization of human selenophosphate synthetase, an essential component of selenoprotein synthesis. *J Biol Chem* 1995; 270: 21659-21664
- Low SC, Berry MJ. Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eucaryotes. *TIBS* 1996; 21: 203-208
- Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000; 21: 361-370
- Martin GW, Harney JW, Berry MJ. Selenocysteine incorporation in eukaryotes: insights into mechanism and efficiency from sequence, structure and spacing proximity studies of the type I deiodinase SECIS element. *RNA* 1996; 2: 171-182
- Matsui M, Oshima M, Oshima H, Takaku K, Maruyama T, Yodoi J, Taketo MM. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev Biol* 1996; 178: 179-185
- Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Ann Rev Biochem* 1983; 52: 711-760
- Miller S, Walker SW, Arthur JR, Lewin MH, Pickard K, Nicol F, Howie AF, Beckett GJ. Selenoprotein expression in endothelial cells from different human vasculature and species. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1588: 85-93
- Mitzutani T, Kurata H, Yamada K, Totsuka T. Some properties of murine selenocysteine synthase. *J Bio Chem* 1992; 284: 827-834
- Miyoshi Y, Ando H, Nagase H, Nishisho I, Horii A, Miki Y, Mori T, Utsunumiya J, Baba S, Peterson G. Germ-line mutations of the APC-gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4452-4456

Mörk H, Lex B, Scheurlen M, Dreher I, Schütze N, Köhrle J, Jakob F. Expression pattern of gastrointestinal selenoproteins - targets for selenium supplementation. *Nutr Cancer* 1998; 32: 64-70 (a)

Mörk H, Beck C, Barth T, Al-Taie O, Köhrle J, Jakob F, Scheurlen M. Die Rekonstitution von Plattenepithel beim Barrett-Ösophagus führt zu einer Änderung der Genexpression gastrointestinaler Glutathionperoxidasen. *Z Gastroenterol* 1998; 36: 678 (Abstract) (b)

Mörk H. Selenoproteine im Gastrointestinaltrakt-Expressionsmuster und mögliche Bedeutung. Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg 1998

Mörk H, Al-Taie OH, Bahr K, Zierer A, Beck C, Scheurlen M, Jakob F, Köhrle J. Inverse mRNA expression of the selenocysteine-containing proteins GI-GPx and SeP in colorectal adenomatous polyps compared to adjacent mucosa. *Nutr Cancer* 2000; 37: 108-116

Mörk H, Scheurlen M, Al-Taie OH, Zierer A, Kraus M, Schöttker K, Jakob F, Köhrle J. Glutathione peroxidase isoforms as part of the lokal antioxidative defense system in normal and Barrett's oesophagus. *Int J Cancer* 2003; accepted

Moreno-Reyes R, Suetens C, Mathieu F, Begaux F, Zhu D, Rivera MT, Boelaert M, Neve J, Perlmutter N, Vanderpas J. Kashin-Beck osteoarthropathy in rural Tibet in relation to selenium and iodine status. *N Engl J Med* 1998; 339: 112-120

Mostert V. Selenoprotein P: Properties, functions, and Regulation. *Arch Biochem Biophys* 2000; 376: 433-438

Mostert V, Dreher I, Köhrle J, Wolff S, Abel J. Modulation of selenoprotein P expression by TGF- $\beta_1$  is mediated by Smad proteins. *BioFactors* 2001; 14: 135-142

Motchnik PA, Tappel AL. Rat plasma selenoprotein P properties and purification. *Biochim Biophys Acta* 1989; 993: 27-35

Motsenbocker MA, Tappel AL. Selenium and selenoproteins in the rat kidney. *Biochim Biophys Acta* 1982; 709: 160-165

Nassi-Calo L, Mello-Filho AC, Meneghini R. O-phenanthroline protects mammalian cells from hydrogen peroxide-induced gene mutation and morphologic transformation. *Carcinogenesis* 1989; 10: 1055-1057

Nelson RL, Davis FG, Sutter E, Kinkendall JW, Sobin LH, Milner JA, Bowen PE. Serum selenium and colonic neoplastic risk. *Dis Colon Rectum* 1995; 38: 1306-1310

Nelson RL, Abcarian H, Nelson TM, Misumi A, Kako H, Rizk S, Sky-Peck H. The effect of dietary selenium deficiency on acute colorectal mucosal nucleotoxicity induced by several carcinogens in the rodent. *Am J Surg* 1996; 172: 185-188

