

Aus dem Institut für Experimentelle Endokrinologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Bedeutung und Regulation von Selenoprotein P  
in inflammatorischen Erkrankungen**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Birgit Hollenbach**

aus Stuttgart

Gutachter: 1. Prof. Dr. L. Schomburg  
2. Prof. Dr. med. H. Krude  
3. Priv.-Doz.Dr. rer. nat. H. Al-Hasani

**Datum der Promotion: 21.06.2010**



Selene und Endymion

Deckengemälde in der Ny Carlsberg Glyptothek, Kopenhagen, Dänemark<sup>70</sup>

Aus ihrem unsterblichen  
Haupte strömt himmlisches  
Leuchten und umringelt die  
Erde. Im Schein ihres  
Lichtes öffnet sich  
Schönheit in Fülle.

*Homerische Hymne an Selene*<sup>71</sup>

From her immortal head  
a radiance is shown from  
heaven and embraces earth;  
and great is the beauty that  
arises from her shining  
light.

*Homeric Hymn to Selene*<sup>72</sup>

[Su] resplandor sale de  
su cabeza inmortal,  
aparece en el cielo y  
envuelve a la tierra,  
donde todo surge muy  
adornado por su  
resplandor fulgurante.

*Himno homérico a Selene*<sup>73</sup>

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>1</b>
<b>Einleitung .....</b>	<b>4</b>
<b>Zielsetzung .....</b>	<b>6</b>
<b>Methodik .....</b>	<b>7</b>
<b>Ergebnisse .....</b>	<b>10</b>
<b>Diskussion .....</b>	<b>15</b>
<b>Quellennachweise.....</b>	<b>22</b>
<b>ANTEILSERKLÄRUNG .....</b>	<b>27</b>
<b>AUSGEWÄHLTE PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>30</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>31</b>
<b>KOMPLETTE PUBLIKATIONS LISTE .....</b>	<b>32</b>
<b>ERKLÄRUNG.....</b>	<b>34</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>35</b>

# ZUSAMMENFASSUNG

## **Abstract**

In der vorliegenden Arbeit beschäftige ich mich mit der Hypothese, dass das im Plasma zirkulierende Selenoprotein P (SEPP1) entzündungsabhängig reguliert wird und einen geeigneten Biomarker für inflammatorische Erkrankungen darstellt. Zu diesem Zweck wurde eine neue Analysemethode für dieses Protein entwickelt, entsprechende Versuche in Zellkultur und mit Versuchstieren durchgeführt und schließlich auch humane Proben von Sepsispatienten und gesunden Kontrollen analysiert. Zusammengenommen bestätigen die hierbei gewonnenen Ergebnisse die obige Hypothese und belegen überdies, dass SEPP1 nicht nur einen Biomarker des Selenstatus darstellt, sondern über seine Funktion als Transportprotein auch entscheidend den Selenmetabolismus und dadurch die Akutphase-Reaktion mitbestimmt.

Das Spurenelement Selen kommt in seiner aktiven Form als Selenocystein (Sec) in bisher 25 beschriebenen humanen Selenoproteinen<sup>1</sup> vor und spielt eine essentielle Rolle bei wichtigen Stoffwechselprozessen<sup>2 3</sup>. In dieser Arbeit stelle ich die Ergebnisse meiner Forschung vor, die den Zusammenhang zwischen SEPP1- bzw. Selenkonzentration und Gesundheitszustand bzw. Krankheitsverlauf beschreiben.

In der ersten Phase meiner wissenschaftlichen Arbeit habe ich in Zusammenarbeit mit der B.R.A.H.M.S. AG (Hennigsdorf) einen Sandwich-ELISA für die Bestimmung des SEPP1-Gehalts in humanem Serum entwickelt<sup>4</sup>. Durch die Vermessung großer Kollektive gesunder Erwachsener verschiedener geografischer Herkunft (Deutschland und Dänemark) sowie verschiedenen Alters und Geschlechts konnte ein Durchschnittswert der SEPP1-Konzentration im gesunden Menschen ermittelt werden<sup>4 5</sup>.

Meine Forschungen basieren auf bereits gewonnenen Erkenntnissen, dass die Selenkonzentration im Blut von Patienten mit inflammatorischen Erkrankungen wie z.B. Sepsis oder Morbus Crohn zum Teil erheblich sinkt<sup>6 7</sup>. In unserer Forschungsgruppe konnten wir bereits *in vitro* nachweisen, dass proinflammatorische Zytokine die Transkription von SEPP1 vermindern<sup>8</sup>. Im Folgenden führte ich analytische Studien an Patienten mit verschiedenen Erkrankungen durch<sup>4 9</sup>. Im Laufe meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass dies *in vivo* ebenso auf die SEPP1-Konzentration zutrifft, und zwar sowohl im Tiermodell nach LPS-Injektion als auch bei Patienten der Intensivstation, die an einer Sepsis erkrankt sind<sup>10 4</sup>. Da verschiedene Veröffentlichungen den Selenstatus und den Genotyp von SEPP1 mit dem Risiko für Krebserkrankungen in Zusammenhang bringen<sup>11 12 13</sup>, war es für mich auch von Interesse, den Selen- und SEPP1-Status in Prostatakrebspatienten zu analysieren, um daraus Rückschlüsse über die Eignung von SEPP1 als Biomarker für Prostatakrebs ziehen zu können. Auch hier konnte ich in Zusammenarbeit mit den klinisch tätigen Kollegen aus der Urologischen Klinik und Poliklinik der Charité eine geringere Selen- und SEPP1-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen. Durch die Kombination der Parameter freies PSA (prostate specific antigen) und SEPP1 ließ sich eine bessere diagnostische Genauigkeit erzielen<sup>9</sup>.

Um den zugrunde liegenden Mechanismus untersuchen zu können, haben wir in unserer Forschungsgruppe ein Tiermodell für die Sepsis bzw. den septischen Schock etabliert. Zu diesem Zweck simulierten wir eine akute Entzündungsreaktion in Mäusen durch die Behandlung mit Lipopolysacchariden (LPS). In der Akutphase der Entzündung konnten wir eine Abnahme der Gesamtselenkonzentration sowie eine Erniedrigung der Sepp1-Konzentration im Serum beobachten. Ebenso erfolgte unter diesen Bedingungen eine negative Regulation der *Sepp1*-Transkription und der mRNA-Konzentrationen in der Leber, allerdings in einem transienten und nur relativ geringfügigem Ausmaß<sup>10</sup>. Bei näherer Untersuchung der trans-agierenden Komponenten der Selenoprotein-Biosynthese zeigte sich tatsächlich, dass die meisten dieser Translationskomponenten negativ durch die Akutphase-Reaktion beeinflusst werden, so dass sich ein vielschichtiges Bild ergab, welches letztendlich zur verringerten Sepp1-Biosynthese und -Sekernierung führte.

Die physiologische Bedeutung von SEPP1 als Transportprotein von Selen konnten wir anhand von *Sepp1*<sup>-/-</sup> Mäusen zeigen, die schwere neurologische Schäden und motorische Defekte aufweisen<sup>14 15</sup>. Männliche Mäuse ohne *Sepp1*-Expression sind infertil<sup>16</sup>. Um der Fragestellung nachzugehen, ob *Sepp1* vorwiegend eine Transportfunktion von der Leber in die anderen Organe übernimmt, oder ob eine fehlende lokale Expression in z.B. Gehirn oder Testes für den Funktionsverlust verantwortlich ist, haben wir ein neues transgenes Tiermodell generiert. Diese Mäuse tragen als *Sepp1*-knockout Individuen (*Sepp1*<sup>-/-</sup>) ein humanes *SEPP1*-Transgen unter einem Transthyretin-Promotor (*Sepp1*<sup>-/-;SEPP1</sup>-Mäuse) und exprimieren die humane transgene *SEPP1*-mRNA ausschließlich in der Leber. Mit Hilfe des neu entwickelten SEPP1-Assays und durch Western Blot konnte ich humanes SEPP1 im Serum dieser Mäuse zuverlässig nachweisen und quantifizieren<sup>17</sup>. Entgegen unserer Vermutungen führten bereits die geringen zirkulierenden SEPP1-Mengen, die von den Hepatozyten ins Serum sezerniert wurden, zur Behebung der neurodegenerativen Effekte und zum Anstieg des Selengehalts im Serum sowie in Niere, Testes und Gehirn<sup>17</sup>.

Diese Beobachtungen weisen auf den Zusammenhang zwischen Selen- und SEPP1-Konzentration und Gesundheitszustand hin und belegen, dass zirkulierendes SEPP1 hauptsächlich der Leber entstammt. Schon geringe Konzentrationen sind ausreichend, um die Selenmangeldefekte in Gehirn und Testes zu beheben. Somit ist das Protein essentiell für die Selenversorgung endokriner Organe wie Hypophyse und Testes.

Diese Forschungsergebnisse lassen überdies darauf schließen, dass SEPP1 einen verlässlichen Biomarker für den Selenstatus eines Individuums darstellt. Die Konzentration von SEPP1 im Serum eines Individuums kann mit Hilfe des neu entwickelten Assays schnell und zuverlässig ermittelt werden. Des Weiteren geben die Analysen von Serum- und Gewebeproben von *Sepp1*<sup>-/-;SEPP1</sup>-Mäusen Aufschluss über die Bedeutung, Regulation und Hierarchie der Selenversorgung.

Weitere Untersuchungen in unserer Forschungsgruppe werden zeigen, ob eine Selensupplementation einen positiveren Krankheitsverlauf herbeiführen kann und ob sich ein guter Selenstatus präventiv gegen das Erkrankungsrisiko bei Krebs, Sepsis oder neurodegenerativen Prozessen auswirkt.

## Einleitung

Selen ist ein essentielles Spurenelement, das in Form der 21. Aminosäure Selenocystein (Sec) in Proteine eingebaut wird. Die mRNA-Transkripte der Selenoproteine sind durch ein Sec-spezifisches UGA-Codon gekennzeichnet, welches im Translationsprozess normalerweise als Stoppcodon entziffert wird<sup>18 19</sup>. Verschiedene *cis*- und *trans*-agierende Faktoren tragen dazu bei, das UGA-Codon als Sec zu erkennen<sup>20</sup>. Im Menschen sind bisher 25 Gene für Selenoenzyme identifiziert worden, deren genaue Funktionen nicht durchgängig bekannt sind (s. Tabelle 1)<sup>21</sup>. Es gilt jedoch als gesichert, dass die Glutathion-Peroxidasen (GPX) am Abbau von Peroxiden<sup>22</sup>, die Jod-Thyronin-Dejodasen (DIO) an der Aktivierung und Inaktivierung von Schilddrüsenhormonen<sup>23</sup> und die Thioredoxin-Reduktasen (TXNRD) am zellulären Redoxsystem<sup>24</sup> beteiligt sind. Ein guter Selenstatus ist somit lebensnotwendig. So ist z.B. eine ausreichende Selenversorgung im endokrinen System essentielle Voraussetzung für die Spermatogenese<sup>16 25</sup>. Beim Menschen führen Mangelercheinungen zur Keshan-Krankheit<sup>26</sup> oder bei gleichzeitiger Unterversorgung mit Jod zu körperlichen und neurologischen Fehlentwicklungen (Myxödematöser Kretinismus)<sup>27</sup>.

