

1. Einleitung

1.1 Bedeutung von Selen für Säugetiere

1.1.1 Selenocystein - die 21. Aminosäure

Selen wurde bereits 1817 durch den schwedischen Chemiker Berzelius entdeckt und benannt; es dauerte aber noch weitere 150 Jahre, bis man seine Rolle als Spurenelement im Verlauf der 1950er Jahre erstmals beschrieb (Schwarz and Folz, 1957). Seitdem hat das Wissen über die Bedeutung von Selen im Stoffwechsel unterschiedlichster Lebensformen stetig zugenommen. Heute weiß man, dass seine physiologisch aktive Form die Aminosäure Selenocystein (Sec) ist. Sie wird kotranslational in Proteine eingebaut und ist für den allergrößten Teil der biologischen Wirkungen von Selen verantwortlich.

In der mRNA wird Selenocystein durch das Triplet UGA kodiert (Hatfield and Gladyshev, 2002), welches auch ein klassisches STOP-Kodon darstellt (Khorana et al., 1966; Nirenberg et al., 1966). Heute ist es erwiesen, dass UGA beide Funktionen erfüllen kann: sowohl einen Kettenabbruch, als auch das Einfügen von Selenocystein in die entstehende Aminosäuresequenz. Das Problem der Unterscheidung zwischen den beiden Funktionen von UGA wird von der Zelle durch eine Reihe von zusätzlichen Elementen gelöst. Eines davon ist die Selenocystein-Insertions-Sequenz (SECIS) im 3'-untranslatierten Bereich aller eukaryontischen Selenoprotein-Gene (Berry et al., 1991a). Es handelt sich hierbei um eine Haarnadel-Struktur, bestehend aus durch Schleifen verbundenen Helices. Anzahl und dreidimensionale Anordnung dieser Schleifen zueinander sind selenoproteinspezifisch (Berry et al., 1993). Das SECIS-Element bewirkt, dass ein im Leserahmen befindliches UGA als Sec-kodierend gelesen wird, vorausgesetzt dass ein Mindestabstand von 51-111 Nukleotiden zwischen UGA und SECIS eingehalten bleibt (Low and Berry, 1996).

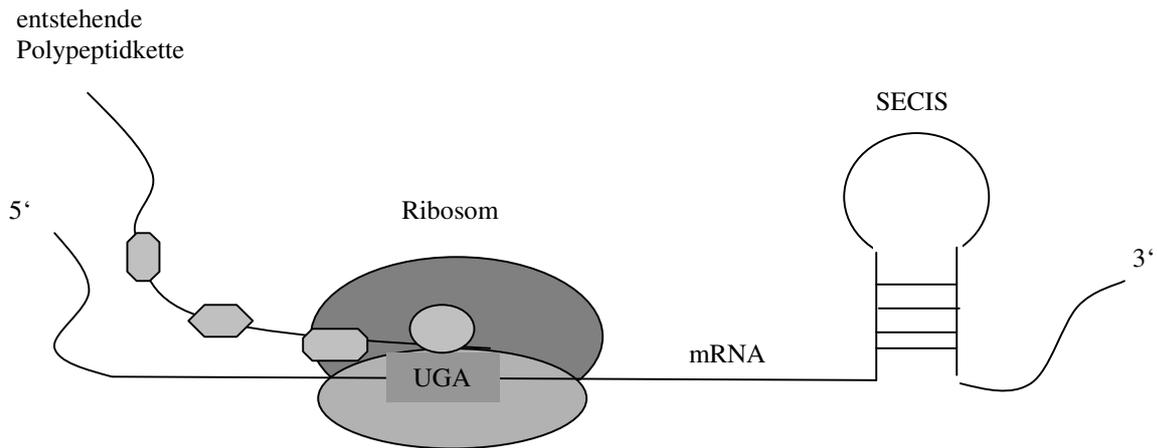


Abb. 1: Schematische Darstellung des SECIS-Elements sowie weiterer zum Einbau von Sec notwendiger Signale auf der mRNA

Dieser Abstand des SECIS-Elements zum Sec-kodierenden UGA variiert selenoprotein- und artspezifisch. Er beträgt für die meisten Selenoproteine nicht mehr als 2 kb, kann aber bis zu 5,4 kb erreichen, wie im Fall der Dejodase Typ II (Buettner et al., 1998).

Weitere unverzichtbare Faktoren der Selenocysteinsynthese sind das SECIS-bindende Protein (SBP2) und der tRNA^{Sec}-spezifische Elongationsfaktor EFsec, der sich von EF1- α , dem Elongationsfaktor für die übrigen 20 natürlichen Aminosäuren, unterscheidet.

Struktur und Funktion dieser Proteine sind unter 1.3 näher beschrieben.

Im Laufe der Evolution haben Säuger zusätzliche Mechanismen entwickelt, um auch mehr als ein Selenocystein in ein und dasselbe Protein integrieren zu können und um die Selenocysteinsynthese besonders genau zu regulieren. Ein Angelpunkt dieser Synthese und ihrer Regulation ist die Sec-spezifische tRNA, genannt tRNA^{[Ser]Sec}. Es stellte sich heraus, dass – im Gegensatz zu allen anderen natürlichen Aminosäuren des genetischen Codes – Selenocystein direkt an seiner tRNA synthetisiert wird (Bock et al., 1991). Darüber hinaus ist diese die einzig bisher bekannte tRNA, die für die Synthese einer gesamten Klasse von Proteinen, den Selenoproteinen, verantwortlich ist.

1.1.2 Selenoproteine

Proteine, die Selenocystein in ihrer Aminosäuresequenz enthalten, werden als Selenoproteine bezeichnet. Einige davon sind Enzyme, die Selenocystein in ihrem aktiven Zentrum besitzen, also Selen für ihre katalytische Aktivität benötigen. Ihre Expression wird vom Selenangebot im Organismus bestimmt.