Nicholson DW. Leukotriene C4 Synthase. In: Tew KD, Picket CB, Mantle TJ, Mannervik B, Hayes JD. (eds.): Structure and function of glutathione transferases; pp. 47-62, Boca Raton, Florida: CRC Press 1993

Persson-Moschos M, Huang W, Srikumar TS, Akesson B. Selenoprotein P in serum as a biochemical marker of selenium status. *Analyst* 1995; 120: 833-836

Persson-Moschos M, Stavenow L, Akesson B, Lindgärde F. Selenoprotein P in plasma in relation to cancer morbidity in middle-aged Swedish men. *Nutr Cancer* 2000; 36:19-26

Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet* 2000; 356: 233-241

Reddy BS, Upadhyaya P, Simi B, Rao CV. Evaluation of organoselenium compounds for potential chemoprevention properties in colon carcinogenesis. *Anticancer Res* 1994; 14: 2509-2514

Reid ME, Duffield-Lillico AJ, Garland L, Turnbull BW, Clark LC, Marshall JR. Selenium supplementation and lung cancer incidence: an update of the nutritional prevention of cancer trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 1285-1291

Ringstad J, Kildebo S, Thomassen Y. Serum selenium, copper, and zinc concentrations in Chron's disease and ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 1993; 28: 605-607

Rotruck JTA, Pope L, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biological role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 1973; 179: 588-590

Roveri A, Maiorano M, Ursini F. Enzymatic and immunological measurements of soluble and membrane-bound phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1994; 233: 202-212

Rumi G, Imre I, Sulle C, Sarudi I, Kelemen J, Lassu Z. Selenium in the blood of patients with colorectal cancer and neoplastic polyp. *Acta Physiol Hung* 1992; 80: 275-279

Russo MW, Murray SC, Wurzelmann JJ, Woosley JT, Sandler RS. Plasma selenium levels and the risk of colorectal adenomas. *Nutr Cancer* 1997; 28: 125-129

Safran M, Leonard J. Comparison of the physicochemical properties of type I and type II iodothyronine 5'-deiodinase. *J Biol Chem* 1991; 266: 3233-3238

Safran M, Farwell A, Leonard J. Catalytic activity of the type II iodothyronine 5'-deiodinase polypeptide is dependent upon a cyclic AMP activation factor. *J Biol Chem* 1996; 271: 16363-16368

- Saijoh K, Saito N, Lee MJ, Fujii M, Kobayashi T, Sumino K. Molecular cloning of cDNA encoding a bovine selenoprotein P-like protein containing 12 selenocysteines and a (His-Pro) rich domain insertion, and its regional expression. *Mol Brain Res* 1995; 30: 301-311
- Saito Y, Hayashi T, Tanaka A, Watanabe Y, Suzuki M, Saito E, Takahashi K. Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1999; 274: 2866-2871
- Saito Y, Takahashi K. Characterization of selenoprotein P as a selenium supply protein. *Eur J Biochem* 2002; 269: 5746-5754
- Salvatore D, Low SC, Berry MJ, Maia AL, Harney JW, Croteau W, St. Germain DL. Type 3 iodothyronine deiodinase: cloning, in vitro expression, and functional analysis of the placental selenoenzyme. *J Clin Invest* 1995; 96: 2421-2430
- Schrauzer GN, White DA, Schneider CJ. Cancer mortality correlation studies-III: statistical associations with dietary selenium intakes. *Bioinorg Chem* 1977; 7: 23-34
- Schrauzer GN. Selen: Neuere Entwicklungen aus Biologie, Biochemie und Medizin. 1997; Johann Ambrosius Barth Verlag, Heidelberg
- Schrauzer GN. Selenomethionine: A review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *J Nutr* 2000; 130: 1653-1656 (a)
- Schrauzer GN. Anticarcinogenic effects of selenium. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 1864-1873 (b)
- Schütze N, Bachthaler M, Lechner A, Köhrle J, Jakob F. Identification by differential display PCR of the selenoprotein thioredoxin reductase as a  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin  $\text{D}_3$  responsive gene in human osteoblasts-regulation by selenite. *Biofactors* 1998; 7: 299-310 (a)
- Schütze N, Dreher I, Jakob F, Jakob F. Neue menschliche Selenoproteine: Selenoprotein P und Thioredoxin-Reduktase. *J Lab Med* 1998; 22: 539-544 (b)
- Schwarz K, Foltz CM. Selenium is an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J Am Chem Soc* 1957; 79: 3292-3293
- Shacter E, Beecham EJ, Covey JM, Kohn KW, Potter M. Activated neutrophils induce prolonged DNA damage in neighbouring cells. *Carcinogenesis* 1988; 9: 2297-2304
- Shen Q, McQuilkin PA, Newburger PE. RNA-binding proteins that specifically recognize the selenocysteine insertion sequence of human cellular glutathione peroxidase mRNA. *J Bio Chem* 1995; 270: 30448-30452
- Shisler JL, Senkevich TG, Berry MJ, Moss B. Ultraviolet-induced cell death blocked by a selenoprotein from a human dermatotropic poxvirus. *Science* 1998; 279: 102-105

- Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; 82: 291-295
- Soderberg A, Sahaf B, Rosen A. Thioredoxin reductase, a redox-active selenoprotein, is secreted by normal and neoplastic cells: presence in human plasma. *Cancer Res* 2000; 60: 2281-2289
- Stewart MS, Davis RL, Walsh LP, Pence BC. Induction of differentiation and apoptosis by sodium selenite in human colon carcinoma cells. *Cancer Lett* 1997; 117: 35-40
- Sunde RA. Intracellular glutathione peroxidases - Structure, regulation, and function. In Burk RF (ed.): *Selenium in Biology and Human Health*. 1997; 45-77, Springer Verlag, New York
- Takahashi K, Avissar N, Within J, Cohen H. Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch Biochem Biophys* 1987; 256: 677-686
- Tamura T, Liu SY, Stadtman TC. The mutual sparing effects of selenium and Vitamin E in animal nutrition may be further explained by the discovery that mammalian thioredoxin reductase is a selenoenzyme. *Biofactors* 1995; 5: 99-102
- Tamura T, Stadtman TC. A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells. Purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 91: 1006-1011
- Tanaka T, Kondo S, Iwasa Y, Hiai H, Toyokuni S. Expression of stress-response and cell proliferation genes in renal cell carcinoma induced by oxidative stress. *Am J Pathol* 2000; 156: 2149-2157
- Tham DM, Whitin JC, Kim KM, Zhu SX, Cohen HJ. Expression of extracellular glutathione peroxidase in human and mouse gastrointestinal tract. *Am J Physiol* 1998; 275: 1463-1471
- Thieme R, Pai EF, Schirmer RH, Schultz GE. Three-dimensional structure of glutathione reductase at 2 Å resolution. *J Mol Biol* 1981; 152: 763-782
- Tujebajeva R, Harney J, Berry M. Selenoprotein P expression, purification and immunochemical characterisation. *J Biol Chem* 2000; 275: 6288-6294
- Ursini F, Maiorino M, Gregolin C. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 1985; 839: 62-70
- Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohé R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, Flohé L. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 1995; 252: 38-53

- van de Brandt PA, Goldbohm RA, van't Veer P, Bode P, Dorant E, Hermus RJ, Sturmans F. A prospective study on toenail selenium levels and risk of gastrointestinal cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 224-229
- Vendeland SC, Beilstein MA, Chen CL, Jensen ON, Barofsky E, Whanger PD. Purification and properties of selenoprotein W from rat muscle. *J Biol Chem* 1993; 268: 17103-17107
- Vendeland SC, Beilstein MA, Yeh JY, Ream W, Whanger PD. Rat skeletal muscle selenoprotein W: cDNA clone and mRNA modulation by dietary selenium. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 19: 8749-8753
- Visser TJ, Kaplan MM, Leonard JL, Larsen PR. Evidence for two pathways for iodothyronine 5'-deiodination in rat pituitary that differ in kinetics, propylthiouracil sensitivity, and response to hypothyroidism. *J Clin Invest* 1983; 71: 992-1002
- Vollmers HP, Stulle K, Dämmrich J, Pfaff M, Papadopoulos T, Betz C, Saal K, Müller-Hermelink HK. Characterization of four new gastric cancer cell lines. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 1993; 62: 335-343
- Wakeling AE, Bowler J. ICI 182,780, a new antiestrogen with clinical potential. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 43:173-177
- Walczak R, Westhof E, Carbon P, Krol A. A novel RNA structural motif in selenocysteine insertion element of eukaryotic selenoprotein mRNAs. *RNA* 1996; 2: 367-379
- Weiss SL, Sunde RA. Selenium regulation of classical glutathione peroxidase expression requires the 3'-untranslated region in chinese hamster ovary cells. *J Nutr* 1997;127:1304-1310
- Weitberg AB, Weitzman SA, Destrempe M, Latt SA, Stossel TP. Stimulated human phagocytes produce cytogenic changes in cultured mammalian cells. *N Engl J Med* 1983; 308: 26-30
- Weitzman SA, Stossel TP. Mutation caused by human phagocytes. *Science* 1981; 212: 546-547
- Weitzman SA, Weitberg AB, Clark EP, Stossel TP. Effects of antioxidants on oxidant-induced sister chromatid exchange formation. *J Clin Invest* 1985; 754: 1835-1841 (a)
- Weitzman SA, Weitberg AB, Clark EP, Stossel TP. Phagocytes as carcinogens: Malignant transformation produced by human neutrophils. *Science* 1985; 227: 1231-1233 (b)
- Whanger PD, Weswig PH, Schmitz JA, Oldfield JE. Effects of selenium and vitamin E on blood selenium levels, tissue glutathione peroxidase activities, and white muscle disease in sheep fed purified or hay diets. *J Nutr* 1977; 107: 1298-1307