Selen spielt ebenfalls eine Rolle bei verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen<sup>6 7</sup>; eine Supplementation kann den Krankheitsverlauf eventuell positiv beeinflussen<sup>28</sup>. So korreliert eine niedrige Gesamtselenkonzentration bei Sepsis-Patienten mit einer höheren Sterblichkeitsrate<sup>29</sup>. Für die Bestimmung des Selenstatus eines Individuums werden neben der Messung des Gesamtselengehaltes im Blut auch die Konzentrationen der GPX1 in Erythrozyten und der GPX3 im Plasma als verlässliche Parameter angesehen<sup>30</sup>. In dieser Arbeit zeige ich, dass Selenoprotein P (SEPP1) einen alternativen, zuverlässigen, schnell zugänglichen und einfach bestimmbaren Indikator für den Selenstatus eines Individuums darstellt.

Das Glykoprotein SEPP1 wird hauptsächlich in der Leber exprimiert und enthält mehr als 40% des im Plasma vorkommenden Selens<sup>31</sup>, welches in Form von insgesamt 10 Selenocysteinen pro SEPP1 Molekül vorliegt<sup>32</sup>. Die anderen bisher bekannten humanen Selenoenzyme weisen nur ein Sec pro Protein auf. Es wurde daher schon früh vermutet, dass SEPP1 als Transport- und Speicherprotein von Selen fungiert<sup>33</sup>. Es stellt

damit ein Schlüsselprotein für die Versorgung der antioxidativ wirkenden Selenoenzyme dar. Bei Selenmangel oder Störungen der Biosynthese von SEPP1, wie sie z.B. bei inflammatorischen Erkrankungen auftreten, ist der Selenspiegel im Blut und damit vermutlich auch die Selenversorgung der Organe stark erniedrigt<sup>34</sup>.

Aus dieser Tatsache leite ich meine Arbeitshypothese ab: Die Absenkung des Selenspiegels sollte mit einer Abnahme der SEPP1-Konzentration korrelieren, was SEPP1 zu einem geeigneten Biomarker für den Selenstatus eines Individuums macht. Hierbei könnte eine verminderte hepatische SEPP1-Biosynthese und -Sekretion für die reduzierte Selen-Konzentration im Serum verantwortlich sein. Die Forschungsergebnisse, die wir aus Tierexperimenten generiert haben, helfen uns, die Regulation der Biosynthese des Proteins genauer zu verstehen und die Bedeutung von SEPP1 als Biomarker zu untermauern.

Tabelle 1: Bisher identifizierte Selenoproteine und ihre Funktionen<sup>1</sup>

<b>Glutathion-Peroxidasen (GPX)</b>		
zelluläre GPX	cGPX, GPX1	Abbau von Peroxiden im Zytosol der Zellen aller Organe
gastrointestinale GPX	GI-GPX, GPX2	Abbau von Peroxiden im Magen-Darm-Trakt
plasma GPX	pGPX, GPX3	Abbau von Peroxiden im Blut
Phospholipid-Hydroperoxid GPX	PH-GPX, GPX4	Abbau von Membran-Peroxiden, Arachidonsäurestoffwechsel
Riechepithel-GPX	GPX6	Peroxid-Abbau im Embryo und im Riechepithel
<b>Thioredoxin-Reduktasen (TXNRD)</b>		
zytosolische TXNRD	TXNRD 1	Bestandteil des zytosolischen Redoxsystems
mitochondriale TXNRD	TXNRD 2	Bestandteil des mitochondrialen Redoxsystems
hodenspezifische TXNRD	TXNRD 3	Bestandteil des testikulären Redoxsystems
<b>Jod-Thyronin-Dejodasen (DIO)</b>		
5'-DIO, Typ 1	DIO1, 5'D1	Aktivierung von Thyroxin zu T3 in Leber, Niere, usw.
5'-DIO, Typ 2	DIO2, 5'D2	Aktivierung von Thyroxin zu T3, besonders im Gehirn
5-DIO, Typ 3	DIO3, 5D3	Inaktivierung von Thyroxin zu rT3 und von T3 zu T2
Selenophosphat-Synthetase 2	SPS2	Selen-Aktivierung durch ATP zu Seleno-Phosphat
Methionin-Sulfoxid-Reduktase B	MsrB	Reduktion von Methionin-Sulfoxid zu Methionin
Selenoprotein S	SELS, VIMP	ER-gebundenes Membranprotein; Kontrolle der Proteinfaltung und -sekretion
Selenoprotein N	SELN	Funktion im Muskel
Selenoprotein P	SEPP1	Plasma-Transport und Speicherung von Selen
Selenoprotein 15, H, I, K, M, O, T, V und W		Selenoproteine mit noch unbekannter biologischer Funktion.

## **Zielsetzung**

Das Ziel der Arbeit bestand darin, zum verbesserten Verständnis der biologischen Rolle und entzündungsabhängigen Regulation von SEPP1 beizutragen. Hierzu war es zunächst notwendig, einen zuverlässigen Assay zum Nachweis und zur Quantifizierung von SEPP1 in humanen Proben zu etablieren. Dieser Assay sollte dann zur Etablierung eines Referenzbereichs der SEPP1-Konzentration im Serum gesunder Erwachsener genutzt werden, unterteilt nach Alter und Geschlecht. Schließlich sollten Änderungen des Selen- und des SEPP1-Status in verschiedenen Erkrankungen untersucht werden. Hierbei stand die Frage im Vordergrund, ob der SEPP1-Status Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf erlaubt und damit von Wert für die Diagnose sein könnte. Es galt herauszuarbeiten, ob ein ausgeprägter Selenmangel mit einer Abnahme von SEPP1 korreliert, und ob SEPP1 somit als verlässlicher Biomarker für den Selenstatus eines Individuums betrachtet werden kann.

Ein zweiter Fragenkomplex betraf die Biosynthese von Selenoproteinen und deren Regulation während einer entzündlichen Erkrankung. Hierbei wurde ein besonderes Augenmerk auf die Bedeutung von SEPP1 für die Versorgung der Organe und extrahepatischen Gewebe mit Selen gerichtet, und dessen verändertes Expressionsmuster während der Akutphase inflammatorischer Erkrankungen untersucht. *In vivo* Experimente mit *Sepp1*<sup>-/-;SEPP1</sup>-Mäusen sollten zeigen, welche Organe am stärksten von einem Selen-mangel betroffen und daher abhängig von SEPP1 als Se-Transportprotein sind. Für die biochemische Fragestellung nach den molekularen Mechanismen der *SEPP1*-Expression während der Akutphase-Reaktion stand die Analyse der hepatischen Selenoproteinbiosynthese im Vordergrund.

Prospektiv gesehen stellte sich die Frage, ob die SEPP1-Bestimmung Aussagen über Erkrankungsrisiken erlaubt, und darüber hinaus im Rahmen von Selensupplementationsversuchen als Biomarker zur Indikation einer Supplementation und zum Monitoring geeignet sein könnte.

## **Methodik**

### 1. Humaner SEPP1-Assay<sup>4</sup>

Für die Messung der Konzentration von humanem SEPP1 im Serum wurde in Kooperation mit der B.R.A.H.M.S. AG ein Sandwich-ELISA entwickelt. Hierfür wurden durch Immunisierung mit insgesamt drei synthetischen Peptiden aus der humanen SEPP1-Proteinsequenz polyklonale Antikörper in Schafen generiert. In dem so genannten Coated-Tube-Assay wurde die Spezifität und Sensitivität der aufgereinigten Antikörper als Festphasenantikörper (gekoppelt an Polystyrol-Röhrchen) und als Detektionsantikörper (markiert mit dem Acridiniumester-Derivat MACN, InVent, Hennigsdorf) getestet. Die Messung (Messzeit: 1s) erfolgte über Chemilumineszenz in einem LB952T Luminometer von Berthold. Alle Anforderungen der medizinischen Labortechnik für einen Routineassay wurden erfüllt. Die Nachweisgrenze des Assays betrug 0,016 mg SEPP1/L Serum, mit einem Variationskoeffizienten  $VK < 20\%$  ab einem Wert von  $> 0,065$  mg/L. Der Standard war eine Serumgemisch von 7 gesunden Individuen mit hohem Selenstatus, der in Verdünnung einen SEPP1-Messbereich von 0,056-3,49 mg SEPP1/L abdeckte. Die Kalibrierung des Standards fand mit gereinigtem SEPP1 statt, das uns freundlicherweise von Dr. J. R. Arthur und F. Nicol (Rowett Research Institute, Aberdeen, UK) zur Verfügung gestellt wurde. Der Standardpool enthielt bei einer Selenkonzentration von  $100 \mu\text{g Se/L}$  im Mittel einen SEPP1-Gehalt von 4,4 mg/L.

Für den Assay wurde das Serum 1:26 in Probenpuffer verdünnt. Von der Verdünnung wurden 50  $\mu\text{l}$  (=1,9  $\mu\text{l}$  Serum) zusammen mit 200  $\mu\text{l}$  des verdünnten Detektionsantikörpers auf mit Festphasenantikörper gekoppelte Röhrchen gegeben. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Der Sandwich-Assay wurde 2 h bei Raumtemperatur und 300 rpm geschüttelt, dann gewaschen, getrocknet und im Luminometer vermessen.

## 2. Western Blot<sup>10 17</sup>

Für die Western Blot Analyse von humanem SEPP1 wurden 0,05  $\mu$ l Patientenserum denaturiert, reduziert und die Serumproteine über SDS-PAGE aufgetrennt. Die auf eine Nitrocellulose-Membran (Optitran, Schleicher & Schuell, Dassel) geblotteten Proteine wurden mittels des sheep-anti-human SEPP-Festphasenantikörpers des Assays nachgewiesen. Als Detektionsantikörper diente ein HRP-markierter donkey-anti-sheep Antikörper (Rockland Immunochemicals/Biomol).

