

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

DISSERTATION

Zur pathophysiologischen Bedeutung des  
Selen-bindenden Proteins SELENBP1 im Blut

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Eike Christian Kühn

aus Frankfurt am Main

Datum der Promotion: 03.12.2021

# Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....	3
Abstract (Deutsch).....	4
Abstract (English).....	5
Abkürzungen.....	6
1. Einführung.....	7
2. Zielstellung.....	8
3. Material und Methodik.....	9
3.1. Patientenrekrutierung, Gewinnung und Verarbeitung der Proben.....	9
3.2. Bestimmung der GPX-Aktivität, Selen- und Selenoprotein P-Konzentration aus dem Serum.....	9
3.3. Herstellung von rekombinantem SELENBP1 und Entwicklung monoklonaler Antikörper.....	10
3.4. Aufbau eines Light-emitting Immunosorbent Assays (LIA) zur Quantifizierung von SELENBP1.....	10
3.5. Probenmatrix, Probenstabilität, Funktionale Assaysensitivität und Variabilität....	11
3.6. Statistik.....	11
4. Resultate.....	13
4.1. Patientenkollektive.....	13
4.2. GPX-Aktivität, Serum-Selen- und Selenoprotein P-Konzentration.....	13
4.3. Entwicklung des SELENBP1-LIA.....	14
4.4. Probenstabilität.....	15
4.5. Serum-SELENBP1-Konzentration unter physiologischen Bedingungen.....	15
4.6. SELENBP1 im Blut bei akutem Brustschmerz.....	16
4.7. SELENBP1 in der Kardiochirurgie.....	17
5. Diskussion.....	19
6. Literaturverzeichnis.....	23
Eidesstattliche Versicherung.....	32
Ausführliche Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen.....	33
Ausgewählte Publikationen.....	35
Lebenslauf.....	63
Publikationsliste.....	64
Danksagungen.....	65

## **Vorwort**

Das übergeordnete Ziel dieser Forschungsarbeit war es, die Rolle des Selen-bindenden Protein 1 (Selenium-binding Protein 1, SELENBP1) im Kontext systemischer Inflammation zu beleuchten, eventuelle Interaktionen mit Selenoproteinen und dem Selenstatus eines Individuums aufzudecken und eine potentielle klinische Relevanz als Biomarker zu prüfen.

In diesem Rahmen wurde zunächst die Analyse klinischer Studien bezüglich des Selenstatus optimiert und in Kooperation mit einer italienischen Arbeitsgruppe die Bedeutung einer Selensupplementation bei Thyreoiditis erforscht [1].

Orientierende Pilotversuche deuteten an, dass Hypoxie bzw. Ischämie mit dem Vorkommen von SELENBP1 im Serum korrelieren könnte. Um diese Hypothese anhand klinischer Proben zu testen, wurden Patientinnen und Patienten mit Verdacht auf Myokardinfarkt und im Rahmen von Herzoperationen analysiert. Diese Studien unterstrichen, dass sich SELENBP1 in der Tat als klinischer Marker für (Myokard-)Ischämie eignen könnte [2, 3].

## Abstract (Deutsch)

**Einführung:** Selen (Se) ist ein essentielles Spurenelement. Im Menschen findet es sich in anorganischer Form oder als Teil von Aminosäuren in Selenoproteinen gebunden sowie in Verbindung mit Selen-bindenden Proteinen, von denen im Menschen das Selen-bindende Protein 1 (SELENBP1) der prominenteste Vertreter ist. Der Metabolismus von Se und die Biosynthese von Selenoproteinen werden in Reaktion auf Hypoxie oder systemische Inflammation intensiv reguliert. Über die Expression und Bedeutung von SELENBP1 ist wenig bekannt. Da eine Stimulation von Hypoxie-regulierten Signalwegen über HIF-1 $\alpha$  zur vermehrten Expression von SELENBP1 führen kann, wurde die Hypothese aufgestellt, dass SELENBP1 im Menschen ein Biomarker von Ischämie sein könnte.

**Material und Methodik:** Rekombinantes, humanes SELENBP1 wurde exprimiert, gereinigt, und Maus-Antikörper wurden gegen SELENBP1 generiert. Auf der Basis eines Paares monoklonaler Antikörper wurde dann ein immunologisches Nachweisverfahren (light-emitting immunosorbent assay, LIA) aufgebaut und charakterisiert. Blutproben einer gesunden Kontrollkohorte (n = 37), serielle Blutentnahmen von Patientinnen und Patienten (n = 85), die aufgrund von Brustschmerzen in der Rettungsstelle behandelt wurden, sowie prä-, intra- und postoperative Blutentnahmen von Patientinnen und Patienten mit kardiochirurgischem Eingriff (n = 75) unter Einsatz von Kardioplegie und Herz-Lungen-Maschine wurden aufbereitet und mit dem neuen SELENBP1-Assay vermessen.

**Ergebnisse:** Ein stabiler und sensitiver Assay zur Quantifizierung von SELENBP1 im Blut wurde aufgebaut. Hiermit konnte gezeigt werden, dass unter physiologischen Bedingungen sehr niedrige SELENBP1-Konzentrationen im Blut zirkulieren. Bei Patientinnen und Patienten mit Brustschmerz zeigten sich erhöhte Konzentrationen mit dynamischen Verläufen, die ebenso bei Patientinnen und Patienten mit myokardialer Ischämie unter Kardioplegie beobachtet werden konnten. Die Höhe der SELENBP1-Konzentration intraoperativ korrelierte hierbei signifikant mit der Dauer der Ischämie und war prädiktiv für die CK-Mb-Konzentration nach dem Eingriff, als etablierter Marker für myokardiale Schädigung. In beiden Kohorten konnten aussagekräftige Grenzwerte zur Risikostratifizierung etabliert werden. Die Odds-Ratio für eine schwere kardiale Komplikation inklusive Tod liegt für Patientinnen und Patienten mit Brustschmerzen ab einer SELENBP1-Konzentration von 0,8 nmol / l bei 11. Bei herzchirurgischen Patientinnen und Patienten betrug die Odds-Ratio 30 für das Auftreten einer zerebralen Ischämie, Bradykardie oder Tod ab einer postoperativen SELENBP1-Konzentration von 0,96 nmol / l.

**Schlussfolgerung:** SELENBP1 ist unter physiologischen Bedingungen im Blut messbar und die Konzentrationen steigen in Reaktion auf einen pathologischen Stimulus bei Patientinnen und Patienten mit Brustschmerzen oder in der Kardiochirurgie deutlich an. Die Höhe und Dynamik dieses Anstiegs erlauben schon frühzeitig eine relativ sichere Voraussage über den weiteren Verlauf der Rekonvaleszenz bzw. das Mortalitätsrisiko.

## Abstract (English)

**Introduction:** Selenium (Se) is an essential trace element. In humans it can be found in inorganic compounds, bound in amino acids in selenoproteins or associated with selenium-binding proteins, of which only SELENBP1 can be found in humans. Selenium and selenoproteins are down-regulated in response to hypoxia and systemic inflammation. Little is known about the regulation and role of SELENBP1 in humans. Stimulation of HIF-1 $\alpha$  leads to an increased expression of SELENBP1. Consequently we investigated the role of SELENBP1 in humans in ischemia.

**Materials and Methods:** Recombinant human SELENBP1 was expressed, purified and used to generate monoclonal antibodies in mice. Using two of these monoclonal antibodies, a light-emitting immunosorbent assay (LIA) for SELENBP1 quantification was established. Serum samples from healthy controls (n = 37), from serial blood draws from patients admitted to the emergency unit for acute chest pain (n = 85) as well as from pre-, intra- and post-operative blood draws from patients undergoing cardiac surgery requiring cardioplegia and cardiopulmonary bypass (n = 75) were prepared and measured using the new LIA for SELENBP1.

**Results:** A robust, sensitive and stable assay for the quantification of SELENBP1 in human serum was successfully established. Using this novel tool, it was demonstrated that very low concentrations of SELENBP1 circulate under physiological conditions in serum of healthy human subjects. Patients with chest pain exhibited elevated as well as dynamic concentrations of serum SELENBP1. Similarly elevated and dynamic SELENBP1 levels were also observed in patients with myocardial ischemia due to cardioplegia. Intra-operative concentrations correlated with the length of ischemia and were predictive of CK-Mb concentrations as an established biomarker for myocardial damage measured post-operatively. The data obtained in both studies enabled the deduction of sensible cut-off values for risk stratification. Patients reporting with chest pain had 11-fold increased odds for major adverse cardiac events including death if SELENBP1 concentrations at first medical contact exceeded 0.8 nmol / l. Patients undergoing cardiac surgery had 30-fold increased odds for cerebral ischemia, bradycardia or death if SELENBP1 concentrations at 1 hour after admittance to the ICU exceeded 0.96 nmol / l.

**Conclusion:** Circulating SELENBP1 can be measured in human blood of healthy subjects, and concentrations are elevated in response to a pathological stimulus in patients with chest pain or undergoing cardiac surgery. The maximal concentrations and the dynamics of the increase in serum SELENBP1 allow already at an early time-point a reliable prediction for recovery or potential death.

## Abkürzungen

ACS	Akutes Koronarsyndrom (acute coronary syndrome)
AUC	Fläche unter der Kurve (area under the curve)
CK-Mb	MB-Isoform der Kreatinkinase (Creatinkinase myocardial band)
CPB	Herz-Lungen-Maschine (cardiopulmonary bypass)
CPU	chest pain unit
CV	Variationskoeffizient (coefficient of variation)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GPX	Glutathionperoxidase
ICU	Intensivstation (intensive care unit)
IQR	Quartilsabstand (interquartile range)
LIA	light-emitting immunosorbent assay
MACE	major adverse cardiac event
MTO	Methanethioloxidase
NPV	negativer Vorhersagewert (negative predictive value)
NSTEMI	nicht-ST-Hebungsinfarkt (non-ST-elevation myocardial infarction)
OR	Odds-Ratio
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
RLU	relative Lichteinheiten (relative light units)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
ROC	receiver operating characteristic
rhSELENBP1	rekombinantes humanes Selen-bindendes Protein 1
SD	Standardabweichung
Se	Selen
SELENBP1	Selen-bindendes Protein 1 (selenium-binding protein 1)
SELENOP	Selenoprotein P
SOT	Zeit seit Beginn der Symptome (symptom onset time)
STEMI	ST-Hebungsinfarkt (ST-elevation myocardial infarction)
UAP	instabile Angina pectoris (unstable angina pectoris)

# 1. Einführung

Die Analyse eines rötlichen Schlammes aus einer ehemaligen Alkoholdestille in Grispholm, Schweden, dessen aufgereinigtes gräuliches Überbleibsel unter Freisetzung eines beißenden Meerrettichgeruchs verbrannte, führte 1817 zur Entdeckung und Erstbeschreibung eines neuen Elements. Dieses wurde von seinem Entdecker Jöns Jacob Berzelius wegen seiner Ähnlichkeit zu Tellurium (abgeleitet von dem Lateinischen *tellus*, Erde), für welches er es anfangs hielt, als „Selenium“ (abgeleitet aus dem Griechischen *Σελήνη*, Mond) benannt [4]. 1958 wurde Se als ein essentielles Spurenelement beschrieben [5]. Im Blut des Menschen kommt es in anionischer Form (Selenit und Selenat), in Verbindung mit Proteinen und Aminosäuren oder als Metabolit vor.

Den größten Teil stellen dabei die Selenoproteine Selenoprotein P (SELENOP) [6], als Transportprotein für Selen, und Glutathionperoxidase 3 (GPX3), als einzige extrazelluläre GPX, dar. Selenoproteine inkorporieren Se in Form der modifizierten Aminosäuren Selenocystein oder Selenomethionin, abgeleitet von Cystein und Methionin. Bekannteste Vertreter der Selenoproteine sind die Glutathionperoxidasen (GPX), über die Se einen Einfluss auf den Redox-Haushalt der Zellen ausübt [7].

Die zweite Proteinfamilie mit Assoziation zu Se umfasst die weniger gut charakterisierten Selen-bindenden Proteine, deren prominentester humaner Vertreter das Selen-bindende Protein 1 (Selenium-binding Protein 1, SELENBP1) ist. Dieses besitzt kein über eine Aminosäure eingebautes, kovalent gebundenes Se, sondern kann Se bei neutralem pH über eine Cysteingruppe binden [8]. Ein Vorkommen von SELENBP1 wurde in den meisten Organen und Organsystemen beschrieben, unter anderem dem Auge [9], dem Verdauungstrakt [10-20], dem Herzen [10], der Lunge [10, 11, 13, 21], der Leber [8, 10, 13, 22] und den Gallenwegen [13], der Niere [10, 13, 23, 24], der Milz [10], dem Fettgewebe [25, 26], der Brust [13, 27], den Eierstöcken [20, 28], dem Uterus [23, 29] und der Prostata [13, 30] (Zusammenstellung übernommen aus [31] und ergänzt). Pol et al. konnten demonstrieren, dass SELENBP1 eine enzymatische Aktivität als Methanethioloxidase (MTO) aufweist und damit ebenso in den Redox-Haushalt der Zelle involviert ist [32]. Eine Interaktion mit der intrazellulären GPX1 und gegenseitige Beeinflussung der Transkription ist beschrieben [33]; Art und Ergebnis der Interaktion bleiben aber bis heute ungeklärt.

Zur pathophysiologischen Bedeutung wurde gezeigt, dass erniedrigte SELENBP1-Konzentrationen in maligne entartetem Gewebe mit geringerem Überleben assoziiert sind [13, 14, 18, 21, 22, 26, 34] (ebenso aus [31]). Als Erklärung hierfür vermuten Huang et al., dass SELENBP1 als Target-Gen von HIF-1 $\alpha$  [35] intrazellulär unter Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) hochreguliert wird und dann GPX1, welche der Tumorzelle schadende ROS abbaut, inhibiert [22]. Hierdurch würde es tumorwachstumsfördernd wirken können.