1973 wurde bei Säugern das erste Selenoprotein, die Glutathion-Peroxidase, als solches erkannt (Flohe et al., 1973; Rotruck et al., 1973). Seit Mitte der Achziger Jahre wurde das Wissen über diese Klasse von Proteinen zunehmend größer, sodass heute 25 Gene für Selenoproteine bei Säugern identifiziert sind (Kryukov et al., 2003):

Selenoproteine	gängige Abkürzungen
Glutathionperoxidasen	GPx
Zelluläre/klassische GPx	cGPx, GPx-1
Gastrointestinale GPx	GI-GPx, GPx-GI, GPx-2
Plasma GPx	pGPx, GPx-3
Phospholipid-hyperperoxid GPx	PHGPx, GPx-4
Glutathionperoxidase 6	GPx-6
Iodothyronindejodasen	
5'-Dejodase Typ I	5'DI, Dio1, D1
5'-Dejodase Typ II	5'DII, Dio2, D2
5-Dejodase Typ III	5-DIII, Dio3, D3
Thioredoxinreduktasen	
Thioredoxinreduktase	TR1, TrxR1, Txrnd1
Testikuläre Thioredoxinreduktase	TR2, TGR
Mitochondriale Thioredoxinreduktase	TR3, TrxR2, Txrnd2
Andere	
Selenoprotein H	SelH

Selenoprotein I	SelI
Selenoprotein K	SelK
Selenoprotein M	SelM
Selenoprotein N	SelN, SEPN1
Selenoprotein O	SelO
Selenoprotein P	SelP, SePP
Selenoprotein R, X	SelR, SelX, MsrB
Selenoprotein S, Tanis	SelS
Selenophosphatsynthetase 2	SPS2
Selenoprotein T	SelT
Selenoprotein V	SelV
Selenoprotein W	SelW
15 kDa-Selenoprotein (T-Zellen)	Sep15

Tab. 1: Selenoproteine bei Säugern und ihre Abkürzungen

(Die Nomenklatur von Selenoproteinen bei Säugern ist nicht konsistent in der Literatur bzw. in internationalen Nukleotiddatenbanken (z.B. NCBI); so werden Selenoproteine teilweise als „SelP“ oder als „SePP“ abgekürzt, und analog für weitere Selenoproteine (z.B. SEPN, aber SelO)).

Die Rolle der meisten Selenoproteine im Gesamtstoffwechsel ist bisher nur unzureichend bekannt. Mindestens ein Selenoprotein muss für die frühe Embryonalentwicklung direkt nach der Implantation essentiell sein, da Knockout Embryonen von tRNA^{[Ser]Sec} bei Mäusen bereits um Tag 6.5 post coitum resorbiert werden (Bösl et al., 1997).

Ein Teil der Selenoproteine scheint eine antioxidative Funktion zu besitzen. Unter den bisher charakterisierten befinden sich vier Gluthation-Peroxidasen, drei Thioredoxin-Reduktasen und die Methioninsulfoxidreduktase B (MsrB, SelR). Alle diese drei Enzymgruppen reduzieren den Schaden, der durch oxydativen Stress an Biomolekülen wie Lipiden, Lipoproteinen und DNA entsteht.

Bei den Dejodasen handelt es sich um drei Isoenzyme, die entwicklungs- und gewebespezifisch exprimiert werden. Sie sind dafür verantwortlich, dass das im Blut mehrheitlich als L-Thyroxin (T4) zirkulierende Schilddrüsenhormon in das aktivere Trijodthyronin (T3) umgewandelt wird.

Es ist vor allem T₃, welches an Schilddrüsenhormonrezeptoren bindet und auf diese Weise Wachstum, Entwicklung, Differenzierung und Stoffwechsel bei Vertebraten steuert.

Typ I-Dejodase (Dio1) wurde 1990 als zweites Selenoenzym bei Säugern identifiziert (Behne et al., 1990; Arthur et al., 1990). Es wird vor allem in Leber, Niere, Schilddrüse und euthyreotem Hypophysenvorderlappen exprimiert. Dio1 wandelt T₄ durch 5'-Dejodierung am äußeren, phenolischen Ring in das biologisch aktive T₃ um, ist aber auch in der Lage, pH- und substratabhängig, die Inaktivierung von T₃ durch 5-Dejodierung am inneren Tyrosylring zu katalysieren (Moreno et al., 1994). Die höchste Affinität zeigt Dio1 zu reversem T₃ - rT₃ -, welches durch 5-Dejodierung von T₄ am Tyrosylring entsteht und biologisch inaktiv ist.

Typ II-Dejodase (Dio2) wird beim Menschen im zentralen Nervensystem, in der hypothyreoten Hypophyse, in braunem Fettgewebe, in Herz- und in Skelettmuskel sowie in der Plazenta synthetisiert (Croteau et al., 1996; Salvatore et al., 1996). Auch die Aktivität von Dio2 besteht in einer 5'-Dejodierung, wobei dieses Enzym - im Gegensatz zu Dio1 - T₄ als Substrat bevorzugt, und daneben nicht zu 5-Dejodierung in der Lage ist.

Typ III-Dejodase (Dio3) wurde in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen, allerdings nicht in der gesunden Leber, Niere, Schilddrüse oder Hypophyse. Dio3 katalysiert die Inaktivierung von T₃ und T₄ durch 5-Dejodierung am inneren Tyrosylring. Diese also sowohl von Dio1 als auch von Dio3 ermöglichte Reaktion wird als ein Mechanismus gedeutet, die Akkumulation von Schilddrüsenhormonen in zu hoher Konzentration oder zu unerwünschten Zeitpunkten, beispielsweise während der embryonalen Entwicklung zu verhindern (Köhrle, 1999a).

Ein Austausch von Selenocystein durch Cystein oder durch eine andere Aminosäure führt zu einer deutlichen Minderung bzw. zum Verlust der Aktivität aller Dejodasen, wie dies auch schon für andere Selenoenzyme nachgewiesen worden ist (Berry et al., 1991a; Berry et al., 1992; Kollmus et al., 1996; Axley et al., 1991; Berry et al., 1991b).

Die zelluläre Schilddrüsenhormonkonzentration einzelner Gewebe, auch die des Gehirns, unterliegt einem komplexen para-, auto- und endokrinen Zusammenspiel aller drei Dejodasen. Eine selenabhängige Synthese von Dio1 konnte im Tierexperiment mehrfach gezeigt werden (Meinhold et al., 1993; Gross et al., 1995; Köhrle et al., 1992). Auch für eine selenabhängige Stimulation der Dio3-Synthese gibt es seit längerem Hinweise (Salvatore et al., 1995; Ramauge et al., 1996). Doch erst kürzlich wurde erstmals ein Defekt im menschlichen Selenstoffwechsel als Ursache für verminderte Dio2-Aktivität nachgewiesen (Dumitrescu et al., 2005). Diese Ergebnisse erlauben es, auch beim Menschen von einer selenabhängigen Dejodaseexpression auszugehen, in seiner Entwicklung, während einzelner Reifestadien oder unter bestimmten gewebe-, organ- oder zellspezifischen Bedingungen.

60-70 % des Plasma-Selens kommt als Selenoprotein P (SePP) vor (Read et al., 1990). Ein SePP-Molekül kann dabei bis zu zehn Moleküle Selenocystein enthalten. SePP besitzt eine gewisse Redox-Aktivität; außerdem wird vermutet, dass es eine Transportfunktion für Selen und weitere, noch unbekannte Aufgaben im Gehirn besitzt. Auf Struktur und Funktion von SePP wird unter 1.3 genauer eingegangen.