## 3. Selenbestimmung<sup>5 9</sup>

Der Gesamtselengehalt aus Serum wurde fluorimetrisch in Dreifachbestimmung durchgeführt. Je 100  $\mu$ l Serum wurden in einer Mischung aus HNO<sub>3</sub>/HClO<sub>4</sub> (4:1 v/v) oxidiert und Selen dann mittels konzentrierter HCl zu SeIV reduziert. 2,3-Diaminonaphthalin wurde zugegeben, um Piazselenol Fluorophore zu generieren, die mit Cyclohexan extrahiert wurden. Die Emission wurde mit 366 nm angeregt und bei 544 nm gemessen. Das Detektionslimit betrug 15  $\mu$ g/L; eine quantitative Bestimmung war zwischen 50 and 200  $\mu$ g Se/L möglich. Der Interassaykoeffizient betrug 7% und die Intraassay-Streuung lag bei <5% bei einer Konzentration von 79  $\mu$ g Se/L. Als Normserum wurde Sero AS aus Billingstad, Norwegen, verwendet, mit einem Selengehalt von 79  $\mu$ g/L. Eine Selenitstandardlösung (SIGMA) wurde eingesetzt, um die Werte zu standardisieren.

## 4. pGPX-Aktivitätsmessung<sup>17</sup>

Die pGPX-Aktivität wurde mittels eines gekoppelten enzymatischen Tests bestimmt. Hierzu wurde bei 340 nm der Verbrauch von NADPH gemessen, welches bei der Reduktion von oxidiertem Glutathion (GSSG) zu reduziertem Glutathion (GSH) durch die zugesetzte Glutathionreduktase angefallen ist. Die Konzentration an GSSG ist hierbei proportional der zu messenden GPX-Aktivität, da diese das GSH als Substrat bei der Reduktion des zugesetzten tertiärButyl-Hydroperoxids verbraucht hatte. Unspezifische NADPH-Oxidation wurde in einer Parallelreaktion in der Gegenwart des

GPX Inhibitors Mercaptosuccinat bestimmt und bei der Berechnung der pGPX-Aktivität als Korrekturwert berücksichtigt.

## 6. Statistik

Statistische Analysen wurden mit GraphPad Prism 4.0<sup>4 10 17</sup> (San Diego, USA) oder SPSS-Software 14.0<sup>5</sup> bzw. 17.0<sup>9</sup> (Chicago, USA) durchgeführt. Die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Daten wurde nach Kolmogorov-Smirnov auf Normalverteilung getestet. Für den parametrischen Mittelwertvergleich zwischen zwei Gruppen wurde der Zweistichproben T-Test angewandt; für den Vergleich der Daten mehrerer voneinander unabhängigen Gruppen die einfaktorielle Varianzanalyse (one-way ANOVA). Für die parameterfreie Signifikanzanalyse zwischen zwei Verteilungen wurde der Mann-Whitney-Test (U-Test) angewendet. Die parameterfreie Auswertung mehrerer Gruppen erfolgte nach Kruskal-Wallis, wobei die Richtigkeit für die Anwendung dieses Testes mit dem Post-Hoc-Test nach Dunn überprüft wurde. Die Berechnung der Korrelationskoeffizienten erfolgte nach Spearman<sup>4 9</sup> oder Pearson<sup>5</sup>. Für die diagnostische Genauigkeit der Daten wurde die Sensitivität und Spezifität über verschiedene Cut-Off-Punkte nach der ROC-Analyse (receiver operating characteristic) bestimmt und die Fläche unter der Kurve berechnet (area under the curve, AUC). Hierfür wurde Graph Pad Prism 4.0<sup>4</sup> oder – um den komplexeren Zusammenhang zwischen den verschiedenen zu berücksichtigenden Werten in den Prostatakrebspatienten darzustellen - MedCalc 9.0.1.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgien) sowie GraphROC 2.1<sup>9</sup> verwendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P < 0,05$  wurde als signifikant gewertet.

## **Ergebnisse**

Die Quantifizierung von SEPP1 und die Überprüfung auf dessen Eignung als Biomarker standen im Mittelpunkt meiner Untersuchungen. Hierfür wurde ein Normalbereich der SEPP1-Konzentration durch Messung von gesunden Erwachsenen definiert und die Änderung des SEPP1-Gehaltes in verschiedenen Krankheiten bestimmt<sup>4 5 9</sup>. Die Funktion von SEPP1 und die Regulation der SEPP1-Biosynthese wurde parallel in entsprechenden Zellkultur- und Tierexperimenten untersucht<sup>10 17</sup>.

Der Durchschnittswert von SEPP1 in gesunden Erwachsenen sowie der Zusammenhang zwischen Selenstatus und inflammatorischer Erkrankung konnte mit Hilfe des von mir entwickelten Assays zur SEPP1-Bestimmung am Beispiel von Sepsis nachgewiesen werden<sup>4</sup>. Ich analysierte 318 gesunde Probanden und 60 Patienten mit Sepsis. Alle Proben wurden mir aus der Serumbank der B.R.A.H.M.S. AG (Hennigsdorf) zur Verfügung gestellt und waren bereits in anderem Zusammenhang analysiert und charakterisiert worden. Der mittlere SEPP1-Gehalt in gesunden Probanden betrug 3,04 (2,6-3,4) mg SEPP1/L Serum, während die Konzentration in Sepsis-Patienten signifikant niedriger bei 1,1 (0,75-1,51) mg SEPP1/L lag und damit im Durchschnitt bei 36% des Wertes der gesunden Probanden.

Von den 318 gesunden Probanden waren 145 Männer und 173 Frauen. Es wurde kein signifikanter Unterschied im SEPP1-Gehalt zwischen Männern und Frauen festgestellt. Demgegenüber beobachteten wir jedoch einen signifikanten Unterschied zwischen den Altersgruppen. Jüngere Individuen (18-49 Jahre) wiesen einen signifikant niedrigeren SEPP1-Status auf als ältere (50-80 Jahre).

Der Durchschnittswert für die SEPP1- und Selenkonzentrationen in gesunden Erwachsenen wurde von mir durch die Vermessung von 817 Seren aus Dänemark verifiziert, die uns freundlicherweise von Herrn Dr. Peter Laurberg aus dem Department of Endocrinology des Hospitals in Aalborg, Dänemark, zur Verfügung gestellt wurden<sup>5</sup>.

Es handelte sich um Teilnehmer einer Studie zur Jodeinnahme und Schilddrüsenerkrankungen (DanThyr), die 1997/98 und 2004/05 durchgeführt wurde<sup>35 36</sup>. Die für uns geblindeten Proben waren alle detailliert charakterisiert, was die Lebens- und Ernährungsgewohnheiten sowie Schilddrüsenerkrankungen der Probanden anging. Die Einnahme von Nahrungsergänzungstoffen wie z.B. Selen war ebenfalls bekannt. Der durchschnittliche SEPP1-Gehalt aller Probanden lag bei 2,72 (2,18-3,49) mg/L und damit etwas niedriger als bei den deutschen Probanden [3,04 (2,6-3,4) mgSEPP1/L]. Selensupplementierte Teilnehmer wiesen einen schwach signifikanten höheren SEPP1-Gehalt auf als nicht-supplementierte ( $3,02 \pm 1,09$  gegenüber  $2,81 \pm 1,00$  mgSEPP1/L). Von 809 der 817 Teilnehmer wurde auch der Gesamtselengehalt bestimmt. Der durchschnittliche Selengehalt lag bei  $98,7 \pm 19,8$  µg/L, wobei die selensupplementierten Teilnehmer signifikant einen höheren Selenstatus aufwiesen ( $102,7 \pm 22,2$  µg/L gegenüber  $93,4 \pm 14,3$  µg/L). Die Korrelation zwischen Selen- und SEPP1-Konzentration war signifikant, jedoch mit  $r=0,18$  (nach Pearson) nur relativ schwach.

Von den 809 Teilnehmern waren 658 Frauen und 151 Männer. Männer wiesen hier einen signifikant höheren SEPP1-Status auf als Frauen. Die weiblichen Teilnehmer wurden in drei Altersklassen unterteilt (18-22 Jahre, 40-45 Jahre, 60-65 Jahre), während bei den Männern nur eine Altersklasse (60-65 Jahre) zur Verfügung stand. Hier konnte sowohl bei der Selen- als auch bei der SEPP1-Konzentration ein Anstieg mit dem Alter festgestellt werden.

Verschiedene Veröffentlichungen weisen auf einen Zusammenhang zwischen Selen- und SEPP1-Gehalt und Prostatakrebsrisiko hin<sup>37 38</sup>. Daher sollte die SEPP1-Konzentration im Serum von Prostatakrebspatienten bestimmt werden.

Ich analysierte das Serum von 90 männlichen Patienten, die an Prostatakrebs erkrankt waren, sowie einer Kontrollgruppe von 100 Männern mit einer benignen Prostataplasie<sup>9</sup>. Die Proben waren geblindet und stammten von Prof. Dr. K. Jung aus dem Berlin Institute for Urologic Research. Von allen Probanden war der Wert des gängigen Biomarkers für Prostatakrebs, PSA, bekannt<sup>39</sup>. Dieser splittet sich in den Gesamt-PSA-Wert (tPSA) und den Wert für freies PSA (fPSA) auf. Die Patienten waren hinsichtlich des Tumorgades zusätzlich nach der Einteilung von Gleason charakterisiert.

Im Mittel war die SEPP1-Konzentration in den Prostatakrebspatienten gegenüber den Kontrollen signifikant erniedrigt (2,9 [1,1-5,5] versus 3,4 [1,9-5,6 mgSEPP1/L). Die mittleren Selenwerte lagen bei 81,4 [67,9-98,4] bzw. 95,9 [82,0-117,9] µgSe/L. Eine Receiver Operating Characteristic (ROC)-Auswertung unter Einbeziehung der Parameter Alter, tPSA, fPSA und SEPP1 ergab einen höheren diagnostischen Wert als eine Auswertung ohne SePP1 (area under the curve, AUC: 0,80 mit SEPP1 im Vergleich zu 0,77 ohne SEPP1).

Die Quantifizierung von SEPP1 in großen Kollektiven von gesunden Probanden und Patienten zeigte einen niedrigeren Selen- und SEPP1-Status in Patienten mit Sepsis oder Prostatakrebs. Zellkultur- und Tierexperimente sollten nun Aufschluss über die Regulation der hepatischen SEPP1-Biosynthese geben. Die Erkenntnisse sollten dazu dienen, den Zusammenhang zwischen Selenstatus und Erkrankungen besser zu verstehen und Wege aufzeigen, die SEPP1 Biosynthese zu steuern und darüber evtl. den Krankheitsverlauf positiv zu beeinflussen.