Im Gegensatz dazu wird das Selentransportprotein SELENOP unter Hypoxie [36] sowie unter systemischer Inflammation im Serum herunterreguliert [37], und in kritisch kranken Patientinnen und Patienten wurde ein reduzierter Selenstatus beschrieben [38-40].

## 2. Zielstellung

Eine pathologische Überexpression von SELENBP1, das bislang ausschließlich als intrazelluläres Protein beschrieben wurde, könnte sich auch im Blut widerspiegeln und einen geeigneten Biomarker für Tumorwachstum, Hypoxie oder Ischämie darstellen. Um diese Hypothese experimentell zu prüfen, wurden Patientinnen und Patienten untersucht, welche aufgrund eines akuten Brustschmerzes und somit vermuteter kardialer Ischämie in der Rettungsstelle zur Behandlung aufgenommen wurden [2] bzw. einen elektiven kardiochirurgischen Eingriff unter Einsatz von Kardioplegie und Herz-Lungen-Maschine als kontrolliertes „Modell“ für eine kardiale Ischämie erhielten [3].



### **3. Material und Methodik**

#### **3.1. Patientenrekrutierung, Gewinnung und Verarbeitung der Proben**

Serumproben wurden durch die Arbeitsgruppen um Herrn Prof. Pacini [1], Herrn Prof. Möckel [2] und Herrn Prof. Stoppe [3] sowie durch unsere Arbeitsgruppe [41] (nicht Eigenleistung des Autors) wie dort beschrieben nach positiver Beratung durch die jeweilige Ethikkommission und Einholung eines informierten Konsents jeder Probandin und jedes Probanden gesammelt und aufbereitet.

Die von Frau Dr. Pilli et al. asservierten Proben stammten von Patientinnen mit Autoimmunthyreoiditis vor sowie 6 und 12 Monate nach Beginn einer Supplementation mit Selenomethionin [1].

Herr Prof. Möckel et al. rekrutierten Patientinnen und Patienten mit Brustschmerz und nahmen bei erstem medizinischen Kontakt, i.e., ggf. präklinisch im Rettungsmittel, bei Eintreffen in der Rettungsstelle sowie nach 2, 4, 6 und 12 - 36 Stunden Blut ab [2].

Herr Prof. Stoppe et al. sammelten Serumproben vor einem elektiven, kardiochirurgischen Eingriff („pre-op“), 45 Minuten nach Einleitung der Ischämie, 2 Minuten nach Reperfusion, 15 Minuten nach Beendigung der Herz-Lungen-Maschine (cardiopulmonary bypass, CPB) sowie 1, 6 und 24 Stunden nach Aufnahme auf die Intensivstation (Intensiv Care Unit, ICU) [3].

Unsere Arbeitsgruppe asservierte Proben bei Rekrutierung von Individuen aus einer Normalpopulation [41], zu der ebenfalls eine schriftliche Einwilligung jedes Probanden und ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin vorlag.

Proben wurden bei - 80 °C gelagert und Verarbeitungszeiten bei Raumtemperaturen möglichst kurz gehalten. Die Proben wurden verblindet gemessen, i.e., die Messenden hatten zum Zeitpunkt der Messung keinen Zugriff auf klinische Daten.

#### **3.2. Bestimmung der GPX-Aktivität, Selen- und Selenoprotein P-Konzentration aus dem Serum**

Die Bestimmung der Serum-GPX-Aktivität erfolgte mittels photometrischer Messung des NADPH-Verbrauchs bei 340 nm, wie bereits publiziert [42].

Die Serum-Selenkonzentration wurde mittels Reflektions-Röntgen-Fluoreszenzspektroskopie vorgenommen (total reflection X-ray fluorescence spectroscopy, TXRF; S2 PICOFOX, Bruker Nano GmbH, Berlin, Deutschland). Als interner Standard wurde eine Galliumlösung verwendet und jeder Probe zugesetzt.

Die Selenoprotein P-Konzentration wurde mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) gemessen [43].

### **3.3. Herstellung von rekombinantem SELENBP1 und Entwicklung monoklonaler Antikörper**

Unsere Arbeitsgruppe synthetisierte mittels baculovirusinfizierter Insektenzellen ein rekombinantes humanes SELENBP1 (rhSELENBP1). Gegen dieses Protein wurden durch einen kommerziellen Anbieter (UNICUS Karlsburg OHG, Greifwald, Deutschland) monoklonale Antikörper generiert und chromatographisch aufgereinigt (InVivo Biotech Services, Hennigsdorf, Berlin, Deutschland). Die in diesem Absatz beschriebenen Schritte wurden nicht durch den Autor durchgeführt und sind in ausführlicherer Form publiziert [2].

### **3.4. Aufbau eines Light-emitting Immunosorbent Assays (LIA) zur Quantifizierung von SELENBP1**

Aus oben beschriebenen Antikörpern wurden zwei passende monoklonale Antikörper (monoclonal antibodies, mAb; im Weiteren anti-SELENBP1-mAb1 und -mAb2 genannt) ausgewählt und damit ein nicht-kompetitiver Immunoassay (two-site non-competitive immunoassay; „sandwich assay“) aufgebaut. Hierzu wurde ein Antikörper (anti-SELENBP1-mAb1) auf der Oberfläche von Polypropylenteströhrchen immobilisiert. Nach 24-stündiger Inkubation wurden nicht gebundene Antikörper abgewaschen. Es folgte die Inkubation mit einer verdünnten Probe für weitere 24 Stunden und Abwaschen von nicht gebundenem Probenmaterial. Danach erfolgte die Inkubation mit einem mit Acridiniumester (MACN) markierten, zweiten Antikörper (anti-SELENBP1-mAb2) sowie anschließendem Abwaschen ungebundener Antikörper. Die Messung erfolgte mittels Kettenluminometer.

Bei schlechter Signal-Noise-Ratio wurde der MACN-Antikörper-Lösung noch Milchpulver zur Absättigung überschüssiger, unspezifischer Bindungsstellen hinzugegeben.

Zur Inkubation mit den Antikörpern sowie zur Probenverdünnung wurde initial ein TRIS-basiertes Puffersystem verwendet. Nach temperaturbedingten Problemen der Teststabilität wurden alle verwendeten Lösungen auf ein Phosphat-basiertes Puffersystem umgestellt.

Um den Probendurchsatz zu erhöhen, wurde im Verlauf auf ein 96-Kammer-Polypropylenplattensystem (Microplatten) umgestellt.

In mehreren Schritten konnte die eingesetzte Menge an Probenmaterial auf zuletzt 30 µl pro Doppelbestimmung gesenkt werden. Inkubationszeiten wurden von initial 24 Stunden zwischen jedem Schritt auf 12 Stunden für die Immobilisation des Antikörpers und 1 Stunde Inkubation zwischen jedem weiteren Schritt reduziert.

In der finalen Testkonfiguration, wie publiziert in [2], wird phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS) mit 0,05 mol / l  $K_2HPO_4$ , 0,1 mol / l NaCl und einem pH von 6,5 als Basis verwendet. Zur Immobilisation des Antikörpers (Coating) wurden weiße Microplatten mit hoher Proteinbindungskapazität und flachem Boden (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) mit 2,1 µg / ml anti-SELENBP1-mAb1 in 100 µl PBS pro Kammer bei +4 °C für 12 Stunden inkubiert. Zur Validierung eines Testlaufes sowie zur Standardisierung mehrerer Testläufe mittels Eichkurve wurden Standardlösungen mit definierten Konzentrationen von rhSELENBP1 (0,3 bis 38,2 nmol / l)

in 1 mmol / l bovinem Serum-Albumin und PBS hergestellt und in jedem Testlauf mitgeführt. Im nächsten Schritt wurden die Platten viermal mit 1 % (Volumen / Volumen, volume / volume, v / v) Triton X-100 in PBS gewaschen. Dann wurden 15 µl Probe in 85 µl PBS mit 10 % (v / v) Glycerol und 1 % (Gewicht / Volumen, weight / volume, w / v) BSA pro Kammer hinzugefügt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler platziert. Danach wurden die Platten erneut viermal gewaschen und mit 0,05 % (v / v) MACN-markiertem anti-SELENBP1-mAb2 in 100 µl PBS mit 0,1 % Triton X-100 und 5 % (w / v) Milchpulver inkubiert und für eine weitere Stunde auf einem Plattenschüttler bei Raumtemperatur platziert. Im letzten Schritt wurden die Platten erneut viermal gewaschen und in einem Luminometer (Mithras LB 940, Berthold, Bad Wildbad, Deutschland) platziert. Die Bestimmung der SELENBP1-Menge wurde photometrisch bei 430 nm nach Zugabe von 75 µl von 0,06 % (v / v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 0,2 mmol / l NaOH durchgeführt und relative Lichteinheiten (relative light units, RLU) wurden für 1 Sekunde gemessen. In jedem Testlauf wurden oben beschriebene Standardlösungen zur Errechnung einer Eichkurve sowie eine Standardprobe mit 4,8 nmol / l rhSELENBP1 mitgeführt. Konzentrationen unterhalb der geringsten Standardlösung wurden extrapoliert. Zur Berechnung der Konzentration wurde eine lineare Regression der RLU als Funktion der SELENBP1-Konzentration der Standardlösungen errechnet, wobei *m* und *b* plattenspezifische Parameter sind:

$$SELENBP1 = e^{\frac{\ln(RLU) - b}{m}}$$

### 3.5. Probenmatrix, Probenstabilität, Funktionale Assaysensitivität und Variabilität

Die Methodik zum Vergleich verschiedener Probenmatrices (EDTA-Blut vs. Lithium-Heparinblut vs. Citratblut vs. Serum) und zur Bestimmung der Probenhaltbarkeit nach Einfrieren / Auftauen, der Assaysensitivität, definiert als ein Variationskoeffizient < 20 %, sowie der Variabilität der Messungen innerhalb eines Probenlaufs und zwischen mehreren Probenläufen ist im Detail publiziert [2].

### 3.6. Statistik

Die gesamte Statistik wurde mit freier Statistiksoftware erstellt (R > 3.0.2, R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>).

Messdaten der GPX-Aktivität sowie der SELENBP1-Konzentration wurden in Duplikaten / Triplikaten erhoben, der Variationskoeffizient (coefficient of variation, CV) sowie das arithmetische Mittel berechnet und Messungen mit einem CV > 20 % als invalide verworfen. Standardisierung der Ergebnisse erfolgte mittels einer Eichkurve. In diesem Zusammenhang wurde ein Paket zur Erleichterung der Datenübernahme von einem Plate Reader in einen Datensatz, automatisierten Bestimmung des CVs und Mittelwerts sowie Berechnung einer Konzentration anhand einer Eichkurve entwickelt und publiziert [44].

Normalverteilung der Daten wurde ab einer Probenanzahl von 30 oder nach visueller Bestätigung mittels QQ-Plot angenommen.

Zum Vergleich diskreter Verteilungen zweier unabhängiger Gruppen wurde Welch's t-test (Normalverteilung der Proben) oder Wilcoxon's rank-sum test (Mann-Whitney U-test; im Falle fehlender Normalverteilung) verwendet. Im Falle fehlender Unabhängigkeit der Daten bei Verläufen über mehrere Messzeitpunkte wurde Friedman's test angewendet.

Zum Vergleich zweier oder mehrerer Gruppen mit kategorialen Verteilungen sowie zum schnellen Überblick wurden Kreuztabellen und Chi-Quadrat-Testungen verwendet. Bei Unterschreitung der kritischen Größe von  $n = 5$  pro Feld kam Fisher's exact test zur Anwendung, wenn die Rechnerkapazität dies zuließ.

Bei nicht linearer Beziehung zweier diskreter Variablen kam Spearman's rank correlation zur Anwendung um die Korrelationen zu quantifizieren.

Konfidenz (Confidence interval, CI) und Signifikanz wurden, wie allgemein üblich, für ein Alpha von 0,05 bzw. ein beidseitiges Intervall von 0,95 angegeben.

## 4. Resultate

### 4.1. Patientenkollektive

Insgesamt konnten Patientenkollektive aus vier unabhängigen Studien verwendet werden:

Frau Dr. Pilli et al. rekrutierten 60 ambulante, euthyreote Patientinnen, zwischen 21 und 65 Jahren (Durchschnitt  $\pm$  SD: 43 Jahre  $\pm$  11 Jahre) mit Autoimmunthyreoiditis ohne Supplementationstherapie [1].

Herr Prof. Möckel et al. schlossen 85 Patientinnen und Patienten ein, die bei akutem Brustschmerz die Rettungsstelle aufsuchten und unter dem Verdacht auf ein akutes Koronarsyndrom (acute coronary syndrom; ACS) auf die Chest Pain Unit (CPU) aufgenommen wurden [2].

Herr Prof. Stoppe et al. rekrutierten 75 Patientinnen und Patienten, welche elektiv einen kardiochirurgischen Eingriff mit Notwendigkeit einer Herz-Lungen-Maschine erhielten [3].

Durch unsere Arbeitsgruppe wurde im Rahmen einer anderen Studie ein Kollektiv mit 37 Individuen aufgebaut, die in einem nicht-medizinischem Umfeld rekrutiert wurden [41].

Die klinischen Charakteristiken der Kohorten können den jeweiligen Publikationen oder **Tabelle 1** entnommen werden.