Wilson DS and Tappel AL. Binding of plasma selenoprotein P to cell membranes. *J Inorg Biochem* 1993; 51: 707-714

Wingler K, Böcher M, Flohe L, Kollmus H, Brigelius-Flohé R. mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins. *Eur J Biochem* 1999; 259: 149-157

Xu X, Thomas ML. Estrogen receptor-mediated direct stimulation of colon cancer cell growth in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 105: 197-201

Yan J, Barrett JN. Purification from bovine serum a 23 survival-promoting factor for cultured central neurons and its identification as selenoprotein-P. *J Neurosci* 1998; 18: 8682-8633

Yang G, Yin S, Zhou R, Gu L, Yan B, Liu Y, Liu Y. Studies of safe maximal Se-intake in a seleniferous area in China. Part II: Relation between Se-intake and the manifestations of clinical signs and biochemical alterations in blood and urine. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 1989; 3: 123-130

Yang Q, Christensen MJ. Selenium regulates gene expression for estrogen sulfotransferase and alpha 2U-globulin in rat liver. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998; 64: 5-6, 239-244

Yeh JY, Beilstein MA, Andrews JS, Whanger PD. Tissue distribution and influence of selenium status on levels of selenoprotein W. *FASEB J* 1995; 9: 392-396

Yoshimura S, Suemizu H, Taniguchi Y, Arimori K, Kawabe N, Moriuchi T. The human plasma glutathione peroxidase-encoding gene: organization, sequence, and localization to chromosome 5q32. *Gene* 1994; 145: 293-297

Yoneda S, Suzuki KT. Equimolar Hg-Se complex binds to selenoprotein P. *Biochem Biophys Res Comm* 1997; 231: 7-11

Yu SY, Chu YJ, Gong XG, Hou C, Li WG, Gong HM. Regional variation of cancer mortality incidence and its relation to selenium levels in China. *Biol Trace Elem Res* 1985; 7: 21-29

Yu SY, Li WG, Zhu YJ, Yu WP, Hou C. Chemoprevention trial of human hepatitis with selenium supplementation in China. *Biol Trace Elem Res* 1989; 20: 15-22

Zimmermann MB, Köhrle J. The impact of iron and selenium deficiencies on iodine and thyroid metabolism: biochemistry and relevance to public health. *Thyroid* 2002; 12: 867-878

Zioni F, Brinkmann A, Stadtman TC, Böck A. Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine-containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogen-lyase-linked) from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4650-4654

## **Danksagung**

Zum Abschluss danke ich Herrn Prof. Dr. med. Michael Scheurlen für die Überlassung des Themas und die Unterstützung der Arbeit. Ganz besonders danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Hubert Mörk sowohl für die Betreuung als auch die umfassende Durchsicht der Arbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Franz Jakob und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Josef Köhrle für die freundliche Aufnahme in der Abteilung für Innere molekulare Medizin (vormals Klinische Forschergruppe) der Medizinischen Poliklinik und die stetige wissenschaftliche Supervision meiner Arbeit.