In unserem Forschungslabor wurden Mäuse generiert, denen das Gen für *Sepp1* fehlte, sog. *Sepp1*<sup>-/-</sup> Mäuse. Diese Tiere weisen einen erniedrigten Selengehalt in Plasma, Niere, Testes und Gehirn auf. Die Aktivität von Selenoenzymen ist in den einzelnen Organen reduziert, jedoch in einer gewebe- und enzyspezifischen hierarchischen Abstufung<sup>40</sup>. So findet z.B. eine verringerte GPX4-Expression in den Testes statt und männliche Mäuse sind unfruchtbar. Des Weiteren weisen die Mäuse einen neurologischen Phänotyp mit Ataxien und Krampfanfällen sowie motorische Störungen auf<sup>15</sup>.

Da wir die physiologische Bedeutung des in der Leber produzierten und sezernierten SEPP1 genauer untersuchen wollten, generierten wir zusätzlich einen Mausstamm, der ein humanes *SEPP1*-Gen unter einem Transthyretin-Promotor trägt. Diese transgenen *Sepp1*<sup>-/-</sup> Mäuse exprimieren SEPP1 hepatozytspezifisch (*Sepp1*<sup>-/-;SEPP1</sup>). Die Expression von humanem SEPP1 konnte ich im Serum der Mäuse mit Hilfe des Assays messen und im Western Blot zeigen<sup>17</sup>.

Weder die transgenen noch die knock-out Mäuse zeigten bei normaler, d.h. selenhaltiger Ernährung einen auffälligen Phänotyp. Analysen der Selenkonzentration im Serum und verschiedenen Geweben sowie die Messung der Aktivität verschiedener Selenoenzyme

fürten zu folgenden Ergebnissen: Im Vergleich zu *Sepp1*<sup>-/-</sup> Mäusen konnten wir in *Sepp1*<sup>-/-;SEPP1</sup>-Mäusen eine deutlich höhere Selenkonzentration im Serum und in der Niere messen. Die Gpx- und Txnrd-Aktivität in der Niere war ebenfalls höher, während bei der Gpx3-Aktivität im Plasma keine signifikante Veränderung zu beobachten war. Hingegen war die Gpx-Aktivität im Gehirn ebenfalls höher. Die Gpx4-Expression in Testes von transgenen Mäusen war messbar - die Spermienmotilität nahm zu und die männlichen Mäuse waren wieder fertil.

Eine selenarme Ernährung (0,06 mg Se/kg) führt bei unseren *Sepp1*<sup>-/-;SEPP1</sup>-Mäusen zu einem verbesserten Überleben gegenüber den Geschwistertieren ohne Transgen mit *Sepp1*<sup>-/-</sup> Genotyp. Setzt man die Tiere auf eine selenreichere Ernährung, (0,16-0,2 mgSe/kg) führt die leberspezifische Expression von SEPP1 in den transgenen Tieren zu einer verbesserten Expression von Gpx und Txnrd im Gehirn, und damit zur Behebung der neurodegenerativen Effekte. Ebenso führte der Anstieg der Gpx4-Aktivität in den Testes zur Wiederherstellung der Fertilität transgener Mäuse, im Gegensatz zu ihren männlichen Geschwistern ohne *SEPP1*-Transgen.

Die Bedeutung von *Sepp1* in der Immunantwort untersuchten wir durch die Behandlung von Mäusen mit Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS)<sup>10</sup>. Der Stimulus des Bestandteils von gram-negativen Bakterien ruft eine akute Entzündungsreaktion ähnlich einem septischen Schock in den Mäusen hervor. Wir wählten dieses Modell, um eine Möglichkeit zu haben, mechanistische Analysen in der Leber zur Biosynthese von *Sepp1* während einer inflammatorischen Reaktion durchführen zu können.

Die *Sepp1*- und Selen-Konzentrationen im Serum sanken nach Injektion von LPS in den Mäusen parallel auf ca. 50% der Kontrollen. Im Gegensatz zum zirkulierenden *Sepp1* fiel die *Sepp1*-mRNA-Konzentration in der Leber jedoch nur kurzfristig leicht ab, und stieg dann wieder nahezu konstant auf Normalniveau. Hingegen sanken die Transkriptmengen der Gene, die in die *Sepp1*-Biosynthese involviert sind. Es handelt sich hier um selenspezifische Translationsfaktoren oder Biosyntheseenzyme wie den Selenocystein-spezifischen Elongationsfaktor (EF-Sec bzw. eSelB)<sup>41</sup>, die selenabhängige Selenophosphat-Synthetase 2 (Seps2 bzw. SPS2)<sup>42</sup>, die Selenocystein-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup>-Synthase (SecS bzw. SLA)<sup>43</sup> sowie die Phosphoseryl-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup>-Kinase (Pstk)<sup>44</sup>. Aus diesen Effekten konnten wir schließen, dass die Translation der *Sepp1*-

mRNA während der Akutphase-Reaktion (APR) gestört war und eine verminderte Sepp1 Biosynthese und hepatische Sezernierung ursächlich für die fallenden Serum-Selenkonzentrationen während der Entzündungsreaktion waren. Diese Ergebnisse wiederum unterstreichen die Bedeutung des im ersten Abschnitts meiner Arbeit etablierten SEPP1-Quantifizierungsassays und bestätigen die funktionelle Bedeutung der SEPP1-Regulation während der Akutphase-Reaktion. Inzwischen konnte unsere Arbeitsgruppe diese Ergebnisse um die Erkenntnis erweitern, dass die unterdrückte Sepp1-Biosynthese mit einer erhöhten Translation des hepatischen Selenoprotein S korreliert. Dieses Protein ist im Endoplasmatischen Retikulum an der Kontrolle des Sezernierungsprozesses hepatischer Akutphaseproteine beteiligt und erscheint insofern während der Entzündungsprozesse teleologisch gesehen als ein dringender benötigtes Selenoprotein.

## **Diskussion**

Der Selenstatus eines Individuums wird in engem Zusammenhang mit gesundheitlichen Aspekten gesehen und stellt daher einen medizinisch-relevanten Parameter dar<sup>45</sup>. Es gibt verschiedene Analysemethoden für die Bestimmung des Selenstatus eines Individuums. An erster Stelle steht hier die Gesamtselenbestimmung aus Vollblut, Plasma oder Serum, früher auch aus Haaren, Fußnägeln oder Urin<sup>46</sup>. Des Weiteren kann die Aktivität der selenabhängigen Glutathionperoxidase im Cytosol von Erythrozyten (GPX1) oder der im Plasma vorkommenden GPX3 bestimmt werden<sup>47</sup>. Die Bestimmungen von Selen sowie der GPX1- und GPX3-Aktivitäten sind allerdings technisch sehr aufwändig und mitunter aufgrund der Sensitivität enzymatischer Aktivitäten gegenüber Lagerung, Einfrierzyklen oder Temperaturschwankungen nur schwer reproduzierbar. In verschiedenen Veröffentlichungen konnte bereits gezeigt werden, dass SEPP1 einen alternativen und verlässlichen Biomarker für den Selenstatus eines Individuums darstellen könnte<sup>48 49 45</sup>. Bisher gab es jedoch keine normierte Methode für die Bestimmung der SEPP1-Konzentration im Serum oder Plasma von Individuen.

Rückschlüsse auf den Gesundheitszustand im Zusammenhang mit dem Selenstatus lassen sich jedoch nur durch eine nachvollziehbare Normierung einer Methode und das reproduzierbare Messen großer Kollektive zeigen. Ein Ziel meiner Arbeit war es daher, einen sensitiven, zuverlässigen und schnell durchführbaren Assay für die Bestimmung von SEPP1 zu entwickeln. Die Charakterisierung des Assays als Routinemethode in einem medizinischen Labor gehörte ebenfalls zu meiner Arbeit. Der Assay wurde auf Sensitivität und Spezifität geprüft, der Variationskoeffizient im Inter- und Intraassay bestimmt sowie der Analyt SEPP1 auf Stabilität und Verdünnungslinearität getestet. Hierbei konnte ich zeigen, dass SEPP1 in Serum über 24 h bei Raumtemperatur sowie über bis zu sechs Einfrier- und Auftauzyklen stabil ist. Die Sensitivität des Assays ist sehr hoch; wir können bis eine um das 200-fach niedrigere Konzentration als die Normalkonzentration von SEPP1 bestimmen, und damit zuverlässig alle denkbaren Konzentrationsschwankungen im Menschen abdecken<sup>4</sup>. Obwohl es bereits Antikörperbasierte Assays für die Bestimmung von SEPP1 gab<sup>6 48</sup>, wurden bei keiner der bisher beschriebenen Methoden diese Qualitätsmerkmale erhoben und die präanalytischen Parameter getestet. Ich konnte zeigen, dass SEPP1 in Plasma nicht die gleichen

Stabilitätsbedingungen erfüllt wie in Serum. Dieser Sachverhalt bedarf noch der biochemischen Erklärung und sollte bei der Interpretation der Ergebnisse anderer Veröffentlichungen seine Berücksichtigung finden.

Mit der Vermessung großer Kollektive verschiedener Herkunft konnte ich zeigen, dass der Durchschnitt der SEPP1-Konzentration geografische Unterschiede aufweist. Die aus Deutschland stammenden Proben ergaben einen durchschnittlichen SEPP1-Gehalt von 3,04 (2,6-3,4) mg SEPP1/L Serum<sup>4</sup>, während die aus Dänemark stammenden Proben einen niedrigeren Gehalt aufwiesen [2,72 (2,18-3,49) mg/L]<sup>5</sup>. Es lässt sich vermuten, dass die Selenaufnahme mit der Nahrung in Deutschland höher ist als in Dänemark, was zu einem höheren SEPP1-Gehalt im Serum führt. Es muss jedoch bedacht werden, dass die Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln wie Selen bei den deutschen Probanden nicht bekannt war. Da das Probenkollektiv aus einem Sportverein rekrutiert wurde, könnte jedoch der Anteil an aktiv supplementierenden Individuen höher sein. Daher kann zurzeit noch kein abschließender Vergleich angestellt werden.

Andere Analysen zeigen ebenfalls Unterschiede im SEPP1-Gehalt von Bewohnern verschiedener Regionen der Welt. Gesunde US-Amerikaner liegen bei 5,5 mg SEPP1/L<sup>50</sup> und männliche gesunde Japaner bei 3,4 mg SEPP/L<sup>6</sup>. Dies korreliert mit dem hohen Selengehalt in der Nahrung in den USA im Vergleich zu unseren Breitengraden oder mit den intermediären Selengehalten in Asien. Ich möchte jedoch noch einmal darauf hinweisen, dass diese Werte mit unterschiedlichen Methoden ermittelt wurden. Ein direkter Vergleich wäre nur möglich, wenn sich eine einheitliche Quantifizierungsmethode für SEPP1 durchsetzen würde, und gerade bei immunologischen Bestimmungen die gleichen antigenen Determinanten bestimmt würden. Als Grundlage würde sich der von mir entwickelte Assay anbieten, da er bereits ausreichend charakterisiert ist und sich für die Vermessung großer Kollektive eignet. Auch wenn es sich bisher aufgrund der großen Serummengen als vorteilhaft erwiesen hat, polyklonale Antikörper im Schaf zu produzieren, so ist die Verwendung polyklonaler Antikörper langfristig gesehen eher unpraktisch für eine Quantifizierungsmethode, da es sich um eine endliche Quelle handelt, deren Antikörper keine gleichbleibende Qualität aufweisen. Momentan werden daher monoklonale Antikörper entwickelt, die auf lange Sicht gesehen eine stabilere Methode versprechen.