**Tabelle 1:** Charakteristika der verwendeten Kohorten

	Dr. Pilli et al. [1]			Prof. Schomburg et al. [41]	Prof. Möckel et al. [2]	Prof. Stoppe et al. [3]
	Placebo	80-Semet	160-Semet			
n	20	20	20	37	85	75
Alter	43,0 $\pm$ 11,2	48,8 $\pm$ 14	46,9 $\pm$ 7,6	52 (20)	62 (17)	65 (17)
weiblich	100 % (20)	100 % (20)	100 % (20)	59 % (22)	19 % (16)	20 % (15)
BMI	22,4 (5,3)	23,6 (9,3)	22,5 (4,4)	26 (5)	27 (6)	27 (6)

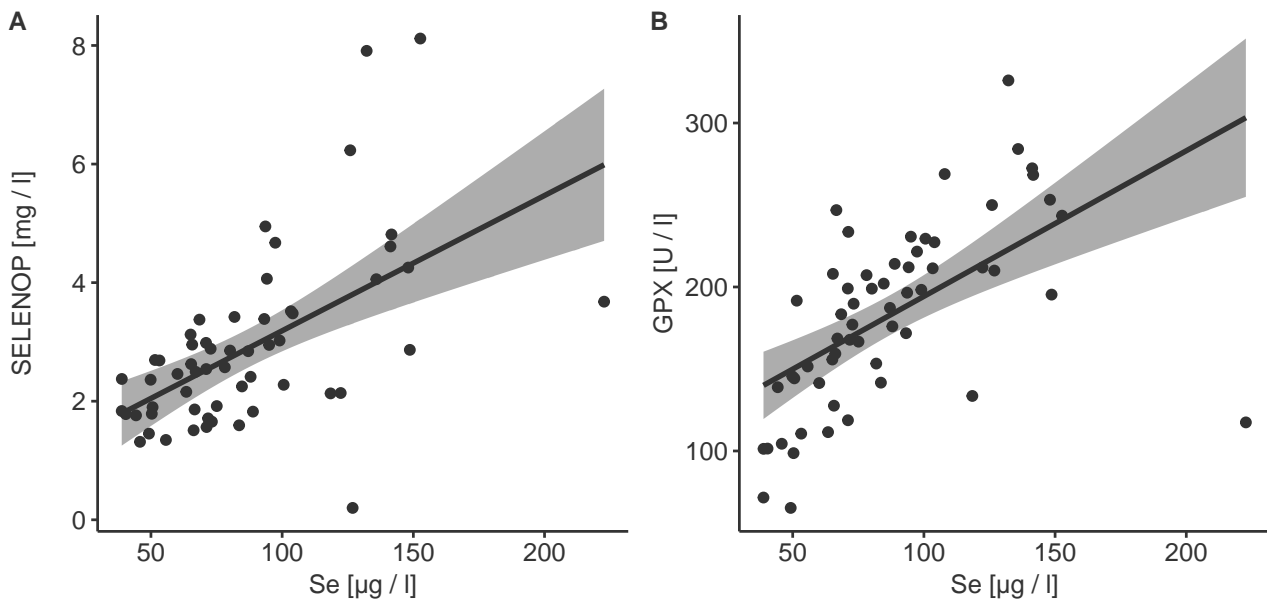
Zahlen als Durchschnitt  $\pm$  Standardabweichung, Median (IQR) oder % (n)

### 4.2. GPX-Aktivität, Serum-Selen- und Selenoprotein P-Konzentration

Zur Optimierung des Testablaufs zur Analyse klinischer Kohorten auf die Konzentrationsbestimmung von Selenoproteinen und Selen im Blut wurde zuerst das geschilderte Kollektiv von Patientinnen mit Autoimmunthyreoiditis vermessen.

Anhand der zeitaufgelösten Daten konnte beobachtet werden, dass ein Teil der Patientinnen einen signifikanten Anstieg der Serum-Selenkonzentration über den Beobachtungszeitraum zeigte. Nach Entblindung konnte von Frau Dr. Pilli et al. bestätigt werden, dass der Anstieg nach Beginn der Supplementation einer Dosis-Wirkung-

Beziehung folgte und die erhobenen Messwerte zur Intervention korrelierten (Figure 3 in [1]).



**Abbildung 1:** A) SELENOP und B) GPX in Abhängigkeit von Se vor Beginn der der Supplementation. In beiden Fällen zeigt sich eine lineare Beziehung ( $r = 0,56$ ;  $p < 0,0001$  bzw.  $r = 0,57$ ;  $p < 0,0001$ ). Abbildung nicht zuvor veröffentlicht, Daten aus [1].

Vor Beginn der Supplementation zeigt sich eine lineare Beziehung zwischen Se und SELENOP sowie zwischen Se und GPX ( $r = 0,56$ ;  $p < 0,0001$  bzw.  $r = 0,57$ ;  $p < 0,0001$ , **Abbildung 1**), welche zu den beiden weiteren Zeitpunkten nicht beobachtet wurde. Die Ursache hierfür dürfte in der Verwendung von Selenomethionin als Supplement liegen, welches auch unspezifisch in Proteine eingebaut wird und sich so nicht unmittelbar in einer erhöhten Expression der Selenoproteine SELENOP und GPX widerspiegelt.

### 4.3. Entwicklung des SELENBP1-LIA

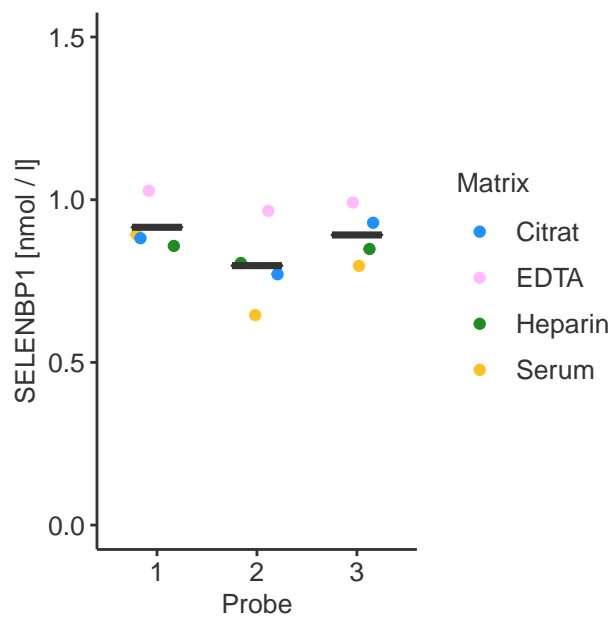
Durch unsere Arbeitsgruppe wurde rekombinantes, humanes SELENBP1 exprimiert und es wurden Antikörper gegen das Protein generiert und aufgereinigt (federführend durch Dr. Waldemar Minich unserer AG, und nicht Eigenleistung des Autors).

Zur Quantifizierung von SELENBP1 im Blut konnte aus diesen Komponenten ein nicht-kompetitiver LIA entwickelt werden, welcher die SELENBP1-Konzentration mit einem minimalen Probenvolumen von 30 µl pro Doppelbestimmung in einem Bereich von 0,3 bis 38,2 nmol / l misst.

Die Intra-Assay-Variabilität von 1394 gemessenen Duplikaten betrug dabei im Median 3 %. Die Inter-Assay-Variabilität der mitgeführten Standards in 32 Analysen betrug 9,9 %.

Zur breiteren Einsetzbarkeit des Assays testeten wir die Variabilität zwischen verschiedenen Matrices (EDTA-Blut vs. Citratblut vs. Heparinblut vs. Serum). Hier bestand

kein relevanter Unterschied ( $CV < 12,5\%$ ), sodass eine Messung von Proben aller vier Matrices möglich erscheint (**Abbildung 2**).



**Abbildung 2:** Variation der Messungen dreier Proben (je zwei Bestimmungen) in verschiedenen Matrices (mittlerer  $CV = 12\%$ ). Abbildung nicht zuvor veröffentlicht, Daten aus [2].

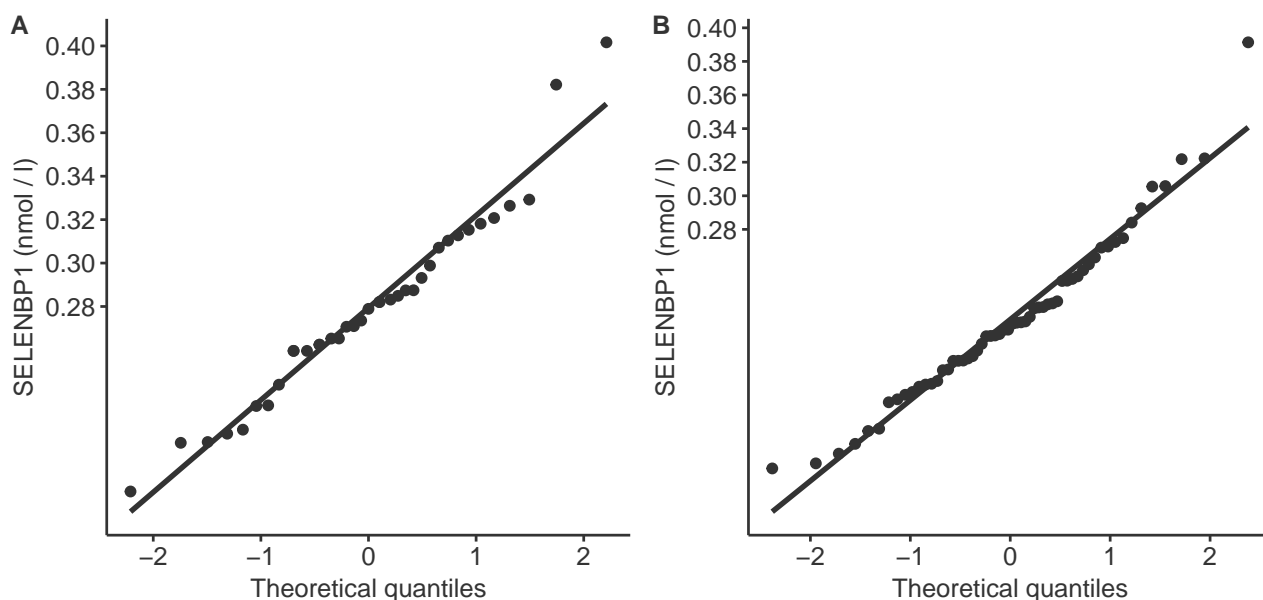
Diese Ergebnisse wurden im Detail publiziert [2].

#### 4.4. Probenstabilität

Eine weitere wichtige Frage vor Vermessung von Studien ist der präanalytische Umgang mit den Proben und der dadurch ggf. bedingte Verlust an Detektionssignal. Die in unserem Labor durchgeführten Versuche zur Lagerung zeigten bei bis zu 7 Stunden bei  $+4\text{ °C}$  keinen signifikanten Abfall der im Assay gemessenen Konzentrationen. Bei Raumtemperatur hingegen kam es zu einem Abfall der messbaren SELENBP1 Konzentration auf  $73\%$  ( $58 - 88\%$ ) des Kontrollwertes. Eine signifikante Degradation der Probe nach zehnmaligen Einfrieren und Auftauen konnte nicht beobachtet werden (Figure 2 in [2]).

#### 4.5. Serum-SELENBP1-Konzentration unter physiologischen Bedingungen

Das Vorkommen von SELENBP1 im Blut war in der Literatur vor unseren Arbeiten noch nicht beschrieben worden, sodass wir die Serumkonzentrationen in Proben einer Kontrollkohorte ( $n = 37$ ), einer Case-Control-Study [41] sowie von 66 Patientinnen und Patienten eines herzchirurgischen Kollektivs [3] zum Zeitpunkt vor der elektiven Operation mit dem neuen Assay bestimmt haben. Hier zeigte sich eine Normalverteilung um einen Median von  $0,28\text{ nmol/l}$  (99. Perzentile:  $0,39\text{ nmol/l}$ ) bzw.  $0,22\text{ nmol/l}$  (99. Perzentile:  $0,39\text{ nmol/l}$ ; **Abbildung 3**, bzw. Figure 1C in [2] und Figure 1 in [3]).



**Abbildung 3:** QQ-Plots für A) gesunde Kontrollen ( $n = 37$ ) und B) Patientinnen und Patienten vor einem elektiven kardiochirurgischen Eingriff ( $n = 66$ ). Abbildung neue Zusammenstellung aus A) Figure 1C in [2] und B) Figure 1 in [3] (Abbildung 3B nicht Eigenleistung des Autors).

#### 4.6. SELENBP1 im Blut bei akutem Brustschmerz

Als nächstes untersuchten wir, ob unter pathophysiologischen Bedingungen SELENBP1 im Blut nachweisbar ist. Bei 71 von 85 Patientinnen und Patienten, die mit Brustschmerzen die Rettungsstelle aufsuchten, wurde ein ACS diagnostiziert (ST-Hebungsinfarkt [ST-elevation myocardial infarction, STEMI], nicht-ST-Hebungsinfarkt [non-ST-elevation myocardial infarction, NSTEMI] oder instabile Angina pectoris [unstable angina pectoris, UAP]). Die verbleibenden 14 Patientinnen und Patienten wurden unter einer anderen Diagnose behandelt (Tabelle 2 in [2]).

Im Vergleich zur Kontrollkohorte zeigten Patientinnen und Patienten unter Verdacht auf ein ACS erhöhte Serumkonzentrationen mit individueller Dynamik (exemplarische Verläufe in Supplemental Figure 1 in [2]).

Von 85 Patientinnen und Patienten mit Brustschmerz erlitten 18 Patientinnen und Patienten ungünstige kardiale Ereignisse inklusive Tod (major adverse cardiac events, MACE) und 6 Patientinnen und Patienten verstarben [2].

Die receiver operating characteristic curve (ROC Kurve) zur Vorhersage eines MACE zum Zeitpunkt des ersten medizinischen Kontakts ergab zwei sinnvolle Grenzwerte (0,45 nmol / l bzw. 0,80 nmol / l) bei einer Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC) von 0,7 (Figure 5 in [2]).

Patientinnen und Patienten mit Serumkonzentrationen über den postulierten Grenzwerten (0,45 nmol / l bzw. 0,80 nmol / l) hatten eine 6- bzw. 11-fach erhöhte Chance (Odds), ein MACE zu erleiden sowie eine 11- bzw. 12-fach erhöhte Chance, vor Entlassung zu versterben. Hervorzuheben ist der gute negative Vorhersagewert (negative predictive



value, NPV) von 0,97 bzw. 0,96, welcher eine Stratifizierung in eine Hoch- und eine Niedrigrisikogruppe erlaubt (**Tabelle 2**; auch Tabelle 3 in [2]).