Interessanterweise existiert innerhalb der Klasse der Selenoproteine eine Hierarchie, da im Falle von Selenmangel die Expression einiger Selenoproteine stärker als die anderer beeinträchtigt wird. So reagiert zum Beispiel die zelluläre Gluthation-Peroxidase (GPx-1) besonders empfindlich auf Selenmangel, während der Effekt auf Thioredoxin-Reduktasen und Deiodasen nur gering ist (Carlson et al., 2005). Weiterhin zeigt sich eine Organspezifität: In Leber und Niere sinkt der Selengehalt unter Selenmangelbedingungen schnell, während er in Gehirn und Hoden auch unter Selenmangel lange erhalten bleibt (Hill et al., 1992; Behne et al., 1998).

Eine Erklärung für diese vom Selenstatus abhängige Hierarchie könnte die jeweils vorherrschende Isoform der Sec-tRNA^{[Ser]Sec} sein. Tatsächlich existieren bei Wirbeltieren zwei Formen der Sec-tRNA^{[Ser]Sec}, die sich lediglich durch die Methylierung einer einzigen Aminosäure unterscheiden (Amberg et al., 1993). Diese Methylierung stellt den letzten Schritt in der Reifung der Sec-tRNA^{[Ser]Sec} dar und ist von der Selenversorgung des Organismus abhängig. Unter Selenmangelbedingungen sinkt der Anteil der methylierten zugunsten der unmethylierten Form (Diamond et al., 1993). Jede dieser beiden Formen begünstigt wiederum die Expression ganz bestimmter Selenoproteine (Carlson et al., 2005).

1.1.3 Selenmangel

Selen ist ein essentielles Spurenelement für viele Lebensformen, so auch für den Menschen und andere Säugetiere. Die empfohlene Tagesdosis liegt bei 55-75 µg (Rayman and Rayman, 2002). Unterhalb von 20 µg spricht man von einem Selenmangel; 800 µg gelten als Grenze zur Toxizität (Baehr et al., 1999).

Der Mensch nimmt Selen vor allem über Seefisch, aber auch über Fleisch, Getreide und Gemüse auf. Dabei schwankt der Selengehalt dieser Nahrungsmittel in Abhängigkeit vom jeweiligen Selengehalt des Erdbodens (Rayman, 2000). Da in der Landwirtschaft zahlreicher Industrieländer heutzutage die Nahrung von Nutztieren routinemäßig mit Selen angereichert wird, wird über die Nahrungskette auf diese Weise auch die Versorgung des Menschen mit Selen

sichergestellt, die ansonsten aufgrund der geringen Selenspiegel in Mitteleuropa durch pflanzliche Quellen allein kaum gewährleistet wäre.

So ist ein isolierter ernährungsbedingter Selenmangel in den meisten Regionen der Welt kein manifestes Problem. Lediglich in abgelegenen ländlichen Gegenden mit außerordentlich selenarmen Böden kommt es zu klinisch relevanten Mangelercheinungen: reversible Myopathie, Herzrhythmusstörungen, Leberfunktionsstörungen, Haar- und Hautdepigmentierung, Weißfärbung des Nagelbetts und Anämie. Auch in Fällen längerer parenteraler Ernährung ohne adäquate Selensubstitution wurden diese Mangelercheinungen beobachtet (Kien and Ganther, 1983; Vinton et al., 1987).

Niedrige Selenspiegel gehen mit einer beeinträchtigten Fertilität einher. Die Erklärung dafür könnte bei PHGPx liegen, einem Selenoprotein, das sowohl in Spermatozyten (Maiorino et al., 1999; Mizuno et al., 2000) als auch als Strukturprotein mitochondrialer Kapseln im Mittelstück reifer Spermatozoen vorkommt (Ursini et al., 1999). Im Falle von Selenmangel würde es nicht in ausreichender Menge synthetisiert.

Weiterhin wurden niedrige Selenspiegel bei Patienten mit SIRS (systemic inflammatory response syndrome) beobachtet (Hawker et al., 1990). Da eine mangelhafte Selenversorgung die antioxidative Aktivität von GPx beeinträchtigt, liegt es nahe einen Zusammenhang von Selenstatus und Schweregrad der Erkrankung bzw. Prognose dieser von Radikalbildung besonders stark betroffenen Patienten zu vermuten. Inwieweit eine niedrige Selenkonzentration dabei zu den Auswirkungen oder doch vielmehr zu den Ursachen eines septischen Syndroms gezählt werden sollte, ist noch unklar.

Zu den Folgen von Selenmangel zählt die in einigen Teilen Chinas vorkommende Keshan-Erkrankung. Es handelt sich dabei um eine kindliche Kardiomyopathie, die in Gebieten mit selenarmen Böden bei zusätzlicher Cocksackie-Virusinfektion auftritt (Beck, 2001). Durch systematische Selen-Substitution in den entsprechenden Regionen konnte die Keshan-Erkrankung weitgehend zum Verschwinden gebracht werden.

Daneben existiert in einigen ländlichen Gegenden Tibets, in denen endemisch schwerer Selenmangel beobachtet wurde, eine degenerative Gelenkerkrankung mit der Bezeichnung Kashin-Beck. Pathogenetisch handelt es sich dabei um die Nekrose von Chondrozyten, insbesondere im Bereich großer Gelenke, die zu Gelenkschmerz und eingeschränkter Gelenkbeweglichkeit führt und radiologisch durch verbreiterte Gelenkspalte imponiert. Obwohl die genaue Ätiologie der Kashin-Beck-Erkrankung noch ungeklärt ist, gibt es einige Hinweise auf ein multifaktorielles Geschehen (Sudre and Mathieu, 2001). Neben Mykotoxinen und einer Trinkwasserbelastung mit organischen Substanzen, scheinen vor allem Iod- und Selenmangel

eine Rolle zu spielen. Tatsächlich ist das Risiko, an dieser Osteopathie zu erkranken, signifikant erhöht, wenn sich zum in dieser Gegend häufigen Selenmangel ein Iodmangel gesellt (Moreno-Reyes et al., 1998). Allerdings wurde nachgewiesen, dass nach erfolgter Iodsubstitution bei Erkrankten durch zusätzliche Selengabe keine weitere Besserung der Symptomatik erreicht werden kann, sodass die Empfehlung derzeit dahin geht, in den entsprechenden Gebieten in erster Linie den Iodmangel auszugleichen (Moreno-Reyes et al., 2003).