Ein Teilaspekt, der sich aus meiner Arbeit ergab und im Hinblick auf eine Selen-supplementation mehr Aufmerksamkeit verdient, war der Unterschied des SEPP1-Gehaltes zwischen den Geschlechtern und verschiedenen Altersgruppen. Hierzu gibt es bereits mehrere Veröffentlichungen mit verschiedenen Ergebnissen<sup>51 52 53</sup>. Wir konnten in unserer Forschungsgruppe geschlechtsspezifische Unterschiede in der Sepp1-Expression bei Mäusen feststellen<sup>54</sup>. Bei der Vermessung von insgesamt 318 gesunden Probanden konnte ich über alle Altersstufen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede im SEPP1-Gehalt feststellen<sup>4</sup>. Hingegen ergibt sich bei den männlichen dänischen Probanden ein höherer SEPP1-Gehalt als bei den weiblichen<sup>5</sup>. Hier konnte jedoch nur die Altersgruppe der 60-65jährigen betrachtet werden, da keine jüngeren männlichen Teilnehmer zur Verfügung standen.

In beiden Studien konnte ein steigender SEPP1-Gehalt mit dem Alter beobachtet werden<sup>4 5</sup>. Dies bezieht sich bei der dänischen Studie jedoch nur auf die weiblichen Teilnehmer, da bei den Männern nur eine Altersgruppe für die Analyse zur Verfügung stand.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass sich die Regulation der Biosynthese von SEPP1 und evtl. auch anderer Selenoproteine mit steigendem Alter verändert. Möglicherweise zirkuliert im Alter mehr SEPP1 im Serum, das als Speicher für Selen fungiert. Eventuell ist der Selenbedarf im Alter ein ganz anderer als in jüngeren Jahren. Zusätzlich wären auch geschlechtsspezifische Unterschiede denkbar. Diese Aspekte sind in bisherigen Veröffentlichungen kaum oder gar nicht berücksichtigt worden und sollten in unserer zukünftigen Forschung eine wichtige Rolle spielen. Sie bilden eine wichtige Voraussetzung bei der Fragestellung nach Selensupplementation von gesunden Individuen zur Vorbeugung von Erkrankungen und zu den Effekten der Selengabe während einer Erkrankung.

In Präventivstudien wie der NPC-Studie (Nutritional Prevention of Cancer; USA 1996) konnte gezeigt werden, dass selensupplementierte Probanden seltener an Prostatakrebs erkranken, insbesondere, wenn sie mit einem niedrigen Selenstatus in die Studie eingetreten waren<sup>55</sup>. Das Risiko konnte nach einer Selensupplementation von 200 µg Se/Tag über einen Zeitraum von 4,5 Jahren um bis zu 65% gesenkt werden. Die 2001 großangelegte Fortsetzung mit über 35.000 ausschließlich männlichen Teilnehmern, SELECT (The Selenium And Vitamin E Cancer Prevention Trial), wurde vor kurzem

gestoppt, da kein chemopräventiver Erfolg verzeichnet wurde und der Verdacht bestand, dass eine hohe Selensupplementation das Risiko vergrößert, an Diabetes Mellitus zu erkranken<sup>56 57 58</sup>. Eine genauere Analyse der Daten zeigt jedoch, dass dies lediglich auf die Teilnehmer zutrifft, die bereits zu Beginn der Studie einen sehr hohen Selengehalt aufwiesen<sup>55</sup>.

Es wird inzwischen angenommen, dass Probanden, die bereits zu Beginn einer Studie einen hohen Selenspiegel aufweisen, kaum von einer Selengabe profitieren. Es wird vermutet, dass – zumindest bei den Proteinen, die als Marker dienen (SEPP1 und GPX3) – eine Sättigungskonzentration erreicht wird<sup>48 50</sup> und die Konzentration der gemessenen Selenoproteine dann nicht mehr proportional zur Einnahme von Selen verläuft. Dies spiegelt sich auch in den verschiedenen Korrelationskoeffizienten zwischen Selen und SEPP1 wider. Demnach würde der Gesamtselengehalt im Körper bei Individuen mit gesättigtem SEPP1-Gehalt nicht mehr adäquat wiedergegeben werden können. Da GPX3 augenscheinlich früher in den Sättigungsbereich kommt als SEPP1<sup>59</sup>, kann man dies als weiteren Vorteil von SEPP1 als Biomarker sehen, um den Selenstatus eines Individuums verlässlicher darstellen zu können. Es ist bisher jedoch nicht eindeutig erwiesen, dass es bei SEPP1 tatsächlich zu einer nahrungsbedingten Sättigung kommt. Nach unseren veröffentlichten Ergebnissen liegt der Korrelationskoeffizient zwischen dem Gesamtselengehalt und SEPP1 bei  $r_{\text{Spearman}}=0,52^9$ . Bei der ebenfalls in unserem Labor durchgeführten Vermessung von drei weiteren Kollektiven mit 237, 391 bzw. 231 Proben liegen die Korrelationskoeffizienten nach Spearman bei 0,40, 0,44 bzw. 0,55, im Gegensatz zum Gesamtselengehalt und pGPX3, bei der wir bei der Vermessung der gleichen 231 Proben lediglich einen Spearman-Koeffizienten von 0,29 feststellen konnten (bisher nicht publizierte Daten).

Die Eignung von SEPP1 als zusätzlichen Biomarker von Prostatakrebs testete ich mit Hilfe des neu entwickelten Assays anhand eines großen Kollektivs von Prostatakrebspatienten und Kontrollen aus der gleichen Quelle. Die ROC-Analyse ergab eine bessere diagnostische Qualität, wenn SEPP1 neben Alter, tPSA und fPSA-Wert mit einbezogen wurde. Wir konnten ebenfalls einen erniedrigten Gesamtselengehalt im Serum messen. In einer anderen Studie wurde der Selengehalt im Plasma von Prostatakrebspatienten bestimmt und kein Zusammenhang zwischen Selenkonzentration und Schwere der

Erkrankung festgestellt<sup>60</sup>. Diese Ergebnisse könnten nur scheinbar im Widerspruch zueinander stehen. In der erwähnten EPIC-Studie (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) wurde die Selenbestimmung aus Plasma und nicht aus Serum durchgeführt, und die pathologische Einordnung der Probanden erfolgte durch mehrere unabhängige Pathologen und nicht durch ein einzelnes Team. Ein Vergleich der Ergebnisse ist jedoch nur mit einheitlichen Methoden und einer diagnostisch validierten Befunderhebung möglich.

Unsere Erkenntnisse im Bereich des Selen- und SEPP1-Metabolismus haben in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht. Die Regulation der Biosynthese von Selenoproteinen und die hierarchische Verwertung von Selen im Krankheitsfall bergen jedoch nach wie vor viele Unklarheiten. Mehrere Hinweise in diesem Bereich erhielt ich durch die Vermessung von Patienten mit einer akuten Entzündung (Sepsis) sowie durch entsprechende Tierexperimente.

Mit Hilfe des neu entwickelten Sandwich-ELISA konnte ich nachweisen, dass die SEPP1-Konzentration im Serum von Sepsis-Patienten erheblich sinkt. Niedrige Gesamtselen- und SEPP1-Konzentrationen führen nachweislich zu einer höheren Sterblichkeitsrate bei Sepsis. Verschiedene Veröffentlichungen weisen auf den Zusammenhang zwischen sinkendem Selengehalt und inflammatorischen Erkrankungen hin<sup>6 7</sup>. Der Umkehrschluss, nämlich dass eine Selensupplementation generell zu einer niedrigeren Sterblichkeit führt, hat sich jedoch nicht durchgehend bestätigt<sup>61 62 63</sup>. Es gibt keine statistisch relevanten Werte in Zusammenhang mit Alter, Geschlecht, Krankheit und Selensupplementation. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass Patienten mit einem niedrigen Selenstatus am meisten von einer Supplementation profitieren. So konnte ich wertvolle Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen SEPP1-Status und weit verbreiteten Erkrankungen gewinnen, die sich auf statistisch signifikante Angaben stützen. Weiterführende Analysen sollten sich jedoch auch auf Faktoren wie Geschlecht und Alter konzentrieren, damit eine verlässliche Aussage über den Zusammenhang zwischen SEPP1-Status und Krankheitsrisiko und Konvaleszenzprognose gemacht werden kann.

Da SEPP1 den Großteil des im Plasma vorkommenden Selen enthält, ging ich bei meiner Arbeitshypothese davon aus, dass die Abnahme des Selenwertes im Serum während der Akutphase-Reaktion (APR) auf eine negative Regulation der SEPP1-Biosynthese zurück-zuführen ist. Wir konnten nachweisen, dass die Translation von *Sepp1* während der APR in Mäusen gestört ist, was sich in einer niedrigeren Selen- und *Sepp1*-Konzentration im Serum zeigt. Eine deutliche Absenkung der *Sepp1*-mRNA-Transkriptmenge in der Leber, dem Hauptsyntheseort von *Sepp1*, ist hingegen nicht zu beobachten, wohl aber eine Abnahme verschiedener Transkripte, die für die Translation und Biosynthese von *Sepp1* eine wichtige Rolle spielen. Dies führt wahrscheinlich zu einer Abnahme an synthetisiertem und sezerniertem *Sepp1* aus der Leber.

Transgene *Sepp1*<sup>-/-</sup> Mäuse, die ein humanes SEPP1 Transgen in der Leber produzieren, bestätigen diese Beobachtung. Bei Selenmangel ist die hepatische Translation der SEPP1-mRNA gestört. Selensupplementation hingegen führt nicht nur zum Anstieg von Selen und SEPP1 im Serum, sondern auch zu einem Anstieg der Gpx-Aktivität in den *Sepp1*-abhängigen Geweben wie Testes und Gehirn. In beiden Organen konnte der ApoER2-Rezeptor als *Sepp1*-Rezeptor identifiziert werden<sup>64 65</sup>. Auch wenn SEPP1 ein essentielles Transportprotein für Se darstellt, so ist es doch nicht auszuschließen, dass lokale Expression von SEPP1 in Organen wie Gehirn und Testes bei Selenmangel eine wichtige Rolle spielt<sup>66 67</sup>.