**Tabelle 2:** Odds-Ratios und Test-Charakteristika für das Auftreten eines MACE inkl. Tod oder Tod alleine zum Zeitpunkt des ersten medizinischen Kontakts, Tabelle 3 in [2].

	SELENBP1 > 0,45 nmol / l		SELENBP1 > 0,80 nmol / l	
	MACE	Tod	MACE	Tod
Odds Ratio	6	11	11	12
CI	2 - 19	2 - 68	2 - 49	2 - 74
p	0,0036	0,0098	0,0022	0,014
Sensitivität	0,44	0,67	0,33	0,50
Spezifität	0,88	0,85	0,96	0,92
PPV	0,50	0,25	0,67	0,33
NPV	0,86	0,97	0,84	0,96

CI: Konfidenzintervall (confidence interval); PPV: positiver Vorhersagewert (positive predictive value); NPV: negativer Vorhersagewert (negative predictive value)

#### 4.7. SELENBP1 in der Kardiochirurgie

Im Weiteren hatten wir die Möglichkeit, die Dynamik von SELENBP1 im Blut bei Patientinnen und Patienten zu studieren, die einen elektiven kardiochirurgischen Eingriff erhielten, in dessen Verlauf eine Ischämie des Herzens induziert wurde.

Nach Einleitung einer Kardioplegie mit myokardialer Ischämie während eines kardiochirurgischen Eingriffs konnte im Serum von 74 von 75 (99 %) Patientinnen und Patienten eine transiente Erhöhung der SELENBP1-Konzentrationen gemessen werden, wobei 68 Patientinnen und Patienten den im oben geschilderten Kollektiv ermittelten Grenzwert von 0,45 nmol / l erreichten bzw. überschritten (Figure 3b in [3]).

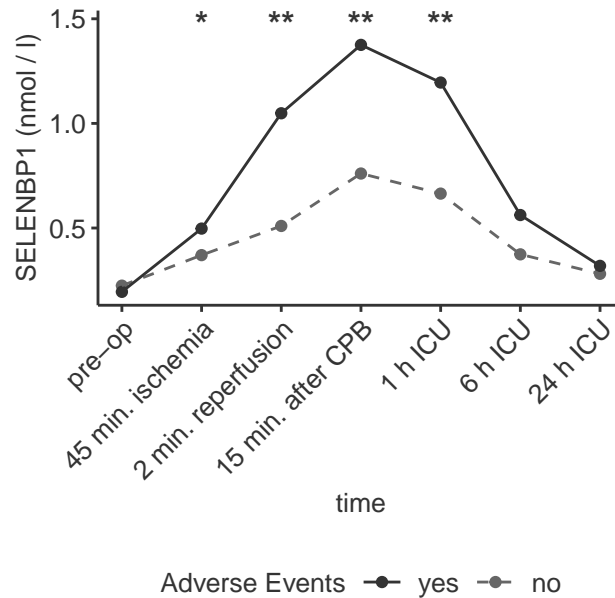
Es zeigten sich geschlechtsspezifische Unterschiede in Bezug auf die Geschwindigkeit des Anstiegs, aber nicht bei der maximal erreichten Konzentration [3].

Die Höhe der gemessenen SELENBP1-Konzentration korrelierte bereits 2 Minuten nach Beginn der Reperfusion sowie 15 Minuten nach der Entwöhnung von der Herz-Lungen-Maschine mit der Dauer der Ischämie ( $\rho = 0,5$ ,  $p < 0,0001$  bzw.  $\rho = 0,6$ ,  $p < 0,0001$ ; Figure 4 in [3]).

Die SELENBP1-Konzentrationen 2 Minuten nach Beginn der kardialen Reperfusion sowie 15 Minuten nach der Entwöhnung von der Herz-Lungen-Maschine korrelierten mit der Konzentration der Herz-spezifischen Kreatinkinase (CK-Mb) nach dem Eingriff als Marker für myokardiale Schädigung ( $\rho = 0,5$ ,  $p < 0,0001$  bzw.  $\rho = 0,4$ ,  $p = 0,0007$ ; Figure 5 in [3]).

Patientinnen und Patienten, die im Verlauf des Krankenhausaufenthaltes eine der Komplikationen: Tod, zerebrale Ischämie oder Bradykardie (im Folgenden als kombinierter Endpunkt 1 bezeichnet) erlitten, zeigten signifikant erhöhte SELENBP1-Konzentrationen

im Vergleich zu den Patientinnen und Patienten ohne eine dieser Komplikationen (**Abbildung 4**; Figure 6 in [3]).



**Abbildung 4:** SELENBP1-Konzentrationen im Serum von Patientinnen und Patienten im Verlauf eines kardiochirurgischen Eingriffs, aufgeteilt in Patientinnen und Patienten mit schwerwiegender Komplikation (Tod, zerebrale Ischämie, Bradykardie; durchgehende Linie) und ohne eine solche Komplikation (gestrichelte Linie), Abbildung auch Figure 6 in [3].

Grenzwerte zur Stratifizierung in Risikogruppen für verschiedene ungünstige Ereignisse (akutes Nierenversagen, Tod, Bradykardie, prolongierter Aufenthalt auf der Intensivstation sowie den kombinierten Endpunkt 1 und zusätzlich mit akutem Nierenversagen) wurden mittels ROC-Kurve bestimmt (Tabelle 2 in [3]). Für eine Vorhersage des kombinierten Endpunkts 1 nach einer Stunde nach Erreichen der ICU ergab sich eine AUC von 0,84 (Figure 7 in [3]). Jenseits einer Konzentration von 0,96 nmol / l ergab sich beispielsweise eine Odds-Ratio (OR) von 30 (CI: 3 - 269) für das Auftreten von Tod, zerebraler Ischämie oder Bradykardie [3].

## 5. Diskussion

Wir untersuchten in den oben dargestellten Arbeiten, ob SELENBP1 einen potentiellen Stellenwert als Biomarker für Ischämie im klinischen Alltag haben kann.

Bislang wurde SELENBP1 als intrazelluläres Protein beschrieben und eine pathologische Expression überwiegend im Rahmen diverser maligner Erkrankungen diskutiert [45].

Zur Bestimmung der SELENBP1-Konzentration wurden bisher zumeist Gewebeproben untersucht (u.a. [18, 22, 46]). Im Rahmen einer histopathologischen Untersuchung von Tumorgewebe ist die Bestimmung von prognostischen Marker aus dem Gewebe, z.B.: der Wachstumsfraktion mittels KI-67, lange etabliert [47]. Wir planten die Eignung von SELENBP1 als Biomarker für eine akute Hypoxie zu untersuchen. Hierzu bedarf es eines Untersuchungsmediums, welches schnell und wenig invasiv verfügbar ist, z.B.: Serum. So wird zum Nachweis einer myokardialen Ischämie routinemäßig die Serumkonzentration von kardialem Troponin herangezogen [48].

Hierfür etablierten wir einen nicht-kompetitiven LIA, mit dessen Hilfe eine zuverlässige Quantifizierung aus dem Blut möglich ist. Wir optimierten die Probenreagenzien für einen stabilen Einsatz und eine minimale Menge an Probenmaterial. Wir konnten demonstrieren, dass die SELENBP1-Konzentration mit unserem Assay in verschiedenen Matrices gemessen werden kann. Weiterhin beobachteten wir, dass Messungen auch nach mehrmaligem Einfrieren und Auftauen des Probenmaterials möglich sind, es aber bei Raumtemperatur innerhalb weniger Stunden zu einem signifikanten Abfall der SELENBP1-Konzentration kommt [2].

Mit unseren analytischen Arbeiten konnten wir erstmalig zeigen, dass SELENBP1 im Blutstrom von gesunden und erkrankten Frauen und Männern gefunden werden kann. Wir beobachteten, dass in einer Kontrollkohorte [2] sowie präoperativ vor einem elektiven, kardiochirurgischen Eingriff [3] messbare Konzentrationen von SELENBP1 im Blut zirkulieren. In beiden Populationen gab es keinen Anhalt für eine akute Pathologie. Die gemessenen Serumkonzentrationen waren bis auf zwei Ausreißer normalverteilt mit einer oberen Grenzkonzentration von 0,39 nmol / l, was auf ein physiologisches Vorkommen geringer Mengen an SELENBP1 im Blutstrom hindeutet.

Scortegagna et al. berichteten, dass HIF-1 $\alpha$  die Expression von SELENBP1 in der Maus hochreguliert [35]. Hypoxie, wie sie zum Beispiel in soliden Tumoren herrscht, wiederum stimuliert die Expression von HIF-1 $\alpha$  [49]. Dennoch wird in vielen soliden Tumoren eine Reduktion von SELENBP1 beobachtet und ist überwiegend mit einem schlechteren Überleben assoziiert [8, 12-19, 21, 22, 26-29, 33-35, 46, 50-55].

Wir untersuchten, ob unter Hypoxie relevante Veränderungen der SELENBP1-Konzentration im Blut auftreten. Als klinisch relevante Gewebhypoxie wählten wir die myokardiale Ischämie aus.

Mit global mehr als 153.533.000 Betroffenen und einer Inzidenz von jährlich über 20.731.000 Erkrankten in 2016 [56] stellt die ischämische Kardiomyopathie 2,2 % der globalen Krankheitslast dar [57]. In Deutschland kommt es relativ konstant zu 249

Hospitalisationen aufgrund eines akuten Koronarsyndroms (ACS), als akute Manifestation einer kardialen Ischämie, pro 100.000 Einwohnern pro Jahr [58].

Bei Patientinnen und Patienten welche unter dem Verdacht auf ein akutes Koronarsyndrom in der Rettungsstelle behandelt wurden, fanden wir deutlich erhöhte Serumkonzentrationen von SELENBP1, welche einen dynamischen Verlauf zeigten und mit einer mehr als zehnfach erhöhten Chance für ein MACE oder Versterben assoziiert sind [2]. Dies deutet auf einen krankheitsspezifischen Zusammenhang hin und ist prognostisch hoch relevant.

Patientinnen und Patienten vor einem elektiven kardiochirurgischen Eingriff wiesen als physiologisch anzunehmende Serumkonzentrationen von SELENBP1 auf. Wir konnten zeigen, dass die SELENBP1-Konzentration nach Induktion einer Kardioplegie mit konsekutiver kontrollierter Ischämie des Herzens ansteigt und binnen 24 Stunden wieder abfällt [3]. Die Dauer der iatrogenen Ischämie korrelierte nahezu linear mit der Höhe der SELENBP1-Konzentration kurz nach Reperfusion des Herzens [3], sodass wir in Zusammenschau der Ergebnisse eine myokardiale Ischämie als Stimulus der SELENBP1-Freisetzung postulieren.

Beim akuten Koronarsyndrom ist ein früher, objektivierbarer Ischämienachweis maßgeblich, um rechtzeitig eine lebensrettende Therapie einzuleiten. Die aktuellen Leitlinien der European Society of Cardiology fordern für einen Myokardinfarkt mit ST-Streckenhebung (STEMI) eine Zeit bis zur Intervention von < 60 Minuten für Zentren mit der Möglichkeit zur Koronarangiographie. Maximal sollten aber 120 Minuten vom Beginn der Symptome bis zur Einleitung einer Therapie vergehen [59]. Auch für eine Myokardischämie ohne Hebung der ST-Strecke (NSTEMI) ist bei einer Hochrisikokonstellation eine Intervention innerhalb von 120 Minuten empfohlen [60]. Beides beinhaltet für Kliniken ohne eigenes Herzkatheterlabor eine rasche Verlegung in das nächstgelegene, geeignete Zentrum und unterstreicht die Notwendigkeit einer raschen Diagnosefindung und Risikostratifizierung. Beide Leitlinien stützen sich hierbei auf eine Kombination aus Klinik, EKG-Veränderungen und der Bestimmung von kardialen Biomarkern, primär den kardialen Troponinisoformen T und I. Zur Definition eines NSTEMI werden hier meist serielle Bestimmungen der Troponinkonzentration über einen Zeitraum von 1 - 6 Stunden herangezogen, da die initiale Troponinkonzentration unter dem Grenzwert liegen kann [59]. Hier besteht Bedarf für weitere, schon früh im Verlauf des Ereignisses auftretende, objektivierbare Biomarker zur schnellen Diagnosefindung und Risikostratifizierung.

Der definierte Zeitpunkt und klare Beginn der (iatrogenen) Ischämie des kardiochirurgischen Kollektivs [3] ließ es zu, die Dynamik der SELENBP1-Konzentrationen im Blut darzustellen. Hier zeigte sich ein signifikanter Anstieg bereits nach 45 Minuten, sodass SELENBP1 potenziell einen frühen Biomarker darstellt.

Die MB-Isoform der Kreatinkinase (Creatinkinase myocardial band, CK-Mb) stellt einen weiteren etablierten Biomarker beim akuten Koronarsyndrom dar, wobei die maximale Höhe der CK-Mb-Konzentration mit dem Ausmaß der myokardialen Schädigung assoziiert ist [61].

Die bei dem von uns als Modell verwendeten, kardiochirurgischen Eingriff intraoperativ gemessenen SELENBP1-Konzentrationen korrelierten mit der nach dem Eingriff gemessenen CK-Mb-Konzentration [3], i.e., der Anstieg der SELENBP1-Konzentration im Serum scheint dem der CK-Mb-Konzentration vorauszuweichen.

Wir konnten keine Korrelation mit kardialen Troponin, als etabliertem Marker für Untergang von Kardiomyozyten, sehen [2], sodass wir eine andere Pathophysiologie vermuten. Ein sehr rascher Anstieg der SELENBP1-Konzentration sowie die nahezu lineare Korrelation zur Ischämie des Herzens lassen uns annehmen, dass SELENBP1 vor dem Untergang des Kardiomyozyten ausgeschüttet wird, potenziell bevor eine irreversible Schädigung eintritt, sodass eine Ausschüttung von Troponin ausbleibt oder nur attenuiert vorliegt.