Ein weiteres Krankheitsbild, an dessen Entstehung Selenmangel beteiligt ist, ist der in Zentralafrika beobachtete Myxödematöse Kretinismus. Wie auch alle anderen Varianten des endemischen Kretinismus tritt er unter schwerem Iodmangel auf (Delange, 1994). Schon früh wurde eine Beteiligung des in diesen Breiten herrschenden Selenmangels an der Pathogenese des Myxödematösen Kretinismus vorgeschlagen (Vanderpas et al., 1990; Contempre et al., 1991). Hinzu kamen Studien zur Bedeutung einer Thiocyanat(SCN)-Belastung für den Schweregrad von Iodmangelsymptomen wie Hypothyreose und Kropfbildung (Vanderpas et al., 1984). SCN ist ein metabolisches Produkt von Linamarin, einem Glukosid, das in der Cassava-Wurzel enthalten ist, welche wiederum in Zentralafrika als ein Hauptnahrungsmittel gilt. Kürzlich wurde nun das Zusammenspiel dieser drei Umweltfaktoren - Iodmangel, Selenmangel und SCN-Belastung - in der Entstehung von Nekrosen und einer progressiven Fibrose der Schilddrüse, wie sie bei Patienten mit Myxödematösem Kretinismus beobachtet werden, im Tierversuch gezeigt (Contempre et al., 2004).

Auch eine Assoziation niedriger Selenkonzentrationen mit malignen Schilddrüsentumoren sowie Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang von Selenstatus und der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse werden diskutiert (Köhrle, 1999b). Tatsächlich konnte in zwei Studien gezeigt werden, dass die für Autoimmunthyreoiditis spezifischen Antikörper gegen Schilddrüsen-Peroxidase (TPOAb) unter Selensubstitution im Vergleich zur Placebo-Gruppe bereits nach wenigen Monaten im Plasma abfallen (Duntas et al., 2003; Gartner et al., 2002). Daneben berichteten signifikant mehr Patienten der jeweils selensubstituierten Gruppe beider Untersuchungen von einer subjektiven Besserung ihres Wohlbefindens.

Eine weitere prospektive, placebo-kontrollierte, doppelt-blinde Studie an 1312 Patienten, die über einen Zeitraum von durchschnittlich 4,5 Jahren beobachtet wurden, verfehlte zwar ihren primären Endpunkt, da die mit 200 µg Selen am Tag substituierte Gruppe keine signifikant niedrigere Inzidenz an Basalzell- oder Plattenepithelkarzinomen als die Kontrollgruppe aufwies. Es stellte sich aber heraus, dass die Gesamttumorinzidenz und -tumormortalität des selensubstituierten Patientenkollektivs signifikant geringer im Vergleich zu Placebo war. Besonders niedrig zeigte sich dabei die Inzidenz an kolorektalen, Prostata- und

Lungenkarzinomen (Clark et al., 1996). Ein Teil des Patientenkollektivs wurde auch nach dem offiziellen Ende der Studie (Februar 1996) weiterverfolgt und die Inzidenz sowie die Prävalenz kolorektaler Adenome auf einen Zusammenhang zur jeweiligen Plasma-Selenkonzentration und zu weiteren Faktoren wie Geschlechtszugehörigkeit, Alter und Zigarettenkonsum hin geprüft (Reid et al., 2006). Neben der Tatsache, dass eine Substitution mit Selen die Prävalenz kolorektaler Adenome senkt, konnten diese Untersuchungen auch nachweisen, dass insbesondere Raucher und Personen mit vormals niedrigem Selenstatus von einem solchen Effekt profitieren. Die Ergebnisse von Clark et al. führten zu SELECT (Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial), einer prospektiven, placebo-kontrollierten, randomisierten, doppelt-blinden Phase III-Studie, die an 32400 gesunden Männern prüfen wird, ob die Inzidenz des Prostatakarzinoms durch eine Substitution von Selen, Vitamin E oder einer Kombination beider Substanzen im Vergleich zur Kontrollgruppe gesenkt werden kann. SELECT wurde 2001 begonnen; man geht davon aus, dass endgültige Ergebnisse für 2013 zu erwarten sind (Klein et al., 2003).

1.2 Fälle von kindlicher Epilepsie assoziiert mit Selenmangel

1.2.1 Klinisches Bild und Diagnostik

Ein Bericht über vier Kinder, die unter therapieresistenten epileptischen Anfällen und rezidivierenden Infekten litten, wurde 1991 von Georg F. Weber publiziert (Weber et al., 1991). Die Anfälle hatten sich innerhalb der ersten sechs Lebensmonate erstmalig manifestiert und sprachen auf jeglichen Versuch antikonvulsiver Therapie nicht an. 1994 folgte ein ähnlicher Bericht, diesmal von V. Th. Ramaekers, über zwei Kinder mit ebenfalls therapieresistenten epileptischen Anfällen (Ramaekers et al., 1994). Weder eine Monotherapie noch diverse Kombinationstherapien mit Antikonvulsiva oder Steroiden zeigten Wirkung. Das klinische Bild der Anfälle variierte zwar im Einzelnen; alle Patienten wiesen jedoch im EEG multifokale Herdaktivität und im CT sowie MRT deutliche Zeichen einer Hirnatrophie auf. Nachdem beide Autoren bei ihren Patienten sowohl chromosomale als auch metabolische Defekte sowie Infektionen ausgeschlossen hatten, fielen schließlich in allen sechs Fällen Störungen im Selenhaushalt auf.

Die nachfolgende Tabelle fasst die dabei erhobenen Befundkonstellationen zusammen:

Patient	Plasma-Selen <i>μg/l</i>	pGPx-Aktivität <i>U/l</i>	cGPx-Konzentration <i>U/g Hb</i>	cGPx-Aktivität <i>U/g Hb</i>
1 *	84 (n)	551 (↑)	12,7 (↓)	
2 *	104 (n)	504 (↑)	20,2 (↓)	
3 *	51 (↓)	190 (↓)		13,5 (n)
4 *	34 (↓)	248 (↓)		8,3 (↓)
5 +	<5 (↓)	79 ^a (↓)		10,0 (n)
6 +	35 (↓)	191 (↓)		9,4 (↓-n)
<i>Referenz</i>	<i>53-191</i>	<i>268-476</i>	<i>31,6-39,4</i>	<i>9,2-17,4</i>

Tab. 2: Selenoproteinspiegel im Blut eines ausgewählten Kollektivs von Kindern mit therapieresistenter Epilepsie

* Patient von Weber, + Patient von Ramaekers; ^a nach 4 Tagen Selensubstitution

↑ = erhöht, ↓ = erniedrigt, n = normal;

cGPx-Konzentration und -aktivität wurden in Erythrozyten gemessen.

Daneben wurden bei den Eltern der Patienten 1 und 2 sowie bei den Vätern der Patienten 3 und 4 im Vergleich zum Normwert verminderte cGPx-Aktivitäten gemessen.