Dieses Ergebnis untermauert die Bedeutung von SEPP1 als Transportprotein von Selen. Wir können aus unseren Tierexperimenten schließen, dass im Plasma vorkommendes SEPP1 vorwiegend in der Leber exprimiert wird und ein lebensnotwendiges Transportprotein für Selen zu verschiedenen Organen darstellt. Dies trifft besonders bei suboptimaler Selenversorgung zu.

Der Kontrollmechanismus der Biosynthese von Selenoproteinen ist ein weites Forschungsfeld. Der neueste Kenntnisstand zu den beteiligten Faktoren und Regulationselementen wird in anderen, hervorragenden Veröffentlichungen ausführlich beschrieben<sup>68 40</sup> und würde den Rahmen dieser Zusammenfassung sprengen. Meine

Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass die Biosynthese von Sepp1 vorwiegend auf der Translationssebene stringent reguliert wird.

Mit der Entwicklung eines zuverlässigen Sandwich-ELISA für die Bestimmung von SEPP1 in humanem Serum habe ich einen weiteren Schritt in Richtung einer verbesserten Analytik und eines besseren Verständnisses der Selenversorgung eines Individuums getan. Meine Ergebnisse zeigen, dass SEPP1 einen verlässlichen Biomarker für den Selenstatus eines Individuums darstellt. Was die Regulation der Biosynthese des Proteins angeht, so werden wir in Zukunft auch Faktoren wie Alter und Geschlecht mit einbeziehen müssen, um letztendlich Aussagen über eine hilfreiche Selensupplementation bei Krankheiten und evt. auch zur Vorbeugung von Krankheiten treffen zu können. Selen ist eines der wichtigsten Spurenelemente, mit dem wir unseren Körper ausreichend versorgen müssen<sup>69</sup>. Mit meiner Arbeit habe ich einen Beitrag dazu geleistet, den Selenstatus in der gesunden Bevölkerung mit großer Messgenauigkeit und geringem Zeitaufwand zu bestimmen. Auch die evt. notwendige Selensupplementation zur Prävention oder zur positiven Beeinflussung eines Krankheitsverlaufes kann mit meiner Methode einfach, zuverlässig, schnell und genau bestimmt werden.

## Quellennachweise

- <sup>1</sup> Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, and Gladyshev VN (2003) Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* **300**:1439-1443
- <sup>2</sup> Rayman MP. (2000) The importance of selenium to human health. *Lancet* **356(9225)**:233–41.
- <sup>3</sup> Triggiani V, Tafaro E, Giagulli VA, Sabbà C, Resta F, Licchelli B, Guastamacchia E. (2009) Role of Iodine, Selenium and Other Micronutrients in Thyroid Function and Disorders. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. Review. [Epub ahead of print]
- <sup>4</sup> Hollenbach B, Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A, Köhrle J, Schomburg L (2008) New assay for the measurement of selenoprotein P as a sepsis biomarker from serum, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **22**:24–32
- <sup>5</sup> Rasmussen LB, Hollenbach B, Laurberg P, Carlé A, Hög A, Jørgensen T, Vejbjerg P, Ovesen L, Schomburg L (2009) Serum selenium and selenoprotein P status in adult Danes – 8-year followup, *J. Trace Elem. Med. Biol.* [E-pub ahead of print May 8<sup>th</sup>]
- <sup>6</sup> Andoh A, Hirashima M, Maeda H, Hata K, Inatomi O, Tsujikawa T, et al. (2005) Serum selenoprotein-P levels in patients with inflammatory bowel disease. *Nutrition* **21(5)**:574–9
- <sup>7</sup> Forceville X, Vitoux D, Gauzit R, Combes A, Lahilaire P, Chappuis P. (1998) Selenium, systemic immune response syndrome, sepsis, and outcome in critically ill patients, *Crit. Care Med.* **26**:1536–1544.
- <sup>8</sup> Dreher I, Jakobs TC, Köhrle J. (1997) Cloning and characterization of the human selenoprotein P promoter. Response of selenoprotein P expression to cytokines in liver cells. *J Biol Chem* **272(46)**:29364–71
- <sup>9</sup> Meyer HA, Hollenbach B, Stephan C, Endermann T, Morgenthaler NG, Cammann H, Köhrle J, Jung K and Schomburg L (2009) Reduced serum selenoprotein P concentrations in German prostate cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **18(9)**: [acc. 6/29/09]
- <sup>10</sup> Renko K, Hofmann PJ, Stoedter M, Hollenbach B, Behrends T, Köhrle J, Schweizer U, Schomburg L. (2009) Down-regulation of the hepatic selenoprotein biosynthesis machinery impairs selenium metabolism during the acute phase response in mice, *FASEB J.* **23 (6)**:1758-65
- <sup>11</sup> Mörk H, Al-Taie OH, Bahr K, Zierer A, Beck C, Scheurlen M, Jakob F, and Köhrle J. (2000) Inverse mRNA expression of the selenocysteine-containing proteins GI-GPx and SeP in colorectal adenomas compared with adjacent normal mucosa. *Nutr Cancer* **37(1)**:108-116.
- <sup>12</sup> Gromadzinska J, Reszka E, Bruzelius K, Wasowicz W, and Akesson B. (2008). Selenium and cancer: biomarkers of selenium status and molecular action of selenium supplements. *Eur J Nutr* **47 Suppl 2**:29-50.
- <sup>13</sup> Papp LV, Lu J, Holmgren A, and Khanna KK. (2007) From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal* **9(7)**:775-806
- <sup>14</sup> Schweizer U, Michaelis M, Köhrle J, and Schomburg L. (2004) Efficient selenium transfer from mother to offspring in selenoprotein-P-deficient mice enables dose-dependent rescue of phenotypes associated with selenium deficiency. *Biochem.J.* **378**, 21-26

- 
- <sup>15</sup> Hill KE, Zhou J, McMahan W J, Motley AK, and Burk RF. (2004) Neurological dysfunction occurs in mice with targeted deletion of the selenoprotein p gene. *J.Nutr.* **134**, 157-161
- <sup>16</sup> Olson GE, Winfrey VP, Nagdas SK, Hill KE, and Burk RF. (2005) Selenoprotein P is required for mouse sperm development. *Biol.Reprod.* **73**, 201-211
- <sup>17</sup> Renko K, Werner M, Renner-Müller I, Cooper TG, Yeung CH, Hollenbach B, Scharpf M, Köhrle J, Schomburg L, Schweizer U (2008) Hepatic selenoprotein P (SePP) expression restores selenium transport and prevents infertility and motor-incoordination in Sepp-knockout mice. *Biochem J.* **409(3)**:741-9
- <sup>18</sup> Hatfield DL and Gladyshev VN. (2002) How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol.Cell Biol.* **22**, 3565-3576
- <sup>19</sup> Copeland PR. (2003) Regulation of gene expression by stop codon recoding: Selenocysteine. *Gene* **312**, 17–25.
- <sup>20</sup> Driscoll DM and Copeland PR. (2003) Mechanism and regulation of selenoprotein synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* **23**, 17–40
- <sup>21</sup> Schomburg L, Schweizer U, and Köhrle J. (2004). Selenium and selenoproteins in mammals: Extraordinary, essential, enigmatic. *Cell Mol. Life Sci.* **61**, 1988–1995
- <sup>22</sup> Brigelius-Flohé R. (1999) Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biol Med* **27(9–10)**:951–65
- <sup>23</sup> Köhrle J. (2000) The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cell Mol Life Sci* **57(13–14)**:1853–63
- <sup>24</sup> Biaglow JE, Miller RA. (2005) The thioredoxin reductase/ thioredoxin system: novel redox targets for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* **4(1)**:6–13
- <sup>25</sup> Flohe L, Brigelius-Flohé R, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, and Ursini F. (2001) Selenium and male reproduction. In “Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health” (D. L. Hatfield, Ed.), Chap 22, pp. 273–281. Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA, USA
- <sup>26</sup> Beck MA, Levander OA, Handy J. (2003) Selenium deficiency and viral infection. *J Nutr*; **133(5 Suppl. 1)**:1463S–7S.
- <sup>27</sup> Zimmermann MB, Köhrle J. (2002) The impact of iron and selenium deficiencies on iodine and thyroid metabolism: biochemistry and relevance to public health. *Thyroid.* **12(10)**:867-78. Review.
- <sup>28</sup> Angstwurm MW, Engelmann L, Zimmermann T, Lehmann C, Spes CH, Abel P, Strauss R, Meier-Hellmann A, Insel R, Radke J, Schüttler J, Gärtner R. (2007) Selenium in intensive care (SIC): results of a prospective randomized, placebo-controlled, multiple-center study in patients with severe systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock. *Crit. Care Med.* **35** 118–126
- <sup>29</sup> Sakr Y, Reinhart K, Bloos F, Marx G, Russwurm S, Bauer M, Brunkhorst F. (2007) Time course and relationship between plasma selenium concentrations, systemic inflammatory response, sepsis, and multiorgan failure. *Br J Anaesth.* **98(6)**:775-84