Einen ähnlichen Mechanismus der Freisetzung von SELENBP1 in Abhängigkeit der zellulären Schädigung noch vor der Apoptose bzw. Nekrose postulieren Lee et al., die in einem Rattenmodell zeigen, dass SELENBP1 dosisabhängig unter toxischer Stimulation aus der Niere ausgeschüttet wird [24]. Pathophysiologisch beobachteten Lee et al. in den geschädigten Zellen ebenso eine dosisabhängig gesteigerte Expression von HIF-1 $\alpha$ . Die in Abwesenheit von Hypoxie vorliegende Ursache der gesteigerten HIF1- $\alpha$ - und SELENBP1-Expression könnte hierbei, wie von Huang et al. postuliert, in einem vermehrten Anfall von ROS im Rahmen des gesteigerten zellulären Stress liegen [22].

Ein Erscheinen von SELENBP1 im Blut noch vor dem Eintritt einer irreversiblen Schädigung des Herzens hätte nicht nur Einfluss auf akute diagnostische und therapeutische Strategien, sondern würde auch neue Perspektiven in der nicht-invasiven Ischämiediagnostik im Rahmen von Belastungstests eröffnen.

Wir konnten keinen Zusammenhang zwischen SELENBP1-Konzentration und CRP-, Thrombozyten- oder Leukozytenkonzentration als Ausdruck systemischer Entzündung bzw. einer Akuten-Phase-Reaktion beobachten [2], sodass wir annehmen, dass die Freisetzung von SELENBP1 auf einer direkten und lokalen Reaktion auf zellulärer Ebene beruht und nicht systemisch oder zentral reguliert wird.

Ob ein Zusammenhang zwischen der gegenläufigen Regulation von Se [62] und SELENOP [40] bei systemischer Inflammation [39] und Hypoxie [36] auf der einen Seite und dem perakuten Auftreten von SELENBP1 im Blut [2, 3] auf der anderen Seite besteht, und ob SELENBP1 und GPX3 im Blut ebenfalls interagieren, wie es für SELENBP1 und GPX1 intrazellulär beschrieben ist [33], bleibt ungeklärt.

Die beiden hier im Detail beleuchteten Studien mit Herzpatientinnen und -patienten waren explorativ und einige Limitationen sollten beachtet werden. Beide Studien sind durch ihre Kohortengröße und die relativ niedrige Rate an ungünstigen Folgen in ihrer Generalisierbarkeit eingeschränkt [2, 3]. Weiterhin verbleiben der exakte Stimulus und der Pathomechanismus der SELENBP1-Freisetzung nicht abschließend geklärt. In dem Kollektiv der Patientinnen und Patienten mit Brustschmerz konnten wir keine so homogene Dynamik über die Zeit der SELENBP1-Konzentrationen beobachten [2] wie das in dem kardiochirurgischen Kollektiv der Fall war [3]. Hier könnte eine mutmaßlich nicht immer

zuverlässige, selbstberichtete Zeit seit Beginn der Symptome (symptom onset time, SOT) [2] eine Rolle gespielt haben. Weiterhin befanden sich unter den Patientinnen und Patienten mit Brustschmerz solche mit temporärer versus noch-anhaltender Ischämie, was unter unserer Hypothese eine fortgesetzte Freisetzung von SELENBP1 bedingen sollte.

Trotz der oben genannten Limitationen erscheint uns dennoch mit SELENBP1 ein neuer, zuverlässiger und sehr früher Biomarker für eine Myokardischämie identifiziert zu sein, dessen diagnostische Bedeutung in Folgestudien weiter untermauert werden muss.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Pilli T, Cantara S, Schomburg L, Cenci V, Cardinale S, Heid ECD, Kühn EC, Cevenini G, Sestini F, Fioravanti C, D'Hauw G and Pacini F: IFN $\gamma$ -Inducible Chemokines Decrease upon Selenomethionine Supplementation in Women with Euthyroid Autoimmune Thyroiditis: Comparison between Two Doses of Selenomethionine (80 or 160  $\mu$ g) versus Placebo. *Eur Thyroid J.* 2015;4(4):226-233. DOI: 10.1159/000439589
2. Kühn EC, Slagman A, Kühn-Heid ECD, Seelig J, Schwiebert C, Minich WB, Stoppe C, Möckel M and Schomburg L: Circulating levels of selenium-binding protein 1 (SELENBP1) are associated with risk for major adverse cardiac events and death. *J Trace Elem Med Biol.* 2019;52:247-253. DOI: 10.1016/j.jtemb.2019.01.005
3. Kühn-Heid ECD, Kühn EC, Ney J, Wendt S, Seelig J, Schwiebert C, Minich WB, Stoppe C and Schomburg L: Selenium-Binding Protein 1 Indicates Myocardial Stress and Risk for Adverse Outcome in Cardiac Surgery. *Nutrients.* 2019;11(9). DOI: 10.3390/nu11092005
4. Trofast J: *Jac. Berzelius - The discovery of Selenium, Silicon, Zirconium and Thorium. A short history by Jan Trofast.* 1. Auflage. Ligatum AB, Vapenkroken 34, S-226 47 Lund, Sweden: Berzelius Society; 2016. 131 Seiten.
5. Schwarz K and Foltz CM: Factor 3 activity of selenium compounds. *J Biol Chem.* 1958;233(1):245-251.
6. Burk RF, Hill KE and Motley AK: Plasma selenium in specific and non-specific forms. *Biofactors.* 2001;14(1-4):107-114. DOI: 10.1002/biof.5520140115
7. Brigelius-Flohé R and Flohé L: Selenium and redox signaling. *Arch Biochem Biophys.* 2017;617:48-59. DOI: 10.1016/j.abb.2016.08.003
8. Raucci R, Colonna G, Guerriero E, Capone F, Accardo M, Castello G and Costantini S: Structural and functional studies of the human selenium binding protein-1 and its involvement in hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1814(4):513-522. DOI: 10.1016/j.bbapap.2011.02.006
9. Okunuki Y, Usui Y, Takeuchi M, Kezuka T, Hattori T, Masuko K, Nakamura H, Yudoh K, Usui M, Nishioka K and Kato T: Proteomic surveillance of autoimmunity in Behcet's disease with uveitis: selenium binding protein is a novel autoantigen in Behcet's disease. *Exp Eye Res.* 2007;84(5):823-831. DOI: 10.1016/j.exer.2007.01.003
10. Chang PW, Tsui SK, Liew C, Lee CC, Waye MM and Fung KP: Isolation, characterization, and chromosomal mapping of a novel cDNA clone encoding human selenium binding protein. *J Cell Biochem.* 1997;64(2):217-224. DOI: 10.1002/(sici)1097-4644(199702)64:2<217::aid-jcb5>3.0.co;2-#
11. Li LS, Kim H, Rhee H, Kim SH, Shin DH, Chung KY, Park K-S, Paik Y-K, Chang J and Kim H: Proteomic analysis distinguishes basaloid carcinoma as a distinct subtype of nonsmall cell lung carcinoma. *Proteomics.* 2004;4(11):3394-3400. DOI: 10.1002/pmic.200400901

12. He Q-Y, Cheung YH, Leung SY, Yuen ST, Chu K-M and Chiu J-F: Diverse proteomic alterations in gastric adenocarcinoma. *Proteomics*. 2004;4(10):3276-3287. DOI: 10.1002/pmic.200300916
13. Kim H, Kang HJ, You KT, Kim SH, Lee KY, Kim TI, Kim C, Song SY, Kim H-J, Lee C and Kim H: Suppression of human selenium-binding protein 1 is a late event in colorectal carcinogenesis and is associated with poor survival. *Proteomics*. 2006;6(11):3466-3476. DOI: 10.1002/pmic.200500629
14. Li T, Yang W, Li M, Byun D-S, Tong C, Nasser S, Zhuang M, Arango D, Mariadason JM and Augenlicht LH: Expression of selenium-binding protein 1 characterizes intestinal cell maturation and predicts survival for patients with colorectal cancer. *Mol Nutr Food Res*. 2008;52(11):1289-1299. DOI: 10.1002/mnfr.200700331
15. Pohl NM, Tong C, Fang W, Bi X, Li T and Yang W: Transcriptional regulation and biological functions of selenium-binding protein 1 in colorectal cancer in vitro and in nude mouse xenografts. *PLoS one*. 2009;4(11):e7774. DOI: 10.1371/journal.pone.0007774
16. Wu C, Luo Z, Chen X, Wu C, Yao D, Zhao P, Liu L, Shi B and Zhu L: Two-dimensional differential in-gel electrophoresis for identification of gastric cancer-specific protein markers. *Oncol Rep*. 2009;21(6):1429-1437. DOI: 10.3892/or\_00000371
17. Silvers AL, Lin L, Bass AJ, Chen G, Wang Z, Thomas DG, Lin J, Giordano TJ, Orringer MB, Beer DG and Chang AC: Decreased selenium-binding protein 1 in esophageal adenocarcinoma results from posttranscriptional and epigenetic regulation and affects chemosensitivity. *Clin Cancer Res*. 2010;16(7):2009-2021. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2801
18. Xia Y-J, Ma Y-Y, He X-J, Wang H-J, Ye Z-Y and Tao H-Q: Suppression of selenium-binding protein 1 in gastric cancer is associated with poor survival. *Hum Pathol*. 2011;42(11):1620-1628. DOI: 10.1016/j.humpath.2011.01.008
19. Zhang J, Zhan N and Dong W-G: Altered expression of selenium-binding protein 1 in gastric carcinoma and precursor lesions. *Med Oncol*. 2011;28(4):951-957. DOI: 10.1007/s12032-010-9564-6
20. Poulsen NA, Andersen V, Møller JC, Møller HS, Jessen F, Purup S and Larsen LB: Comparative analysis of inflamed and non-inflamed colon biopsies reveals strong proteomic inflammation profile in patients with ulcerative colitis. *BMC Gastroenterol*. 2012;12:76. DOI: 10.1186/1471-230X-12-76
21. Chen G, Wang H, Miller CT, Thomas DG, Gharib TG, Misek DE, Giordano TJ, Orringer MB, Hanash SM and Beer DG: Reduced selenium-binding protein 1 expression is associated with poor outcome in lung adenocarcinomas. *J Pathol*. 2004;202(3):321-329. DOI: 10.1002/path.1524
22. Huang C, Ding G, Gu C, Zhou J, Kuang M, Ji Y, He Y, Kondo T and Fan J: Decreased selenium-binding protein 1 enhances glutathione peroxidase 1 activity and downregulates



- HIF-1 $\alpha$  to promote hepatocellular carcinoma invasiveness. *Clin Cancer Res.* 2012;18(11):3042-3053. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0183
23. Torrealba JR, Colburn M, Golner S, Chang Z, Scheunemann T, Fechner JH, Roenneburg D, Hu H, Alam T, Kim HT, Kanmaz T, Oberley T, Knechtle SJ and Hamawy MM: Selenium-binding protein-1 in smooth muscle cells is downregulated in a rhesus monkey model of chronic allograft nephropathy. *Am J Transplant.* 2005;5(1):58-67. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2004.00651.x
24. Lee EK, Shin Y-J, Park EY, Kim ND, Moon A, Kwack SJ, Son JY, Kacew S, Lee BM, Bae O-N and Kim HS: Selenium-binding protein 1: a sensitive urinary biomarker to detect heavy metal-induced nephrotoxicity. *Arch Toxicol.* 2017;91(4):1635-1648. DOI: 10.1007/s00204-016-1832-6
25. Montes-Nieto R, Insenser M, Martínez-García MÁ and Escobar-Morreale HF: A nontargeted proteomic study of the influence of androgen excess on human visceral and subcutaneous adipose tissue proteomes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(3):E576-E585. DOI: 10.1210/jc.2012-3438
26. McClain CM, Friedman DB, Hajri T, Coffin CM and Cates JMM: Predicting dedifferentiation in liposarcoma: a proteomic approach. *Virchows Arch.* 2013;463(1):85-92. DOI: 10.1007/s00428-013-1416-2
27. Zhang S, Li F, Younes M, Liu H, Chen C and Yao Q: Reduced selenium-binding protein 1 in breast cancer correlates with poor survival and resistance to the anti-proliferative effects of selenium. *PloS one.* 2013;8(5):e63702. DOI: 10.1371/journal.pone.0063702
28. Huang K-C, Park DC, Ng S-K, Lee JY, Ni X, Ng W-C, Bandera CA, Welch WR, Berkowitz RS, Mok SC and Ng S-W: Selenium binding protein 1 in ovarian cancer. *Int J Cancer.* 2006;118(10):2433-2440. DOI: 10.1002/ijc.21671
29. Zhang P, Zhang C, Wang X, Liu F, Sung CJ, Quddus MR and Lawrence WD: The expression of selenium-binding protein 1 is decreased in uterine leiomyoma. *Diagn Pathol.* 2010;5:80. DOI: 10.1186/1746-1596-5-80
30. Yang M and Sytkowski AJ: Differential expression and androgen regulation of the human selenium-binding protein gene hSP56 in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 1998;58(14):3150-3153.
31. Kühn EC: On the Role of Selenium-Binding Protein 1. Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany: Charité – Universitätsmedizin Berlin; 2014.
32. Pol A, Renkema GH, Tangerman A, Winkel EG, Engelke UF, de Brouwer APM, Lloyd KC, Araiza RS, van den Heuvel L, Omran H, Olbrich H, Oude Elberink M, Gilissen C, Rodenburg RJ, Sass JO, Schwab KO, Schäfer H, Venselaar H, Sequeira JS, Op den Camp HJM and Wevers RA: Mutations in SELENBP1, encoding a novel human methanethiol oxidase, cause extraoral halitosis. *Nat Genet.* 2018;50(1):120-129. DOI: 10.1038/s41588-017-0006-7