Insgesamt deuten diese Daten auf einen cGPx-Defekt bei Webers Patienten 1 und 2 und einen generellen Defekt im Selenmetabolismus bei den übrigen beschriebenen Kindern hin.

Patient 6, aus Ramaekers' Kollektiv, fiel beginnend mit dem 19. Lebensmonat durch zunehmende Depigmentierung der Haare und spontane Knochenfrakturen auf. Es wurden eine Osteopenie, extraossäre Calciumablagerungen sowie verbreiterte Gelenkspalte festgestellt. Diese Befunde entsprechen denjenigen bei Selenmangel im Rahmen der Kashin-Beck-Erkrankung (Mathieu et al., 1997).

1.2.2 Therapieansätze und Verlauf

Nach Absetzen der antikonvulsiven Therapie und Einführung einer oralen Selensubstitution besserte sich die Symptomatik aller vier Patienten von Weber. Auch Ramaekers behandelte seine Patienten mit Selen (3-5 μg/kg Körpergewicht) und erzielte so innerhalb von zwei Wochen eine

Abnahme sowohl der Frequenz als auch der Dauer der Krampfanfälle. Die zuvor erhöhten Leberfunktionswerte - Serum-CK und Transaminasen - sowie das EEG normalisierten sich.

Als es aufgrund der Verlegung eines Patienten zur Unterbrechung der Selen substitution kam, wurde eine erneute Zunahme der Krampfanfälle beobachtet.

Die neuropathologischen Untersuchungen zweier im weiteren Verlauf verstorbener Patienten, der eine von Weber, der andere von Ramaekers, zeigten typische Merkmale der Progressiven Neuronalen Degeneration des Kindesalters mit begleitender Leberfunktionsstörung (PNDC) (Egger et al., 1987; Harding, 1990; Worle et al., 1998; Harding et al., 1995).

Diese seltene, autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung ist auch unter der Bezeichnung Alpers-Huttenlocher-Syndrom bekannt (Alpers, 1931). Sie manifestiert sich im allgemeinen im Säuglings- oder Kleinkindalter, es ist jedoch auch über Fälle in der Adoleszenz berichtet worden. Klinisch kommt es zu einer Entwicklungsverzögerung und zum Auftreten therapieresistenter epileptischer Anfälle. EEG und Visuell Evozierte Potentiale (VEP) sind abnorm, und in der CT wird eine schnell progrediente zerebrale Atrophie beobachtet, welche besonders den Okzipitallappen und die Basalganglien, hierbei vor allem das Striatum, betrifft.

Der größte Teil der Patienten stirbt innerhalb von drei Jahren nach Krankheitsmanifestation, zumeist an Leberversagen. Nur vereinzelt überleben Patienten bis in die zweite Lebensdekade oder in das frühe Erwachsenenalter hinein.

In pathologischen Untersuchungen fällt bereits makroskopisch eine verminderte und verfärbte Hirnsubstanz auf. Mikroskopisch finden sich Spongiose, neuronaler Untergang und Astrozytose; die Calcarinusregion scheint besonders geschädigt. Die Leber zeigt fettigen und fibrotischen Umbau.

Die Ätiologie des PNDC ist bislang ungeklärt.

1.3 Überblick über den Selenstoffwechsel

1.3.1 Selenaufnahme und Selenumwandlung

Selen wird als organische oder als anorganische Verbindung im Gastrointestinaltrakt resorbiert.

Es sind insbesondere die organischen Formen Selenomethionin und Selenocystein, die in der Nahrung enthalten sind. Das in Pflanzen synthetisierte Selenomethionin kann vom Menschen schnell in unspezifischer Weise anstelle von Methionin in Proteine eingebaut werden, ohne dass

dies nach heutigem Wissensstand deren Funktion verändern würde. Im Plasma ist Selenomethionin deswegen vor allem in Albumin nachweisbar. Seine Konzentration hängt vom jeweiligen Angebot an Selenomethionin ab (Schrauzer, 2000).

Das aus tierischen Quellen stammende Selenocystein kann im Gegensatz dazu nicht unspezifisch in die Proteinsynthese integriert werden. Gleiches gilt für das anorganische Natrium-Selenit und Natrium-Selenat. Diese Formen scheinen ausschließlich spezifischen Stoffwechselfvorgängen zu unterliegen (Burk et al., 2001).

Selenomethionin erhöht zwar scheinbar am effektivsten die Selenkonzentration im Blut, besitzt jedoch als solches keinerlei katalytische Aktivität und muss wie auch nutritives Selenocystein erst zu einer inorganischen Vorstufe abgebaut werden, bevor es zur Selenoproteinbiosynthese verwendet werden kann (Allan et al., 1999).

Selenocystein und Selenomethionin werden durch Lyse, Natrium-Selenit und Natrium-Selenat durch Reduktion in Wasserstoffselenid, H_2Se , umgewandelt. Mit Hilfe der Selenophosphat synthetase 2 (Sps2), welche selbst ein Selenoenzym ist, wird dieses dann phosphoryliert. Das so entstandene Selenophosphat ist die eigentlich aktive Form von Selen; sie dient als Substrat für die Synthese von Selenocystein an dessen spezifischer $tRNA^{[Ser]Sec}$ (Stadtman, 1996; Mizutani et al., 1999).

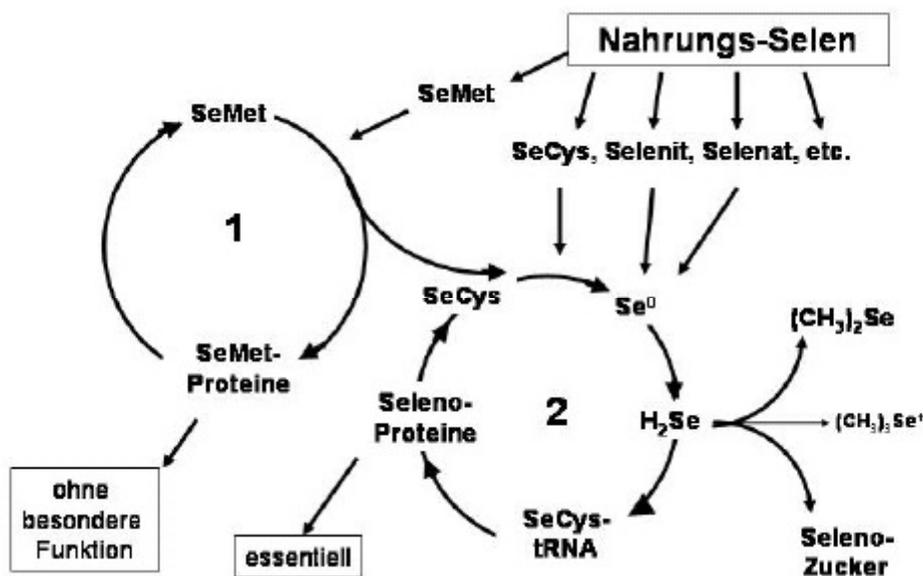


Abb. 2: Schematischer Überblick über Formen der Selenaufnahme, -umwandlung und -ausscheidung