- 
- <sup>30</sup> Gromadzinska J, Reszka E, Bruzelius K, Wasowicz W, and Akesson B. (2008). Selenium and cancer: biomarkers of selenium status and molecular action of selenium supplements. *Eur J Nutr* **47 Suppl 2**:29-50
- <sup>31</sup> Moschos MP (2000) Selenoprotein P. *Cell Mol Life Sci* **57**:1836-1845
- <sup>32</sup> Hill KE, Lloyd RS, Yang JG, Read R, and Burk RF. (1991) The cDNA for rat selenoprotein P contains 10 TGA codons in the open reading frame. *J Biol Chem*. **266**:10050-10053
- <sup>33</sup> Motsenbocker MA, Tappel AL. (1982) A selenocysteine-containing selenium-transport protein in rat plasma. *Biochim Biophys Acta*. **719(1)**:147-53
- <sup>34</sup> Neve J, Vertongen F, Molle L. (1985) Selenium deficiency. *Clin Endocrinol Metab* **14(3)**:629–56
- <sup>35</sup> Rasmussen LB, Carle A, Jorgensen T, Knudsen N, Laurberg P, Pedersen IB, Perrild H, Vejbjerg P, Ovesen L. (2008) Iodine intake before and after mandatory iodization in Denmark: results from the Danish Investigation of Iodine Intake and Thyroid Diseases (DanThyr) study. *Br J Nutr* **100**:166-173
- <sup>36</sup> Knudsen N, Bülow I, Jørgensen T, Laurberg P, Ovesen L, Perrild H. (2000) Comparative study of thyroid function and types of thyroid dysfunction in two areas in Denmark with slightly different iodine status. *Eur J Endocrinol* **143**:485-491
- <sup>37</sup> Calvo A, Xiao N, Kang J, Best CJ, Leiva I, Emmert-Buck MR, Jorcyk C, Green JE. (2002) Alterations in gene expression profiles during prostate cancer progression: functional correlations to tumorigenicity and down regulation of selenoprotein-P in mouse and human tumors. *Cancer Res* **62(18)**:5325-35
- <sup>38</sup> Diwadkar-Navsariwala V, Prins GS, Swanson SM, Birch LA, Ray VH, Hedayat S, Lantvit DL, Diamond AM. (2006) Selenoprotein deficiency accelerates prostate carcinogenesis in a transgenic model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103(21)**:8179-84
- <sup>39</sup> Pinthus JH, Pacik D, Ramon J. (2007) Diagnosis of prostate cancer. *Recent Results Cancer Res* **75**:83-99.
- <sup>40</sup> Schomburg L, Schweizer U. (2009) Hierarchical regulation of selenoprotein expression and sex-specific effects of selenium. *Biochim Biophys Acta*. Mar 25. [Epub ahead of print]
- <sup>41</sup> Tujebajeva RM, Copeland PR, Xu XM, Carlson BA, Harney JW, Driscoll DM, Hatfield DL, Berry MJ. (2000) Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion. *EMBO Rep*. **1(2)**:158-63
- <sup>42</sup> Xu XM, Carlson BA, Irons R, Mix H, Zhong N, Gladyshev VN, Hatfield DL. (2007) Selenophosphate synthetase 2 is essential for selenoprotein biosynthesis. *Biochem J*. **404(1)**:115-20.
- <sup>43</sup> Stadtman TC. (1996) Selenocysteine. *Annu Rev Biochem*. **65**:83-100. Review.
- <sup>44</sup> Carlson BA, Xu XM, Kryukov GV, Rao M, Berry MJ, Gladyshev VN, Hatfield DL. (2004) Identification and characterization of phosphoseryl-tRNA[Ser]<sub>Sec</sub> kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101(35)**:12848-53
- <sup>45</sup> Rayman MP. (2008) Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. *Br J Nutr*. **100(2)**:254-68. Review.
- <sup>46</sup> Longnecker MP, Stram DO, Taylor PR, Levander OA, Howe M, Veillon C, McAdam PA, Patterson KY, Holden JM, Morris JS, Swanson CA, Willett WC (1996) Use of selenium concentration in whole blood, serum, toenails, or urine as a surrogate measure of selenium intake. *Epidemiology*. **7(4)**:384-90

- 
- <sup>47</sup> Méplan C, Crosley LK, Nicol F, Beckett GJ, Howie AF, Hill KE, Horgan G, Mathers JC, Arthur JR, Hesketh JE. (2007) Genetic polymorphisms in the human selenoprotein P gene determine the response of selenoprotein markers to selenium supplementation in a gender-specific manner (the SELGEN study). *FASEB J.* **21(12)**:3063-74
- <sup>48</sup> Xia Y, Hill KE, Byrne DW, Xu J, Burk RF. (2005) Effectiveness of selenium supplements in a low-selenium area of China. *Am J Clin Nutr* **81(4)**:829–34
- <sup>49</sup> Murawaki Y, Tsuchiya H, Kanbe T, Harada K, Yashima K, Nozaka K, Tanida O, Kohno M, Mukoyama T, Nishimuki E, Kojo H, Matsura T, Takahashi K, Osaki M, Ito H, Yodoi J, Murawaki Y, Shiota G. (2008) Aberrant expression of selenoproteins in the progression of colorectal cancer. *Cancer Lett.* **259(2)**:218-30
- <sup>50</sup> Burk RF, Norworthy BK, Hill KE, Motley AK, Byrne DW. (2006) Effects of chemical form of selenium on plasma biomarkers in a high-dose human supplementation trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15(4)**:804–10
- <sup>51</sup> Gundacker C, Komarnicki G, Zödl B, Forster C, Schuster E, Wittmann K. (2006) Whole blood mercury and selenium concentrations in a selected Austrian population: does gender matter? *Sci Total Environ* **372**:76-86
- <sup>52</sup> Arnaud J, Bertrais S, Roussel AM, Arnault N, Ruffieux D, Favier A, Berthelin S, Estaquio C, Galan P, Czernichow S, Hercberg S. (2006) Serum selenium determinants in French adults: the SU.VI.MAX study. *Br J Nutr* **95**:313-320.
- <sup>53</sup> Letsiou S, Nomikos T, Panagiotakos D, Pergantis SA, Fragopoulou E, Antonopoulou S, Pitsavos C, Stefanadis C. (2009) Serum total selenium status in Greek adults and its relation to age. The ATTICA study cohort. *Biol Trace Elem Res.* **128(1)**:8-17
- <sup>54</sup> Schomburg L, Riese C, Renko K, Schweizer U. (2007) Effect of age on sexually dimorphic selenoprotein expression in mice. *Biol Chem* **388**:1035-1041
- <sup>55</sup> Duffield-Lillico AJ, Reid ME, Turnbull BW, Combs GF Jr, Slate EH, Fischbach LA, Marshall JR, Clark LC. (2002) Baseline characteristics and the effect of selenium supplementation on cancer incidence in a randomized clinical trial: a summary report of the Nutritional Prevention of Cancer Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **11(7)**:630-9
- <sup>56</sup> Klein EA, Thompson IM, Lippman SM, Goodman PJ, Albanes D, Taylor PR, Coltman C. (2003) SELECT: the selenium and vitamin E cancer prevention trial. *Urol Oncol* **21**:59-65. Review.
- <sup>57</sup> Lippman SM, Klein EA, Goodman PJ, Lucia MS, Thompson IM, Ford LG, Parnes HL, Minasian LM, Gaziano JM, Hartline JA, Parsons JK, Bearden JD 3rd, Crawford ED, Goodman GE, Claudio J, Winquist E, Cook ED, Karp DD, Walther P, Lieber MM, Kristal AR, Darke AK, Arnold KB, Ganz PA, Santella RM, Albanes D, Taylor PR, Probstfield JL, Jagpal TJ, Crowley JJ, Meyskens FL Jr, Baker LH, Coltman CA Jr. (2009) Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *Jama* **301**:39-51
- <sup>58</sup> Bley J, Navas-Acien A, Guallar E. (2007) Serum selenium and diabetes in U.S. adults. *Diabetes Care* **30**:829-34.
- <sup>59</sup> Duffield AJ, Thomson CD, Hill KE, Williams S. (1999) An estimation of selenium requirements for New Zealanders. *Am J Clin Nutr.* **70(5)**:896-903

- 
- <sup>60</sup> Allen NE, Appleby PN, Roddam AW, Tjønneland A, Johnsen NF, Overvad K, Boeing H, Weikert S, Kaaks R, Linseisen J, Trichopoulou A, Misirli G, Trichopoulos D, Sacerdote C, Grioni S, Palli D, Tumino R, Bueno-de-Mesquita HB, Kiemeny LA, Barricarte A, Larrañaga N, Sánchez MJ, Agudo A, Tormo MJ, Rodriguez L, Stattin P, Hallmans G, Bingham S, Khaw KT, Slimani N, Rinaldi S, Boffetta P, Riboli E, Key TJ. (2008) Plasma selenium concentration and prostate cancer risk: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Am J Clin Nutr* **88**:1567-75.
- <sup>61</sup> Manzanares Castro W. (2007) Selenium in critically ill patients with systemic inflammatory response. *Nutr Hosp*. **22(3)**:295-306. Review. Spanish.
- <sup>62</sup> Schomburg L. (2007) Selenium in intensive care (SIC) study: the XX files are still unresolved, *Crit. Care Med*. **35** 995–996.
- <sup>63</sup> Geoghegan M, McAuley D, Eaton S, Powell-Tuck J. (2006) Selenium in critical illness. *Curr Opin Crit Care*. **12(2)**:136-41. Review
- <sup>64</sup> Olson GE, Winfrey P, Nagdas SK, Hill KE, Burk RF. (2007) Apolipoprotein E<sub>2</sub> receptor-2 (ApoER2) mediates selenium uptake from selenoprotein P by the mouse testis. *J. Biol. Chem*. **282**:12290–12297.
- <sup>65</sup> Burk RF, Hill KE, Olson GE, Weeber EJ, Motley AK, Winfrey VP, Austin LM. (2007) Deletion of apolipoprotein E receptor-2 in mice lowers brain selenium and causes severe neurological dysfunction and death when a low-selenium diet is fed, *J. Neurosci*. **27**:6207–6211.
- <sup>66</sup> Schweizer U, Streckfuss F, Pelt P, Carlson BA, Hatfield DL, Köhrle J, Schomburg L (2005) Hepatically derived selenoprotein P is a key factor for kidney but not for brain selenium supply. *Biochem J* **386**:221-226
- <sup>67</sup> Zhang Y, Zhou Y, Schweizer U, Savaskan NE, Hua D, Kipnis J, Hatfield DL, Gladyshev VN. (2008) Comparative analysis of selenocysteine machinery and selenoproteome gene expression in mouse brain identifies neurons as key functional sites of selenium in mammals, *J. Biol. Chem*. **283**:2427–2438.
- <sup>68</sup> Hatfield DL, Carlson BA, Xu XM, Mix H, Gladyshev VN. (2006) Selenocysteine incorporation machinery and the role of selenoproteins in development and health. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. **81**:97-142. Review.
- <sup>69</sup> Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. (2007) Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *Jama* **297(8)**:842–57.
- <sup>70</sup> [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Selene\\_and\\_Endymion.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Selene_and_Endymion.jpg)
- <sup>71</sup> Homerus: Homerische Hymnen: Übertragung, Einführungen und Erläuterungen von Karl Arno Pfeiff, Hrsg: Gerd von der Gönna, Erika Simon. Tübingen: Stauffenberg Verlag, 2002
- <sup>72</sup> Homerus: The Homeric hymns, übersetzt von Jules Cashford, London: Penguin, 2003
- <sup>73</sup> Homerus: Himnos homéricos, übersetzt von María Antonia García Velázquez, Madrid: Akal, 2000

## **Anteilerklärung**

Frau Birgit Hollenbach hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

### **Publikation 1: 25%**

Hellmuth-Alexander Meyer\*, Birgit Hollenbach\*, Carsten Stephan, Tobias Endermann, Nils G. Morgenthaler, Henning Cammann, Josef Köhrle, Klaus Jung and Lutz Schomburg

*Reduced serum selenoprotein P concentrations in German prostate cancer patients*

\* geteilte Erstautorschaft

Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, acc. 6/29/09, in press

Impact Factor: 4,642

### **Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):**

Frau B. Hollenbach hat für diese Publikation alle Messwerte in Abbildung 1 (von 1) erhoben, die als Grundlage für die in den Tabellen 1 und 2 dargestellten Korrelationen dienten. Hierbei war ihr Beitrag essentiell, ein Großteil der statistischen Auswertung und Interpretation wurde von dem zweiten Erstautor, H.A. Meyer, erstellt, dem ein gleichgroßer Beitrag zukommt.