33. Fang W, Goldberg ML, Pohl NM, Bi X, Tong C, Xiong B, Koh TJ, Diamond AM and Yang W: Functional and physical interaction between the selenium-binding protein 1 (SBP1) and the glutathione peroxidase 1 selenoprotein. *Carcinogenesis*. 2010;31(8):1360-1366. DOI: 10.1093/carcin/bgq114
34. Zhang J, Dong W-G and Lin J: Reduced selenium-binding protein 1 is associated with poor survival rate in gastric carcinoma. *Med Oncol*. 2011;28(2):481-487. DOI: 10.1007/s12032-010-9482-7
35. Scortegagna M, Martin RJ, Kladney RD, Neumann RG and Arbeit JM: Hypoxia-inducible factor-1alpha suppresses squamous carcinogenic progression and epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*. 2009;69(6):2638-2646. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3643
36. Becker N-P, Martitz J, Renko K, Stoedter M, Hybsier S, Cramer T and Schomburg L: Hypoxia reduces and redirects selenoprotein biosynthesis. *Metallomics*. 2014;6(5):1079-1086. DOI: 10.1039/c4mt00004h
37. Bierl C, Voetsch B, Jin RC, Handy DE and Loscalzo J: Determinants of human plasma glutathione peroxidase (GPx-3) expression. *J Biol Chem*. 2004;279(26):26839-26845. DOI: 10.1074/jbc.M401907200
38. Forceville X, Vitoux D, Gauzit R, Combes A, Lahilaire P and Chappuis P: Selenium, systemic immune response syndrome, sepsis, and outcome in critically ill patients. *Crit Care Med*. 1998;26(9):1536-1544. DOI: 10.1097/00003246-199809000-00021
39. Hollenbach B, Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A, Köhrle J and 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. DOI: 10.1016/j.jtemb.2007.11.003
40. Forceville X, Mostert V, Pierantoni A, Vitoux D, Le Toumelin P, Plouvier E, Dehoux M, Thuillier F and Combes A: Selenoprotein P, rather than glutathione peroxidase, as a potential marker of septic shock and related syndromes. *Eur Surgical Res*. 2009;43(4):338-347. DOI: 10.1159/000239763
41. Hildebrand L, Gaber T, Kühnen P, Morhart R, Unterbörsch H, Schomburg L and Seemann P: Trace element and cytokine concentrations in patients with Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP): A case control study. *J Trace Elem Med Biol*. 2017;39:186-192. DOI: 10.1016/j.jtemb.2016.10.001
42. Schomburg L, Schweizer U, Holtmann B, Flohé L, Sendtner M and Köhrle J: Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *Biochem J*. 2003;370(Pt 2):397-402. DOI: 10.1042/BJ20021853
43. Hybsier S, Schulz T, Wu Z, Demuth I, Minich WB, Renko K, Rijntjes E, Köhrle J, Strasburger CJ, Steinhagen-Thiessen E and Schomburg L: Sex-specific and inter-individual differences in biomarkers of selenium status identified by a calibrated ELISA for selenoprotein P. *Redox Biol*. 2017;11:403-414. DOI: 10.1016/j.redox.2016.12.025

44. Kühn EC: bioset: Convert a Matrix of Raw Values into Nice and Tidy Data. 2018. Abrufbar unter: <https://cran.r-project.org/package=bioset>
45. Elhodaky M and Diamond AM: Selenium-Binding Protein 1 in Human Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11). DOI: 10.3390/ijms19113437
46. Yang W and Diamond AM: Selenium-binding protein 1 as a tumor suppressor and a prognostic indicator of clinical outcome. *Biomarker Res.* 2013;1(1):15. DOI: 10.1186/2050-7771-1-15
47. Scholzen T and Gerdes J: The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182(3):311-322. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9
48. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, White HD and Group ESD: Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur Heart J.* 2018. DOI: 10.1093/eurheartj/ehy462
49. Masoud GN and Li W: HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B.* 2015;5(5):378-89. DOI: 10.1016/j.apsb.2015.05.007
50. Bansal MP, Mukhopadhyay T, Scott J, Cook RG, Mukhopadhyay R and Medina D: DNA sequencing of a mouse liver protein that binds selenium: implications for selenium's mechanism of action in cancer prevention. *Carcinogenesis.* 1990;11(11):2071-2073. DOI: 10.1093/carcin/11.11.2071
51. Brown LM, Helmke SM, Hunsucker SW, Netea-Maier RT, Chiang SA, Heinz DE, Shroyer KR, Duncan MW and Haugen BR: Quantitative and qualitative differences in protein expression between papillary thyroid carcinoma and normal thyroid tissue. *Mol Carcinog.* 2006;45(8):613-626. DOI: 10.1002/mc.20193
52. Zhang C, Wang YE, Zhang P, Liu F, Sung CJ, Steinhoff MM, Quddus MR and Lawrence WD: Progressive loss of selenium-binding protein 1 expression correlates with increasing epithelial proliferation and papillary complexity in ovarian serous borderline tumor and low-grade serous carcinoma. *Hum Pathol.* 2010;41(2):255-261. DOI: 10.1016/j.humpath.2009.07.019
53. Di Stasio M, Volpe MG, Colonna G, Nazzaro M, Polimeno M, Scala S, Castello G and Costantini S: A possible predictive marker of progression for hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett.* 2011;2(6):1247-1251. DOI: 10.3892/ol.2011.378
54. Ha Y-S, Lee GT, Kim Y-H, Kwon SY, Choi SH, Kim T-H, Kwon TG, Yun SJ, Kim IY and Kim W-J: Decreased selenium-binding protein 1 mRNA expression is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma. *World J Surg Oncol.* 2014;12:288. DOI: 10.1186/1477-7819-12-288
55. Ansong E, Ying Q, Ekoue DN, Deaton R, Hall AR, Kajdacsy-Balla A, Yang W, Gann PH and Diamond AM: Evidence that selenium binding protein 1 is a tumor suppressor in prostate cancer. *PLoS one.* 2015;10(5):e0127295. DOI: 10.1371/journal.pone.0127295

56. Vos T, Abajobir AA, Abate KH, Abbafati C, Abbas KM, Abd-Allah F, Abdulkader RS, Abdulle AM, Abebo TA, Abera SF, Aboyans V, Abu-Raddad LJ, Ackerman IN, Adamu AA, Adetokunboh O, Afarideh M, Afshin A, Agarwal SK, Aggarwal R, Agrawal A, Agrawal S, Ahmadieh H, Ahmed MB, Aichour MTE, Aichour AN, Aichour I, Aiyar S, Akinyemi RO, Akseer N, Al Lami FH, Alahdab F, Al-Aly Z, Alam K, Alam N, Alam T, Alasfoor D, Alene KA, Ali R, Alizadeh-Navaei R, Alkerwi A, Alla F, Allebeck P, Allen C, Al-Maskari F, Al-Raddadi R, Alsharif U, Alsowaidi S, Altirkawi KA, Amare AT, Amini E, Ammar W, Amoako YA, Andersen HH, Antonio CAT, Anwari P, Ärnlöv J, Artaman A, Aryal KK, Asayesh H, Asgedom SW, Assadi R, Atey TM, Atnafu NT, Atre SR, Avila-Burgos L, Avokphako EFGA, Awasthi A, Bacha U, Badawi A, Balakrishnan K, Banerjee A, Bannick MS, Barac A, Barber RM, Barker-Collo SL, Bärnighausen T, Barquera S, Barregard L, Barrero LH, Basu S, Battista B, Battle KE, Baune BT, Bazargan-Hejazi S, Beardsley J, Bedi N, Beghi E, Béjot Y, Bekele BB, Bell ML, Bennett DA, Bensenor IM, Benson J, Berhane A, Berhe DF, Bernabé E, Betsu BD, Beuran M, Beyene AS, Bhala N, Bhansali A, Bhatt S, Bhutta ZA, Biadgilign S, Bicer BK, Bienhoff K, Bikbov B, Birungi C, Biryukov S, Bisanzio D, Bizuayehu HM, Boneya DJ, Boufous S, Bourne RRA, Brazinova A, Brugha TS, Buchbinder R, Bulto LNB, Bumgarner BR, Butt ZA, Cahuana-Hurtado L, Cameron E, Car M, Carabin H, Carapetis JR, Cárdenas R, Carpenter DO, Carrero JJ, Carter A, Carvalho F, Casey DC, Caso V, Castañeda-Orjuela CA, Castle CD, Catalá-López F, Chang H-Y, Chang J-C, Charlson FJ, Chen H, Chibalabala M, Chibueze CE, Chisumpa VH, Chittheer AA, Christopher DJ, Ciobanu LG, Cirillo M, Colombara D, Cooper C, Cortesi PA, Criqui MH, Crump JA, Dadi AF, Dalal K, Dandona L, Dandona R, das Neves J, Davitoiu DV, de Courten B, De Leo DD, Defo BK, Degenhardt L, Deiparine S, Dellavalle RP, Deribe K, Des Jarlais DC, Dey S, Dharmaratne SD, Dhillon PK, Dicker D, Ding EL, Djalalinia S, Do HP, Dorsey ER, Dos Santos KPB, Douwes-Schultz D, Doyle KE, Driscoll TR, Dubey M, Duncan BB, El-Khatib ZZ, Ellerstrand J, Enayati A, Endries AY, Ermakov SP, Erskine HE, Eshrati B, Eskandarieh S, Esteghamati A, Estep K, Fanuel FBB, Farinha CSES, Faro A, Farzadfar F, Fazeli MS, Feigin VL, Fereshtehnejad S-M, Fernandes JC, Ferrari AJ, Feyissa TR, Filip I, Fischer F, Fitzmaurice C, Flaxman AD, Flor LS, Foigt N, Foreman KJ, Franklin RC, Fullman N, Fürst T, Furtado JM, Futran ND, Gakidou E, Ganji M, Garcia-Basteiro AL, Gebre T, Gebrehiwot TT, Geleto A, Gemechu BL, Gesesew HA, Gething PW, Ghajar A, Gibney KB, Gill PS, Gillum RF, Ginawi IAM, Giref AZ, Gishu MD, Giussani G, Godwin WW, Gold AL, Goldberg EM, Gona PN, Goodridge A, Gopalani SV, Goto A, Goulart AC, Griswold M, Gughani HC, Gupta R, Gupta R, Gupta T, Gupta V, Hafezi-Nejad N, Hailu GB, Hailu AD, Hamadeh RR, Hamidi S, Handal AJ, Hankey GJ, Hanson SW, Hao Y, Harb HL, Hareri HA, Haro JM, Harvey J, Hassanvand MS, Havmoeller R, Hawley C, Hay SI, Hay RJ, Henry NJ, Heredia-Pi IB, Hernandez JM, Heydarpour P, Hoek HW, Hoffman HJ, Horita N, Hosgood HD, Hostiuc S, Hotez PJ, Hoy DG, Htet AS, Hu G, Huang H, Huynh C, Iburg KM, Igumbor EU, Ikeda C, Irvine CMS, Jacobsen KH, Jahanmehr N, Jakovljevic MB, Jassal SK, Javanbakht M, Jayaraman SP, Jeemon P, Jensen PN, Jha V, Jiang G, John D, Johnson SC, Johnson CO, Jonas JB, Jürisson M, Kabir Z, Kadel R, Kahsay A, Kamal R, Kan H, Karam NE, Karch A, Karema CK, Kasaeian A, Kassa GM, Kassaw NA, Kassebaum NJ, Kastor A, Katikireddi SV, Kaul A, Kawakami N, Keiyoro PN, Kengne AP, Keren A, Khader YS, Khalil IA, Khan EA, Khang Y-H, Khosravi A, Khubchandani J, Kiadaliri AA, Kieling C, Kim YJ, Kim