aus Köhrle und Schomburg, 2006

1 Selenomethionin-Zyklus

2 Selenozystein-Zyklus

Ausscheidung von Se über Se-Zucker oder methylierte Selenformen

1.3.2 Selenocystein-β-Lyase

Die Selenocystein-β-Lyase (Scly) katalysiert die Spaltung von L-Selenocystein in L-Alanin und elementares Selen. Deswegen wurde sie als ein Selenlieferant für die Selenoproteinbiosynthese vorgeschlagen (Lacourciere and Stadtman, 1998). Scly ist das erste Enzym gewesen, für das eine Selenspezifität nachgewiesen werden konnte; es hat keinerlei Wirkung auf schwefelhaltige Moleküle (Esaki et al., 1982).

Scly ist ein entfernter Verwandter von NifS, dem Enzym, welches die Desulfurierung von L-Cystein katalysiert und so die Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern unterhält. Allerdings besitzt Scly charakteristische, bei NifS nicht vorhandene Sequenzregionen, und stellt deswegen eine eigene Enzymklasse dar (Mihara et al., 2000).

Im Gegensatz zu NifS, welches vornehmlich in Mitochondrien gefunden wird, ist Scly ein rein zytosolisches Enzym. Es ist ubiquitär, kommt aber besonders in Leber, Niere und Hoden vor, und damit in den Organen, in denen auch die Konzentration an Selenophosphat synthetase (Sps2) hoch ist (Guimaraes et al., 1996).

Bei Eukaryonten existieren zwei SPS-Gene. Sps1 ermöglicht die Wiederverwertung von Selen nach Selenoproteindegradation - beispielsweise über die Selenocystein-β-Lyase -, während Sps2 neuassimiliertes Selen aktiviert (vgl. 1.3.1) (Tamura et al., 2004).

Eine Interaktion von Scly und Sps1 im Rahmen des Selenmetabolismus ist umso wahrscheinlicher, da hohe Konzentrationen freien Selenocysteins toxisch und seine Akkumulation tödlich ist (Combs, Jr. and Combs, 1984), sodass der Abbau von überschüssigem Selenocystein notwendig erscheint. Scly hätte unter diesen Umständen die Aufgabe, eine physiologische Selenocystein-Konzentration sicherzustellen, indem es Sec aufnimmt und an Sps1 zur Neusynthese von Selenoproteinen weiterreicht.

1.3.3 Selenocystein-Elongationsfaktor

Bei *E. coli* wurde der Elongationsfaktor für Selenocystein von Forchhammer et al. anhand von Mutanten genetisch identifiziert und SelB genannt. SelB identifiziert das SECIS-Element in der mRNA prokaryontischer Selenoproteine, bindet daran und führt die beladene Sec-tRNA^{Sec} zu Ribosomen (Forchhammer et al., 1989). Dieser Vorgang ist viel weniger effizient als es bei dem für die übrigen natürlichen Aminosäuren zuständigen Elongationsfaktor der Fall ist, was vor

allem durch eine hohen Rate an Kettenabbrüchen begründet werden kann (Suppmann et al., 1999).

Ähnlich gering ist auch die Effizienz der Sec-Inkorporation bei Säugern. Dort beträgt sie 1-3 % der Inkorporation anderer Aminosäuren (Berry et al., 1992; Kollmus et al., 1996). Allerdings muss betont werden, dass sich diese Daten auf in-vitro-Experimente stützen und zumindest für SePP, welches bis zu zehn Sec-Moleküle enthalten kann, zusätzliche Mechanismen zur Unterdrückung eines Kettenabbruchs in Betracht gezogen werden müssen. Die Synthese von Full-length-SePP wäre kaum erklärbar, würde an jedem einzelnen UGA die Sec-Inkorporation mit einer unabhängigen Effizienzrate von 1-3 % erfolgen.

Das SelB entsprechende Protein bei Säugern, EFsec, bindet zwar ebenfalls spezifisch an Sec-tRNA^{Sec}, jedoch nicht an das SECIS-Element (Fagegaltier et al., 2000; Tujebajeva et al., 2000) (vgl. Abb. 2). Tatsächlich werden die Aufgaben des bakteriellen Elongationsfaktors SelB bei Säugern von bis zu drei Akteuren erfüllt: EFsec, SBP2 und RPL30. SBP2 und RPL30 übernehmen im derzeit diskutierten Modell die Rolle der SECIS-Bindung und eines anschließenden präzisen Zusammenspiels mit EFsec, der tRNA und dem Ribosom in kinetisch genau definierter Ordnung (Chavatte et al., 2005).

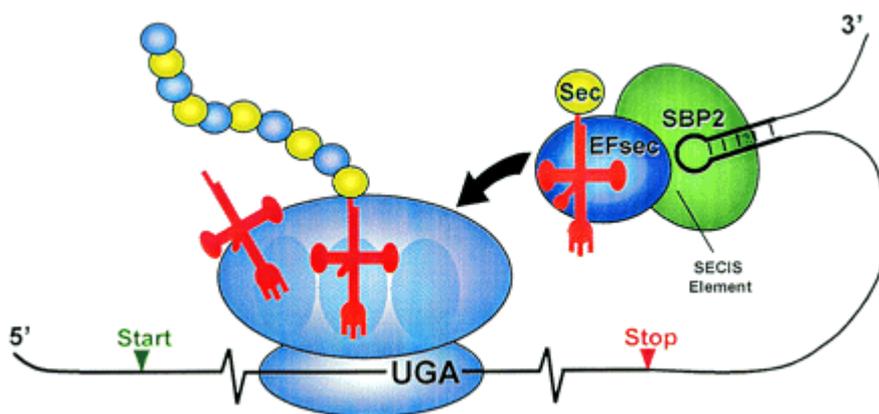


Abb. 3: Illustration der Interaktion von EFsec und SBP2 bei der Selenoproteinsynthese
aus Hatfield und Gladyshev, 2002

Auf die möglichen Interaktionen innerhalb dieses Proteinkomplexes wird weiter unten genauer eingegangen (vgl. 1.3.5).

1.3.4 SECIS Binding Protein

Das SECIS Binding Protein (SBP2) bindet spezifisch an die mRNA von Selenoproteinen (Copeland et al., 2000). Die Bindungsstelle dafür liegt im SECIS-Element und zeigt 75 % Übereinstimmung mit einem bei zahlreichen ribosomalen Proteinen gefundenen RNA-Bindungsmotiv, welches für die Unterdrückung eines Kettenabbruchs in der Peptidsynthese verantwortlich sein soll (Koonin et al., 1994).