Weiterhin danke ich allen MitarbeiterInnen der Abteilung für Innere molekulare Medizin (vormals Klinische Forschergruppe), die mir jederzeit mit Rat und Tat während der Durchführung meiner Versuche zur Seite standen. Hierbei seien insbesondere die wissenschaftlichen MitarbeiterInnen Frau Dr. rer. nat. Ingeborg Dreher, Frau Dr. rer. nat. Astrid Baur, Frau Dr. rer. nat. Regina Ebert, Herr Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Norbert Schütze sowie die medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Anette Zierer, Frau Doris Schneider und Frau Jutta Meißner-Weigl erwähnt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei all meinen Freunden, Eltern und Grosseltern für Ihre Unterstützung, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat, bedanken.



## **Lebenslauf**

### **Benno Lex**

Geburtsdatum: 21.10.1972  
Geburtsort: München  
Eltern: Johanna und Dr. med. Benno Lex †

### **Schulbildung**

1979-1983 Besuch der Feldbergschule (Grundschule), München  
1983-1992 Besuch des Wilhelmsgymnasiums (humanistischer Zweig), München  
1992 Abitur

### **Studium**

1992-1998 Studium der Humanmedizin, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg  
1994 Ärztliche Vorprüfung  
1995 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
1998 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
1998-1999 Studium der Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität, München  
1998-1999 Praktisches Jahr:  
Chirurgie, Victoria Hospital, Kapstadt, Südafrika  
Gynäkologie und Geburtshilfe, Kantonsspital Luzern, Schweiz  
Innere Medizin, Zentralklinikum Augsburg  
1999 Ärztliche Prüfung

### **Arzt im Praktikum**

1999-2001 Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Medizinische Universität zu  
Lübeck

### **Assistenzarzt**

seit 2001 Frauenklinik, Klinikum Bayreuth

## **Dissertation**

1995                      Übernahme des Themas  
1995-1998               Experimentelle Untersuchungen

## **Publikationen**

### **Originalarbeiten**

Jakob F, Mörk H, Schütze N, Dreher I, Schmutzler C, Lex B, Köhrle J. Selenoproteine im Knochen, Gastrointestinaltrakt und in der Schilddrüse des Menschen. Med Klin 1997; 92 (Suppl. III): 24-26

Mörk H, Lex B, Scheurlen M, Dreher I, Schütze N, Köhrle J, Jakob F. Expression pattern of gastrointestinal selenoproteins - targets for selenium supplementation. Nutrition and Cancer 1998; 32: 64-70

### **Abstracts und Poster**

Mörk H, Dreher I, Scheurlen M, Lex B, Al-Taie O, Köhrle J, Jakob F. Differential expression of gastrointestinal glutathione peroxidase and selenoprotein P mRNA in the human gastrointestinal tract. Gastroenterology 1997; 112,4: A 619 (Abstract)

Köhrle J, Baur A, Dreher I, Hesse K, Jakobs T, Lex B, Mörk H, Schmutzler C, Schütze N, Jakob F. Regulation und Funktion neuer menschlicher Selenoproteine. 13. Jahrestagung der Gesellschaft für Minerale und Spurenelemente, 1997, Dresden (Abstract)

Hesse K, Dreher I, Baur A, Lex B, Schmutzler C, Schütze N, Mörk H, Jakob F, Köhrle J. Expression of selenoproteins in various eucariotic cell lines. 13. Jahrestagung der Gesellschaft für Minerale und Spurenelemente, 1997, Dresden (Abstract)

### **Kongress-, Tagungs- und Buchbeiträge**

Hesse K, Dreher I, Baur A, Lex B, Schmutzler C, Schütze N, Mörk H, Jakob F, Köhrle J. Expression von Selenoproteinen in eukaryontischen Zelllinien. . In: Meissner D (ed.). Spurenelemente. Stuttgart, Wiss. Verlagsges. 1998;

Köhrle J, Dreher I, Baur A, Hesse K, Jakobs T, Lex B, Mörk H, Schmutzler C, Schütze N, Jakob F. Neue Aspekte der Regulation und Funktion menschlicher Selenoproteine. In: Meissner D (ed.). Spurenelemente. Stuttgart, Wiss. Verlagsges. 1998; S.36-45

Mörk H, Dreher I, Lex B, Köhrle J, Jakob F. Selenoproteine im menschlichen Gastrointestinaltrakt. In: Köhrle J (ed.). Mineralstoffe und Spurenelemente -Molekularbiologie - Interaktion mit dem Hormonsystem - Analytik. Stuttgart, Wiss. Verlagsges. 1997; S.23-25