D, Kim P, Kimokoti RW, Kinfu Y, Kisa A, Kissimova-Skarbek KA, Kivimaki M, Knudsen AK, Kokubo Y, Kolte D, Kopec JA, Kosen S, Koul PA, Koyanagi A, Kravchenko M, Krishnaswami S, Krohn KJ, Kumar GA, Kumar P, Kumar S, Kyu HH, Lal DK, Lalloo R, Lambert N, Lan Q, Larsson A, Lavados PM, Leasher JL, Lee PH, Lee J-T, Leigh J, Leshargie CT, Leung J, Leung R, Levi M, Li Y, Li Y, Li Kappe D, Liang X, Liben ML, Lim SS, Linn S, Liu PY, Liu A, Liu S, Liu Y, Lodha R, Logroscino G, London SJ, Looker KJ, Lopez AD, Lorkowski S, Lotufo PA, Low N, Lozano R, Lucas TCD, Macarayan ERK, Magdy Abd El Razek H, Magdy Abd El Razek M, Mahdavi M, Majdan M, Majdzadeh R, Majeed A, Malekzadeh R, Malhotra R, Malta DC, Mamun AA, Manguerra H, Manhertz T, Mantilla A, Mantovani LG, Mapoma CC, Marczak LB, Martinez-Raga J, Martins-Melo FR, Martopullo I, März W, Mathur MR, Mazidi M, McAlinden C, McGaughey M, McGrath JJ, McKee M, McNellan C, Mehata S, Mehndiratta MM, Mekonnen TC, Memiah P, Memish ZA, Mendoza W, Mengistie MA, Mengistu DT, Mensah GA, Meretoja TJ, Meretoja A, Mezgebe HB, Micha R, Milliar A, Miller TR, Mills EJ, Mirarefin M, Mirrakhimov EM, Misganaw A, Mishra SR, Mitchell PB, Mohammad KA, Mohammadi A, Mohammed KE, Mohammed S, Mohanty SK, Mokdad AH, Mollenkopf SK, Monasta L, Montico M, Moradi-Lakeh M, Moraga P, Mori R, Morozoff C, Morrison SD, Moses M, Mountjoy-Venning C, Mruts KB, Mueller UO, Muller K, Murdoch ME, Murthy GVS, Musa KI, Nachega JB, Nagel G, Naghavi M, Naheed A, Naidoo KS, Naldi L, Nangia V, Natarajan G, Negasa DE, Negoji RI, Negoji I, Newton CR, Ngunjiri JW, Nguyen TH, Nguyen QL, Nguyen CT, Nguyen G, Nguyen M, Nichols E, Ningrum DNA, Nolte S, Nong VM, Norrving B, Noubiap JJN, O'Donnell MJ, Ogbo FA, Oh I-H, Okoro A, Oladimeji O, Olagunju TO, Olagunju AT, Olsen HE, Olusanya BO, Olusanya JO, Ong K, Opio JN, Oren E, Ortiz A, Osgood-Zimmerman A, Osman M, Owolabi MO, Pa M, Pacella RE, Pana A, Panda BK, Papachristou C, Park E-K, Parry CD, Parsaeian M, Patten SB, Patton GC, Paulson K, Pearce N, Pereira DM, Perico N, Pesudovs K, Peterson CB, Petzold M, Phillips MR, Pigott DM, Pillay JD, Pinho C, Plass D, Pletcher MA, Popova S, Poulton RG, Pourmalek F, Prabhakaran D, Prasad NM, Prasad N, Purcell C, Qorbani M, Quansah R, Quintanilla BPA, Rabiee RHS, Radfar A, Rafay A, Rahimi K, Rahimi-Movaghar A, Rahimi-Movaghar V, Rahman MHU, Rahman M, Rai RK, Rajsic S, Ram U, Ranabhat CL, Rankin Z, Rao PC, Rao PV, Rawaf S, Ray SE, Reiner RC, Reinig N, Reitsma MB, Remuzzi G, Renzaho AMN, Resnikoff S, Rezaei S, Ribeiro AL, Ronfani L, Roshandel G, Roth GA, Roy A, Rubagotti E, Ruhago GM, Saadat S, Sadat N, Safdarian M, Safi S, Safiri S, Sagar R, Sahathevan R, Salama J, Saleem HOB, Salomon JA, Salvi SS, Samy AM, Sanabria JR, Santomauro D, Santos IS, Santos JV, Santric Milicevic MM, Sartorius B, Satpathy M, Sawhney M, Saxena S, Schmidt MI, Schneider IJC, Schöttker B, Schwebel DC, Schwendicke F, Seedat S, Sepanlou SG, Servan-Mori EE, Setegn T, Shackelford KA, Shaheen A, Shaikh MA, Shamsipour M, Shariful Islam SM, Sharma J, Sharma R, She J, Shi P, Shields C, Shifa GT, Shigematsu M, Shinohara Y, Shiri R, Shirkoobi R, Shirude S, Shishani K, Shrimel MG, Sibai AM, Sigfusdottir ID, Silva DAS, Silva JP, Silveira DGA, Singh JA, Singh NP, Sinha DN, Skiadaresi E, Skirbekk V, Slepak EL, Sligar A, Smith DL, Smith M, Sobaih BHA, Sobngwi E, Sorensen RJD, Sousa TCM, Sposato LA, Sreeramareddy CT, Srinivasan V, Stanaway JD, Stathopoulou V, Steel N, Stein MB, Stein DJ, Steiner TJ, Steiner C, Steinke S, Stokes MA, Stovner LJ, Strub B, Subart M, Sufiyan MB, Sunguya BF, Sur PJ, Swaminathan S, Sykes BL, Sylte DO,

Tabarés-Seisdedos R, Taffere GR, Takala JS, Tandon N, Tavakkoli M, Taveira N, Taylor HR, Tehrani-Banihashemi A, Tekelab T, Terkawi AS, Tesfaye DJ, Tessema B, Thamsuwan O, Thomas KE, Thrift AG, Tiruye TY, Tobe-Gai R, Tollanes MC, Tonelli M, Topor-Madry R, Tortajada M, Touvier M, Tran BX, Tripathi S, Troeger C, Truelsen T, Tsoi D, Tuem KB, Tuzcu EM, Tyrovolas S, Ukwaja KN, Undurraga EA, Uneke CJ, Updike R, Uthman OA, Uzochukwu BSC, van Boven JFM, Varughese S, Vasankari T, Venkatesh S, Venketasubramanian N, Vidavalur R, Violante FS, Vladimirov SK, Vlassov VV, Vollset SE, Wadilo F, Wakayo T, Wang Y-P, Weaver M, Weichenthal S, Weiderpass E, Weintraub RG, Werdecker A, Westerman R, Whiteford HA, Wijeratne T, Wiysonge CS, Wolfe CDA, Woodbrook R, Woolf AD, Workicho A, Xavier D, Xu G, Yadgir S, Yaghoubi M, Yakob B, Yan LL, Yano Y, Ye P, Yimam HH, Yip P, Yonemoto N, Yoon S-J, Yotebieng M, Younis MZ, Zaidi Z, Zaki MES, Zegeye EA, Zenebe ZM, Zhang X, Zhou M, Zipkin B, Zodpey S, Zuhlke LJ and Murray CJL: Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017;390(10100):1211-1259. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)32154-2

57. Bauersachs R, Zeymer U, Brière J-B, Marre C, Bowrin K and Huelsebeck M: Burden of Coronary Artery Disease and Peripheral Artery Disease: A Literature Review. *Cardiovasc Ther*. 2019;2019:8295054. DOI: 10.1155/2019/8295054

58. Freisinger E, Fuerstenberg T, Malyar NM, Wellmann J, Keil U, Breithardt G and Reinecke H: German nationwide data on current trends and management of acute myocardial infarction: discrepancies between trials and real-life. *Eur Heart J*. 2014;35(15):979-988. DOI: 10.1093/eurheartj/ehu043

59. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, Caforio ALP, Crea F, Goudevenos JA, Halvorsen S, Hindricks G, Kastrati A, Lenzen MJ, Prescott E, Roffi M, Valgimigli M, Varenhorst C, Vranckx P, Widimský P and Group ESD: 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2018;39(2):119-177. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx393

60. Collet J-P, Thiele H, Barbato E, Barthélémy O, Bauersachs J, Bhatt DL, Dendale P, Dorobantu M, Edvardsen T, Folliguet T, Gale CP, Gilard M, Jobs A, Jüni P, Lambrinou E, Lewis BS, Mehilli J, Meliga E, Merkely B, Mueller C, Roffi M, Rutten FH, Sibbing D, Siontis GCM and Group ESD: 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2020. DOI: 10.1093/eurheartj/ehaa575

61. Pöyhönen P, Kylmälä M, Vesterinen P, Kivistö S, Holmström M, Lauerma K, Väänänen H, Toivonen L and Hänninen H: Peak CK-MB has a strong association with chronic scar size and wall motion abnormalities after revascularized non-transmural myocardial infarction - a prospective CMR study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2018;18(1):27. DOI: 10.1186/s12872-018-0767-7

62. Angstwurm MWA, Engelmann L, Zimmermann T, Lehmann C, Spes CH, Abel P, Strauss R, Meier-Hellmann A, Insel R, Radke J, Schüttler J and Gärtner R: 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.* 2007;35(1):118-126.  
DOI: 10.1097/01.CCM.0000251124.83436.0E

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Eike Christian Kühn, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „**Zur pathophysiologischen Bedeutung des Selen-bindenden Proteins SELENBP1 im Blut**“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Datum

---

Unterschrift



## Ausführliche Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Eike Christian Kühn hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

### Publikation 1:

Pilli T, Cantara S, Schomburg L, Cenci V, Cardinale S, Heid E C D, **Kühn E C**, Cevenini G, Sestini F, Fioravanti C, D'Hauw G, Pacini F. *IFN $\gamma$ -Inducible Chemokines Decrease upon Selenomethionine Supplementation in Women with Euthyroid Autoimmune Thyroiditis: Comparison between Two Doses of Selenomethionine (80 or 160  $\mu$ g) versus Placebo*. Eur Thyroid J. 2015;4(4):226-233. doi:10.1159/000439589

Beitrag im Einzelnen:

- Laborchemische Analysen und Auswertungen
  - Messung der Selenkonzentration mittels Reflektions-Röntgen-Fluoreszenzspektroskopie (total reflection X-ray fluorescence spectroscopy, TXRF)
  - Messung der Aktivität der Glutathionperoxidase (GPX)
  - Messung der Konzentration von Selenoprotein P (SELENOP, SePP, SeIP)
- Statistische Auswertung der in Berlin durchgeführten Versuche
- Literaturrecherche
- Erstellung von Tabellen und Graphen als Grundlage zur Diskussion mit unseren Kooperationspartnern und der Abschnitte „Serum Selenium“ inklusive Fig. 3 und „Selenoprotein P and Glutathione Peroxidase“ inklusive Online Supplement 1a und 1b.
  - Die finale Gestaltung des Textes sowie der Figures geschah durch die kollaborierende Arbeitsgruppe um Frau Dr. Pilli.

### Publikation 2:

**Kühn E C**, Slagman A, Kühn-Heid E C D, Seelig J, Schwiebert C, Minich W B, Stoppe C, Möckel M, Schomburg L. *Circulating levels of selenium-binding protein 1 (SELENBP1) are associated with risk for major adverse cardiac events and death*. J Trace Elem Med Biol. 2019;52:247-253. doi:10.1016/j.jtemb.2019.01.005

Beitrag im Einzelnen:

- Entwicklung der Arbeitshypothese
- Kommunikation mit der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Möckel
- Laborchemische Analysen und Auswertungen:
  - s. Methoden 2.4 - 2.8
  - Messung des Probenkollektivs der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Möckel in Zusammenarbeit mit Ellen Kühn-Heid
- Statistische Auswertung
- Literaturrecherche
- Erstellung der Tabellen und Graphen
  - Exklusive: Fig. 1A, Tabelle 1
- Selbstständige Verfassung der Publikationsschrift
  - Abstract

- Introduction
- Methods
  - Exklusive 2.2 und 2.3
- Results
  - Exklusive 3.1
- Discussion
- Acknowledgements
- References
- Begleitung des gesamten Review-Prozesses und Einarbeitung der Vorgesprochenen Kritikpunkte und Korrekturen

**Publikation 3:**

Kühn-Heid E C D, **Kühn E C**, Ney J, Wendt S, Seelig J, Schwiebert C, Minich W B, Stoppe C, Schomburg L. *Selenium-Binding Protein 1 Indicates Myocardial Stress and Risk for Adverse Outcome in Cardiac Surgery*. *Nutrients*. 2019;11(9). doi:10.3390/nu11092005

Beitrag im Einzelnen:

- Laborchemische Analysen und Auswertungen:
  - Messung des Probenkollektivs der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Stoppe in Zusammenarbeit mit Ellen Kühn-Heid
- Statistische Auswertung:
  - Erstellen der ROC
- Erstellung der Graphen:
  - Fig. 3, 6, 7
- Überarbeitung des Drafts
- Begleitung des Review-Prozesses

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift des Doktoranden

---

## **Ausgewählte Publikationen**

<https://doi.org/10.1159/000439589> (p. 1)

<https://doi.org/10.1159/000439589> (p. 2)

<https://doi.org/10.1159/000439589> (p. 3)

<https://doi.org/10.1159/000439589> (p. 4)

<https://doi.org/10.1159/000439589> (p. 5)



<https://doi.org/10.1159/000439589> (p. 6)

<https://doi.org/10.1159/000439589> (p. 7)

<https://doi.org/10.1159/000439589> (p. 8)





<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.01.005> (p. 3)










<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.01.005> (p. 6)



Article

# Selenium-Binding Protein 1 Indicates Myocardial Stress and Risk for Adverse Outcome in Cardiac Surgery

Ellen C. D. Kühn-Heid <sup>1</sup>, Eike C. Kühn <sup>1</sup>, Julia Ney <sup>2</sup>, Sebastian Wendt <sup>2,3</sup>, Julian Seelig <sup>1</sup>, Christian Schwiebert <sup>1</sup>, Waldemar B. Minich <sup>1</sup>, Christian Stoppe <sup>2</sup> and Lutz Schomburg <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Institut für Experimentelle Endokrinologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, D-13353 Berlin, Germany

<sup>2</sup> Cardiovascular Critical Care & Anesthesia Research and Evaluation (3CARE), RWTH-Aachen University, D-52074 Aachen, Germany

<sup>3</sup> Department of Anesthesiology, Uniklinik RWTH-Aachen, D-52074 Aachen, Germany

\* Correspondence: lutz.schomburg@charite.de; Tel.: +49-30-450-524-289

Received: 31 July 2019; Accepted: 22 August 2019; Published: 25 August 2019



**Abstract:** Selenium-binding protein 1 (SELENBP1) is an intracellular protein that has been detected in the circulation in response to myocardial infarction. Hypoxia and cardiac surgery affect selenoprotein expression and selenium (Se) status. For this reason, we decided to analyze circulating SELENBP1 concentrations in patients ( $n = 75$ ) necessitating cardioplegia and a cardiopulmonary bypass (CPB) during the course of the cardiac surgery. Serum samples were collected at seven time-points spanning the full surgical process. SELENBP1 was quantified by a highly sensitive newly developed immunological assay. Serum concentrations of SELENBP1 increased markedly during the intervention and showed a positive association with the duration of ischemia ( $\rho = 0.6$ ,  $p < 0.0001$ ). Elevated serum SELENBP1 concentrations at 1 h after arrival at the intensive care unit (post-surgery) were predictive to identify patients at risk of adverse outcome (death, bradycardia or cerebral ischemia, “endpoint 1”; OR 29.9, CI 3.3–268.8,  $p = 0.00027$ ). Circulating SELENBP1 during intervention (2 min after reperfusion or 15 min after weaning from the CPB) correlated positively with an established marker of myocardial infarction (CK-MB) measured after the intervention (each with  $\rho = 0.5$ ,  $p < 0.0001$ ). We concluded that serum concentrations of SELENBP1 were strongly associated with cardiac arrest and the duration of myocardial ischemia already early during surgery, thereby constituting a novel and promising quantitative marker for myocardial hypoxia, with a high potential to improve diagnostics and prediction in combination with the established clinical parameters.