Die für die SECIS-Bindung und die Sec-Insertion verantwortlichen Regionen von SBP2 liegen im C-Terminus des Proteins, während dem N-Terminus bislang keine Aufgabe zugewiesen werden konnte; er zeigt auch keinerlei Ähnlichkeit mit irgendeinem Protein bekannter Funktion. Ein Teil seiner Sequenz wurde allerdings als nukleäre Import-Signalsequenz vorgeschlagen (Copeland et al., 2000). Es existiert deswegen die Hypothese, dass der Übergang vom Zytoplasma in den Zellkern eine Art Regulationsmechanismus für SBP2 darstellt (Mehta et al., 2004), da das Protein so von seinen zytoplasmatischen Bindungspartnern - Ribosomen und SECIS-Elementen - getrennt werden würde. Auch eine frühe Assoziation von SBP2 mit SECIS-Elementen, vor deren Export aus dem Kern ins Zytoplasma, ist denkbar.

Es wurden drei Transkriptionsprodukte für SBP2 gefunden; sie unterscheiden sich durch ihre Länge. Für die beiden längeren, selteneren Varianten der SBP2-mRNA wurde eine regulatorische Funktion vorgeschlagen (Copeland et al., 2000).

Es ist die kürzere mRNA-Form, die das funktionelle SBP2-Protein kodiert. Sie wurde bisher nur im Hoden nachgewiesen, dort allerdings in großen Mengen - dem ebenfalls große Mengen an SBP2-Protein in diesem Gewebe entsprechen. Solche Ergebnisse korrelieren mit der in Hoden beobachteten hohen Konzentration an PHGPx-mRNA.

Tatsächlich scheint SBP2 eine besondere Affinität zur mRNA von PHGPx, ebenso wie zu derjenigen von Selenoprotein P zu besitzen. Im Falle eines Überangebots an Selenoprotein-mRNA wechselt SBP2 seine Position nicht, oder nur sehr langsam, zwischen den einzelnen mRNA-Molekülen. Stattdessen bleibt es an eines davon gebunden - vorzugsweise an einer mRNA eines ebendieser beiden Proteine (Low et al., 2000). Im Gegensatz dazu wird in solchen Fällen des mRNA-Überangebots GPx- oder auch Deiodase Typ I-mRNA seltener von SBP2 besetzt und in der Folge rascher abgebaut (sog. Nonsense mediated decay, NMD). Eine durch SBP2 vermittelte SECIS-spezifische Hierarchie in der Selenoproteinsynthese und NMD-Affinität ist deswegen gut vorstellbar.

Die Selenocystein-Inkorporation in eine Peptidkette ist also im Vergleich zu der anderer natürlicher Aminosäuren ein relativ ineffizienter Prozess, welcher vom regulierten

Zusammenspiel von zumindest vier Faktoren abhängt: Sec-tRNA^{Sec}-Synthese, Bindung von SBP2 an das SECIS-Element, Interaktion zwischen SBP2 und EFsec sowie Konkurrenz mit einem Kettenabbruch.

1.3.5 RPL30

RPL30 ist ein 14,5 kDa großes, bereits seit längerer Zeit als Bestandteil von Ribosomen bekanntes Protein, dessen genaue Funktion bisher unklar ist. Es gehört zur selben Familie ribosomaler Proteine wie auch SBP2 – L7Ae –, stimmt jedoch lediglich in 20 % seiner Sequenz mit derjenigen von SBP2 überein. RPL30 ist ein eukaryontisches Protein, das keine Entsprechung bei Bakterien besitzt.

Kürzlich wurde seine Rolle im Dekodierungsmechanismus von Selenocystein erkannt (Chavatte et al., 2005). Wie SBP2 kann auch RPL30 an das SECIS-Element binden. Die Bindungsstelle liegt dabei ebenfalls im Kernstück von SECIS und ist zumindest teilweise mit derjenigen für SBP2 identisch.

Ein von Chavatte et al. entwickeltes Modell schlägt vor, dass SBP2, dank seiner hohen Affinität und Spezifität für SECIS daran bindet und anschließend EFsec und die Sec-tRNA^{Sec} mobilisiert. Nachdem dieser Komplex mit dem Ribosomen assoziiert, würde SBP2 durch RPL30 am SECIS ersetzt werden. Die eigentliche Aufgabe von RPL30, laut diesem Modell, wäre eine Konformationsänderung im SECIS-Element, die EFsec signalisiert, GTP zu hydrolysieren und die Sec-tRNA^{Sec} an das Ribosom zu setzen (Chavatte et al., 2005).

In Anwesenheit von Magnesium ist die SBP2-SECIS-Interaktion zugunsten der RPL30-SECIS-Interaktion herabgesetzt. Da Magnesium dafür bekannt ist, einen sogenannten Kink turn („Knick“) in RNA-Molekülen mit zwei Tandem-G • A-Paaren, zu welchen auch das SECIS-Element gezählt wird, zu induzieren (Goody et al., 2004; Matsumura et al., 2003), liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei der erwähnten Konformationsänderung um einen solchen Kink turn handelt, der die Affinität des SECIS-Elements zu RPL30 erhöht. Auf diese Weise würde der Austausch von SBP2 durch RPL30 begünstigt werden.

Eine solche, genaue Abstimmung der Interaktion einzelner Komponenten der Selenocysteinsynthese untereinander wäre ausschlaggebend für die Effizienz der Selenocysteininsertion.

1.3.6 Selenoprotein P

Selenoprotein P (SePP) ist das zweite Selenoprotein gewesen, das bei Säugern als solches identifiziert wurde (41) (Herrmann, 1977). Es macht hier rund die Hälfte des Plasma-Selengehaltes aus (Read et al., 1990; Saito and Takahashi, 2002). SePP ist sowohl im Hinblick auf seine physikalischen, als auch bezüglich seiner metabolischen Eigenschaften ein außergewöhnliches Selenoprotein.

Im Gegensatz zu allen anderen Selenoproteinen besitzt die mRNA von SePP nicht nur eines, sondern zwei SECIS-Elemente im 3'UTR. Das fertige Protein enthält bei Säugern bis zu zehn Selenocystein-Moleküle (Read et al., 1990).

Es sind vier Isoformen von SePP bei Ratten identifiziert worden (Ma et al., 2003), welche alle auf der Basis derselben mRNA synthetisiert werden. Inwiefern und nach welchem Mechanismus die einzelne Zelle in Abhängigkeit von ihren Bedürfnissen entscheiden kann, welche dieser Isoformen produziert wird, konnte allerdings noch nicht ergründet werden. Bei Mensch und Maus wurden keine Isoformen gefunden.