### **Publikation 2: 20 %**

Lone Banke Rasmussen, Birgit Hollenbach, Peter Laurberg, Allan Carlé, Antonia Hög, Torben Jørgensen, Pernille Vejbjerg, Lars Ovesen, Lutz Schomburg

*Serum selenium and selenoprotein P status in adult Danes - 8 year follow-up,*

J Trace Elem Med Biol., 2009, in press, E-pub ahead of print May 8<sup>th</sup>

Impact Factor: 2,481

### **Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):**

Frau B. Hollenbach hat alle Daten zur Abbildung 2 (von 2) erhoben und ausgewertet, und damit zur Erstellung der Tabellen 1-3 (von 3) in dieser Publikation entscheidend beigetragen. Überdies hat sie bei der Interpretation der Daten wichtige Impulse und Beiträge geleistet, und wiederum Dank ihrer Sprachkenntnisse die Fertigstellung des Manuskripts beschleunigt.

**Publikation 3: 5%**

Renko K, Hofmann PJ, Stoedter M, Hollenbach B, Behrends T, Köhrle J, Schweizer U, Schomburg L.

*Down-regulation of the hepatic selenoprotein biosynthesis machinery impairs selenium metabolism during the acute phase response in mice.*

FASEB J., 2009; 23 (6):1758-65

Impact Factor: 6,791

**Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):**

Frau B. Hollenbach hat bei der Erfassung und Interpretation der Daten zu den Abbildungen 1B, E, F und 4A, B und D beigetragen. Überdies hat sie Dank ihrer exzellenten Kenntnisse der englischen Sprache entscheidend bei der Ausformulierung der Publikation geholfen.

**Publikation 4: 50%**

Hollenbach B, Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A, Köhrle J, Schomburg L.

*New assay for the measurement of selenoprotein P as a sepsis biomarker from serum.*

J Trace Elem Med Biol., 2008;22(1):24-32

Impact Factor: 2,481

**Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):**

Frau B. Hollenbach hat für diese Publikation **alle** dargestellten experimentellen Daten erhoben und ausgewertet, i.e., die Abbildungen 2-4 (von 4) stellen ihren Beitrag dar. Überdies hat sie Dank ihrer exzellenten Kenntnisse der englischen Sprache entscheidend bei der Ausformulierung der Publikation geholfen.

**Publikation 5: 5%**

Renko K, Werner M, Renner-Müller I, Cooper TG, Yeung CH, Hollenbach B, Scharpf M, Köhrle J, Schomburg L, Schweizer U.

*Hepatic selenoprotein P (SePP) expression restores selenium transport and prevents infertility and motor-incoordination in Sepp-knockout mice.*

Biochem J, 2008 Feb 1;409(3):741-9

Impact Factor: 4,009

**Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):**

Frau B. Hollenbach hat für diese Publikation die Abbildungen 1C und 2A (von 8) beigetragen, die sowohl während der Etablierung als auch der Charakterisierung des transgenen Modells einen arbeitsintensiven und sehr wertvollen Beitrag darstellten.

## Ausgewählte Publikationen

1. Meyer HA, Hollenbach B, Stephan C, Endermann T, Morgenthaler NG, Cammann H, Köhrle J, Jung K and Schomburg L **(2009)**  
*Reduced serum selenoprotein P concentrations in German prostate cancer patients.*  
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 18(9): [acc. 6/29/09]
2. Rasmussen LB, Hollenbach B, Laurberg P, Carlé A, Hög A, Jørgensen T, Vejbjerg P, Ovesen L, Schomburg L **(2009)**  
*Serum selenium and selenoprotein P status in adult Danes – 8-year followup*  
J. Trace Elem. Med. Biol. [E-pub ahead of print May 8<sup>th</sup>]
3. Renko K, Hofmann PJ, Stoedter M, Hollenbach B, Behrends T, Köhrle J, Schweizer U, Schomburg L. **(2009)**  
*Down-regulation of the hepatic selenoprotein biosynthesis machinery impairs selenium metabolism during the acute phase response in mice.*  
FASEB J. 23 (6):1758-65
4. Hollenbach B, Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A, Köhrle J, Schomburg L **(2008)**  
*New assay for the measurement of selenoprotein P as a sepsis biomarker from serum.*  
J. Trace Elem. Med. Biol. **22**:24–32
5. Renko K, Werner M, Renner-Müller I, Cooper TG, Yeung CH, Hollenbach B, Scharpf M, Köhrle J, Schomburg L, Schweizer U **(2008)**  
*Hepatic selenoprotein P (SePP) expression restores selenium transport and prevents infertility and motor-incoordination in Sepp-knockout mice.*  
Biochem J. **414**:1–10

## **LEBENS LAUF**

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

## Komplette Publikationsliste

1. Meyer HA, Hollenbach B, Stephan C, Endermann T, Morgenthaler NG, Cammann H, Köhrle J, Jung K and Schomburg L (2009)  
*Reduced serum selenoprotein P concentrations in German prostate cancer patients.*  
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 18(9): [acc. 6/29/09]
2. Rasmussen LB, Hollenbach B, Laurberg P, Carlé A, Hög A, Jørgensen T, Vejbjerg P, Ovesen L, Schomburg L (2009)  
*Serum selenium and selenoprotein P status in adult Danes – 8-year followup*  
J. Trace Elem. Med. Biol. [E-pub ahead of print May 8<sup>th</sup>]
3. Renko K, Hofmann PJ, Stoedter M, Hollenbach B, Behrends T, Köhrle J, Schweizer U, Schomburg L. (2009)  
*Down-regulation of the hepatic selenoprotein biosynthesis machinery impairs selenium metabolism during the acute phase response in mice.*  
FASEB J. 23 (6):1758-65
4. Hollenbach B, Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A, Köhrle J, Schomburg L (2008)  
*New assay for the measurement of selenoprotein P as a sepsis biomarker from serum.*  
J. Trace Elem. Med. Biol. 22:24–32
5. Renko K, Werner M, Renner-Müller I, Cooper TG, Yeung CH, Hollenbach B, Scharpf M, Köhrle J, Schomburg L, Schweizer U (2008)  
*Hepatic selenoprotein P (SePP) expression restores selenium transport and prevents infertility and motor-incoordination in Sepp-knockout mice.*  
Biochem J. 409(3):741-9
6. Sheriff A, Vogt B, Baumgart M, Montag C, Hollenbach B, Schenk JA, Ulrich J, Elías F, Micheel B. (2003)  
*Intracellular capture of B7 in antigen-presenting cells reduces costimulatory activity.*  
Biochem Biophys Res Commun. 301(4):873-8
7. Hollenbach B, Scherzinger E, Schweiger K, Lurz R, Lehrach H, Wanker EE. (1999)  
*Aggregation of truncated GST-HD exon 1 fusion proteins containing normal range and expanded glutamine repeats.*  
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 354(1386):991-4
8. Georgalis Y, Starikov EB, Hollenbach B, Lurz R, Scherzinger E, Saenger W, Lehrach H, Wanker EE. (1998)  
*Huntingtin aggregation monitored by dynamic light scattering.*  
Proc Natl Acad Sci U S A. 95(11):6118-21

9. Scherzinger E, Lurz R, Turmaine M, Mangiarini L, Hollenbach B, Hasenbank R, Bates GP, Davies SW, Lehrach H, Wanker EE. (1997)  
*Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo.*  
Cell. 90(3):549-58

## **Erklärung**

„Ich, Birgit Hollenbach, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

### **Bedeutung und Regulation von Selenoprotein P**

#### **in inflammatorischen Erkrankungen**

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt all den Menschen, ohne die das Verfassen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke zunächst Prof. Dr. Köhrle für die Freiheiten, die er mir in der Forschungsarbeit gewährt hat. Dank seiner Offenheit für neue Projekte und seiner Bereitschaft zur Unterstützung seiner Mitarbeiter war es mir möglich, diese wissenschaftliche Arbeit zu verfassen.

Der gesamten Arbeitsgruppe werde ich es nie vergessen, dass sie mich nach längerer Abwesenheit reibungslos und freundlich wieder aufgenommen haben, insbesondere auch diejenigen, die mich vorher noch nie gesehen hatten. In meinen Augen ist die Arbeitsgruppe im Laufe der Jahre an Effektivität und Sympathie über sich selbst hinaus gewachsen. Ich bedanke mich für die Verbreitung einer herzlichen Arbeitsatmosphäre von Beginn an bei Dr. Marten Michaelis, Vartitér Seher und Tonka Djekic, für das stets offene und verständnisvolle Ohr bei Antje Kunze, für die tatkräftige Unterstützung bei Katja Schreiber, Antje Kretschmer und Tobias Endermann, für die immer bereitstehende Hilfe bei Dr. Kostja Renko, Dr. Peter Hofmann und Mette Stödter, für die Assaypflege bei Thomas Behrends, für die belebenden Pausengespräche mit Accessoire bei Anita Kinne, Katrin Huhne und Anja Fischbach sowie für die fabelhafte Zusammenarbeit und den anregenden Austausch bei Johanna Höflich und Antonia Hög. Für die Hilfe von praktischer Seite bei der Selenbestimmung danke ich Silke Kappler, und für die erfolgreiche Kooperation Dr. Hellmuth-Alexander Meyer.

Für die Betreuung von externer Seite möchte ich mich bei der B.R.A.H.M.S. AG, Hennigsdorf, bei Dr. Joachim Struck und Dr. Nils Morgenthaler bedanken. Besonders hervorheben möchte ich Sandra Müller, die mich zuverlässig und akkurat in die praktische Seite meiner Arbeit eingewiesen und bei der Weiterführung des Projekts eine tragende Rolle eingenommen hat. Für die konstruktive und positive Arbeitsatmosphäre in Hennigsdorf waren nicht zu vergessen Dajana Tandler, Dr. Monika Ühlein und Barbara Schäffus verantwortlich.

An zentraler Stelle meiner Danksagung steht jedoch ohne Zweifel mein Betreuer Prof. Dr. Lutz Schomburg, der eine ganze Seite voll Lobeshymnen verdient hätte. Ich bedanke mich von Herzen für die nie versiegende Unterstützung und manchmal notwendige Aufmunterung, sowohl von fachlicher als auch von menschlicher Seite. Ich werde die sinnstiftenden Gespräche über Selen, die Biochemie und das Leben immer in besonderer Erinnerung behalten.