Wie die meisten anderen Selenoenzyme scheint auch SePP zumindest zum Teil Redox-Funktionen zu erfüllen, da seine Primärstruktur zahlreiche potentielle Redox-Zentren, in Form von Cystein und Selenocystein-Resten enthält und SePP eine gewisse PHGPx-Aktivität besitzt (Saito et al., 1999).

Darüber hinaus ist SePP in der Lage pH-abhängig - in saurem Milieu - Heparin zu binden (Chittum et al., 1996), was zu der Annahme geführt hat, dass dies vermehrt in Entzündungsherden passieren könnte. Auch das würde für eine, unter anderem, antioxydative Rolle sprechen.

SePP wurde im Extrazellulärraum und an Endothelzellen gebunden nachgewiesen (Burk and Hill, 1994; Hondal et al., 2001; Burk et al., 1997). Seine Plasmakonzentration beträgt 5-6 mg pro Liter beim Menschen (Xia et al., 2005).

SePP-mRNA ist ubiquitär (Dreher et al., 1997); doch es ist die Leber, die die Quelle von 75 % des Plasmaproteins zu sein scheint (Carlson et al., 2004). Schweizer et al. zeigten außerdem, dass der Selengehalt in Plasma und Nieren sowie die renale GPx-Aktivität bei leberspezifischen tRNA^{[Ser]^{Sec}}-Knockout-Mäusen ebenso stark reduziert sind wie dies bei SEPP-Knockout-Mäusen der Fall ist (Schweizer et al., 2005).

Da allerdings kürzlich nachgewiesen wurde, dass - entgegen früherer Annahmen - die hepatische Dio1 nicht unabdinglich für eine euthyreote Stoffwechsellage der Maus ist (Streckfuss et al., 2005), sollten auch bisherige Ergebnisse zur Rolle des hepatischen SePP mit Vorsicht

interpretiert und weitere mögliche, beispielsweise lokale Regulationsmechanismen nicht unterschätzt werden.

Auch in Herz und Nieren ist die Konzentration an SEPP-mRNA hoch, während die Proteinexpression in Lunge, Gehirn, Skelettmuskel und Hoden vergleichsweise gering ist.

Im Darm resorbiertes Selen gelangt über das Blut der Portalvene zur Leber; ein Teil davon wird dann als SePP in den Kreislauf abgegeben. Seine Plasmahalbwertszeit beträgt drei bis vier Stunden. Eine Anreicherung von SePP findet besonders in Hoden und Gehirn statt (Burk et al., 1991). Unter Selenmangelbedingungen wird eine Hochregulierung der Selenaufnahme ins Gehirn beobachtet (Burk et al., 1972), sodass ein SePP-Rezeptor in Gehirn und Niere vermutet wird, dessen Aktivität vom jeweiligen Selenstatus abhängt. Die Tatsache, dass auch unter Selenmangel immerhin 5-10 % der SePP-Aktivität erhalten bleibt, lässt den Schluss zu, dass auch unter Mangelbedingungen eine beachtliche Menge an Selen in die SePP-Synthese fließt (Yang et al., 1989).

Nach experimenteller Deletion von SEPP (SEPP-KO-Mäuse) wurden eine deutliche Abnahme der SePP-Proteinkonzentration in Gehirn und Hoden, eine Zunahme oder keine Veränderung in der Leber und leichte Abnahmen in den Nieren und anderen Organen festgestellt (Hill et al., 2003; Schomburg et al., 2003). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass SePP eine direkte Funktion in der Selenversorgung von Gehirn, Nieren und Hoden erfüllt. Weitere Untersuchungen zeigten, dass niedrige Selenkonzentrationen im Gehirn bei SePP-KO-Mäusen zu irreversiblen neurologischen Schäden führen (Hill et al., 2004). Es wurde aber ebenfalls deutlich gemacht, dass das Gehirn in der Lage ist, Selen auch unter anderer Form aufzunehmen, da trotz SEPP-Deletion ein solcher Schaden verhindert werden kann, wenn die Aufnahme großer Mengen an Selen über die Nahrung sichergestellt ist (Hill et al., 2003; Hill et al., 2004; Schweizer et al., 2004a).

Mutationen im SePP-Gen oder in einem putativen SePP-Rezeptor würden demzufolge die Versorgung des Gehirns mit Selen insbesondere dann gefährden, wenn eine ausreichende Selenversorgung des Organismus nicht gewährleistet ist.

1.4 Hypothese und Zielsetzung

Die Klinik der in 1.2 beschriebenen Kinder einerseits und die geschilderten Beobachtungen bei SEPP-KO-Mäusen andererseits (Schomburg et al., 2003) (vgl. 1.3.6) führten zu unserer Hypothese, eine Mutation in SEPP oder im Biosyntheseweg für Selenoproteine könne für die neurologischen Ausfälle dieser Patienten verantwortlich sein. Ein in diesem Fall betroffenes Protein müsste nicht vollständig ausgefallen sein; eine partielle Funktionseinschränkung würde genügen, um die Synthese oder die Aktivität eines oder mehrerer Selenoproteine zu beeinträchtigen. Die bei den Patienten beobachteten niedrigen Spiegel an Plasmaselen bzw. GPx wären auf diese Weise erklärbar ebenso das Ansprechen auf Selensupplementation.

So könnte eine Veränderung in EFSEC, SBP2 oder RPL30 zu einer fehlerhaften oder verminderten Synthese von Selenoproteinen, also auch von SePP führen. Dies, sowie eine Mutation in SEPP selbst, würde sich möglicherweise auf den Selentransport im Blut und die Selenversorgung unter anderem des Gehirns auswirken. Da dieses Organ jedoch offensichtlich in der Lage ist, seinen Selenbedarf auch unabhängig von SePP zu decken, vorausgesetzt ein ausreichendes Selenangebot steht dem Organismus zur Verfügung (vgl. 1.3.6), wäre eine Besserung der klinischen Symptomatik unter Selensubstitution zu erwarten – wie sie ja auch tatsächlich bei den geschilderten Patienten zu beobachten war.

Ein Fehler in der Funktion der Selenocystein- β -Lyase würde die in 1.3.7 beschriebenen Mechanismen zur Wiederverwertung von Selen unterbrechen und damit ebenfalls zu Selenmangelerscheinungen führen, die durch Selensubstitution reduzierbar wären.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die für die Selenoproteinbiosynthese essentiellen Gene bei betroffenen Kindern durch Sequenzanalyse auf Veränderungen hin zu prüfen. Dabei wurde die Sequenzanalyse auf die für Proteine kodierenden Abschnitte und die Exon-Intron-Grenzen eingeschränkt, bei SePP einschließlich der 3'-UTR.