**Keywords:** trace element; biomarker; selenoprotein; metabolism; redox regulation; prediction

## 1. Introduction

Selenium (Se) is an essential trace element affecting the expression of selenoproteins and redox signaling [1,2]. The metabolism of Se and the control of selenoprotein expression is complex as there are disease-, genotype-, sex- and potentially age-specific differences in combination with a variety of nutritional Se sources [3–7]. There are two major types of proteins related to Se, i.e., the selenoproteins with one or more genetically encoded selenocysteine residues in their primary sequence [8] versus the group of less-well-defined Se-binding proteins [9]. Selenium-Binding Protein 1 (SELENBP1) constitutes the most-intensively characterized member of the latter group of proteins [10]. SELENBP1 is expressed in most human and rodent tissues and migrates as a 56 kD band in electrophoretic analyses [11]. Its expression levels have been associated with tumorigenesis and cancer growth [12], especially in relation to androgen concentrations and prostate cancer [13]. A physical interaction between SELENBP1 and

the major intracellular Se-dependent glutathione peroxidase (GPX1) has been described, functionally connecting both groups of Se-containing proteins [14]. Several analyses have quantified SELENBP1 in tumor tissues and report on reduced SELENBP1 expression levels in association with poor survival in gastric [15], breast [16] and renal cancer [17]. Collectively, these studies have highlighted the Se-dependent intracellular activities of SELENBP1 and a prognostic value of its expression levels in tumors as a biomarker of disease severity.

Alterations in Se blood levels and differences in the concentration of extracellular selenoproteins appear to be of similar relevance for health and disease. There are three major Se-containing circulating proteins, i.e., the plasma glutathione peroxidase (GPX3), the Se transport protein selenoprotein P (SELENOP) and selenomethionine-containing albumin. Under normal conditions, SELENOP constitutes the major fraction of extracellular Se [4], whereas the contribution of selenomethionine-containing albumin to total Se concentration in blood largely depends on the dietary intake of selenomethionine [18]. Circulating GPX3 is mainly derived from the kidneys and is regulated by hypoxia, oxidative stress and Se status [19]. Genetic inactivation of the murine *Gpx3* gene has not resulted in a major phenotype, except for effects on Se status [20]. The inactivation of *Selenop* in mice gave rise to a complex phenotype with male infertility, growth defects, oxidative stress and neurological impairment [21,22]. In patients, low SELENOP concentrations have been observed in sepsis [23], inflammatory bowel disease [24] or steatohepatitis [25] and shown to correlate to poor survival in renal cancer [26], sepsis [27] or after major trauma [28].

Information on the role and regulation of extracellular SELENBP1 is sparse. A recent report identified the protein in urine as a novel and early biomarker of acute kidney injury [29] and we described increased SELENBP1 concentrations in patients with acute coronary syndrome at high risk of major cardiac events [30]. Cardiac surgery negatively affects Se status and Se deficiency increases the risk of ischaemic heart disease [31] and promotes organ dysfunction after cardiac surgery [32]. To better characterize circulating SELENBP1 as a biomarker of myocardial stress, we monitored its concentration in patients undergoing surgery with cardioplegia-induced myocardial arrest and the use of a cardio-pulmonary bypass (CPB) and evaluated its potential diagnostic value with respect to convalescence and survival.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Patients

In this study, consecutive patients scheduled for elective cardiac surgery with a necessity for the use of a cardiopulmonary bypass (CPB) and cardioplegia-induced myocardial arrest were invited to participate in this analytical study. The protocol was approved by the local institutional review board (Ethics committee, RWTH Aachen University, Germany), registered at [ClinicalTrials.gov](https://ClinicalTrials.gov) ([ClinicalTrials.gov](https://ClinicalTrials.gov) identifier: NCT0126772), and all participants provided informed written consent. Adult patients scheduled for elective cardiac surgery were included, and patients who were unable to give informed consent, patients with suspicious or proven pregnancy or malignancy, and patients with perioperative infections were excluded.

### 2.2. Clinical Examination, Sample Collection and Analysis

Relevant clinical data were recorded as part of the clinical routine. Serum samples were taken from the central venous line after the induction of anaesthesia (pre-operative) 45 min after the institution of CPB (myocardial ischemia), 2 min after opening of the cross-clamps (myocardial reperfusion), 15 min after weaning from the CPB, as well as 1 h, 6 h and 24 h after admission to the ICU. Samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. Several routine parameters were analyzed by the clinical laboratory at Uniklinik RWTH Aachen. SELENBP1 was measured as described earlier [30] at Institut für Experimentelle Endokriologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin. Intra- and inter-assay coefficients of variation of SELENBP1 were below 10% each.

### 2.3. Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using freely available statistical software (R 3.5.1, The R Foundation for Statistical Computing). Normal distribution of data was assessed by sample size or visual inspection of the Q-Q plot. Welch's t-test was applied for discrete data if normality could be assumed. Wilcoxon's rank-sum test was used if data was sparse or not normally distributed. When comparing groups of categorical data, Fisher's exact test was applied or Chi-squared test was used for sufficiently large fields of data. Spearman's rank correlation test was performed for testing for correlations. Friedman's test was used when testing for changes over time due to the data not being normally distributed. Error bars for medians could not be shown, as the test assumes normality. In a post-hoc analysis, all the time-points were compared to baseline using Wilcoxon's signed-rank test. Confidence intervals (CI) and significance were reported for an interval of 0.95 and accordingly an  $\alpha$  of 0.05, if not stated differently. In the graphics and tables, the star symbols denote the level of significance: \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ , and \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ . The following algorithm was used to determine quantiles:  $m = (p + 1)/3$ .  $p[k] = (k-1/3)/(n + 1/3)$ , resulting in  $p[k] = \text{median}[F(x[k])]$ . Cross-tables and empirical receiver-operator-curves (ROC) were used to establish threshold concentrations above which the risk for adverse outcomes increased. If a threshold was found to be of diagnostic or predictive value, the area under the curve (AUC) and p-value were calculated and reported.

### 3. Results

Baseline characteristics of the patients enrolled in the clinical study are provided below. The patients underwent either a single procedure or a procedure combining two or more interventions (Table 1).

**Table 1.** Clinical characteristics of patients in relation to serum selenium-binding protein (1SELENBP1) concentrations.

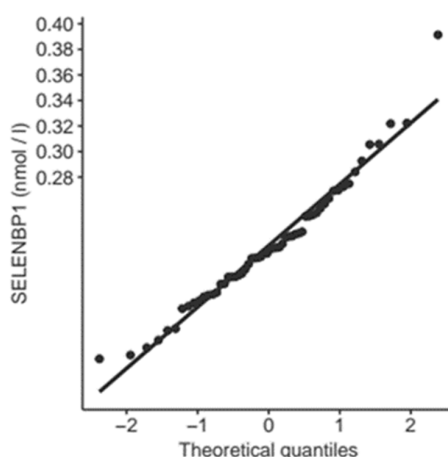
Parameter	Total (n = 66)	SELENBP1-Positive * (n = 18)	SELENBP1-Negative (n = 48)
Age (years)	65 (58–75)	65 (60–75)	66 (56–75)
Female sex (n)	23% (15)	8% (5)	15% (10)
Male sex (n)	77% (51)	20% (13)	58% (38)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27 (25–31)	27 (25–32)	28 (25–30)
EUROscore <sup>1</sup>	4 (2–6)	6 (5–8)	3 (1–6)
Duration of intervention (min)	271 (207–330)	282 (225–317)	265 (200–331)
Duration of CPB (min)	120 (85–149)	148 (126–176)	100 (83–134)
Duration of ischemia (min)	72 (58–107)	112 (93–134)	63 (58–84)
Stay in hospital (days)	9 (7–11)	11 (8–14)	9 (7–10)
Bradycardia (n)	6% (4)	5% (3)	2% (1)
Exitus letalis (n)	5% (3)	5% (3)	0% (0)
Pneumonia (n)	5% (3)	5% (3)	0% (0)
Acute kidney failure (n)	5% (3)	3% (2)	2% (1)
Wound infection (n)	2% (1)	2% (1)	0% (0)
Cerebral ischemia (n)	2% (1)	2% (1)	0% (0)

Data are expressed as % (n) or median (IQR); \* SELENBP1 positive; serum SELENBP1 concentration > 0.96 nM at 1 h after arrival on the ICU; <sup>1</sup> EURO score; system to assess early mortality after cardiac surgery, according to Nashed et al. [33].

#### 3.1. Preoperative Status of SELENBP1 Follows a Normal Distribution

The patients analyzed in this study underwent elective cardiac surgery, as opposed to an acute emergency procedure. For this reason, it was assumed that baseline serum SELENBP1 concentrations would follow a normal distribution before the intervention. Indeed, SELENBP1 values were normally distributed with the 99th percentile at 0.4 nM and the mean + 2.5 standard deviations at 0.3 nM (Figure 1), similarly to the values reported from a healthy cohort [30]. Baseline SELENBP1 concentrations were

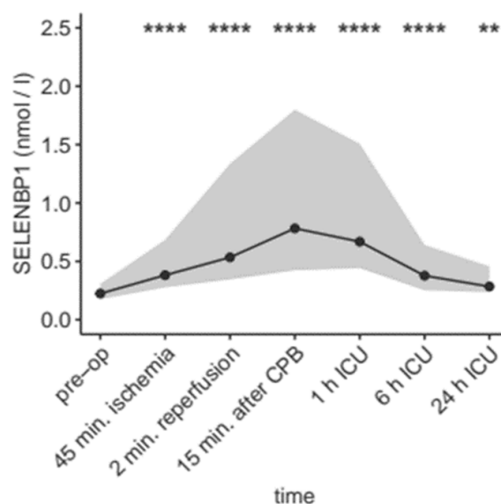
not related to perioperative risk as assessed with the EUROscore (Table 1). Two outliers were identified who started with markedly elevated baseline concentrations of circulating SELENBP1 ( $z = 178.2$  and  $z = 23.6$ , respectively).



**Figure 1.** QQ-Plot of SELENBP1 in serum at baseline. The plot indicates the distribution of serum SELENBP1 concentrations at baseline before surgical intervention. The straight line indicates a normal distribution ( $R^2 = 0.96$ ,  $p < 0.0001$ ).

### 3.2. Intraoperative and Postoperative Kinetics of SELENBP1 Indicate a Transient Increase

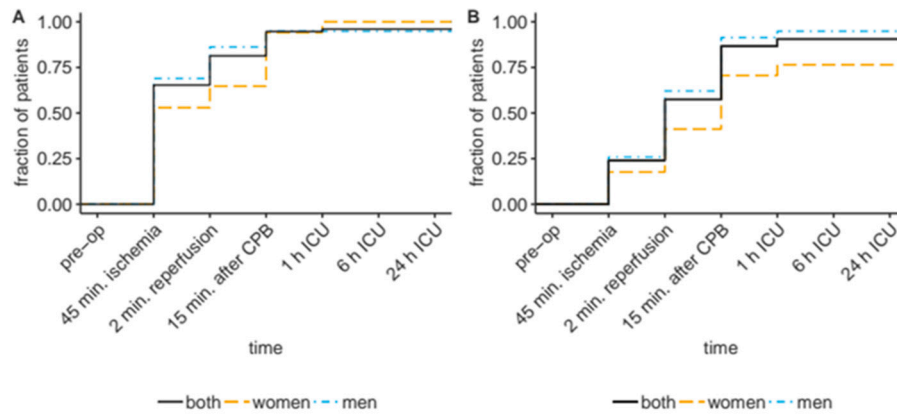
The blood samples taken at different time points during and after the surgical procedure were analyzed in order to assess the kinetics of circulating SELENBP1. The serum concentrations significantly increased as compared to baseline over the full course of the treatment (Figure 2).



**Figure 2.** SELENBP1 before, during and after surgery. Median and 10th–90th percentile of serum SELENBP1 concentrations are provided. CPB: cardio-pulmonary bypass, ICU: intensive care unit. The values were compared to baseline by Wilcoxon's signed-rank test. \*\*,  $p = 0.0072$ , \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ .

During intervention, serum concentrations of SELENBP1 increased by  $\geq 20\%$  in  $n = 72$  of the cardiac patients (96%, Figure 3A), and 68 patients (91%, Figure 3B) surpassed the cut-off at 0.46 nM, determined earlier as the threshold for an increased risk of death or other major adverse cardiac event in patients with suspected myocardial infarction [30]. The SELENBP1 concentrations increased until 2 min after reperfusion in 61 patients (81%), and until 15 min after weaning from the CPB in 71 patients (95%). Notably, the increase was transient, highlighting an inducing stimulus of short duration. Declining serum concentrations of SELENBP1 were observed in 65 patients (87%) within

the first 6 h after admission to the ICU and in 70 patients (93%) within 24 h after admission to the ICU. In total, 74 patients (99%) showed a transient increase in serum SELENBP1 concentrations after reperfusion and qualified as responders in our hypothesis.

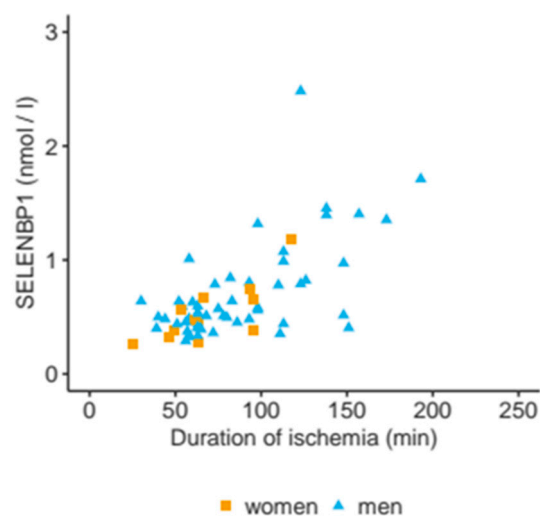


**Figure 3.** Transient SELENBP1 increased above thresholds. (A) Almost all the patients displayed elevated serum SELENBP1 concentrations during the intervention, as judged by an increase of at least 20% in comparison to pre-op levels, or (B) by surpassing a predefined cut-off value (0.455 nM), or an increase by  $\geq 20\%$  if the pre-op level was already elevated and  $>0.455$  nM (empirical cumulative distribution).

### 3.3. Serum SELENBP1 Concentrations Correlate to the Duration of Ischemia

Cardioplegia and the CPB exert a severe stress on the myocardium and the whole organism.

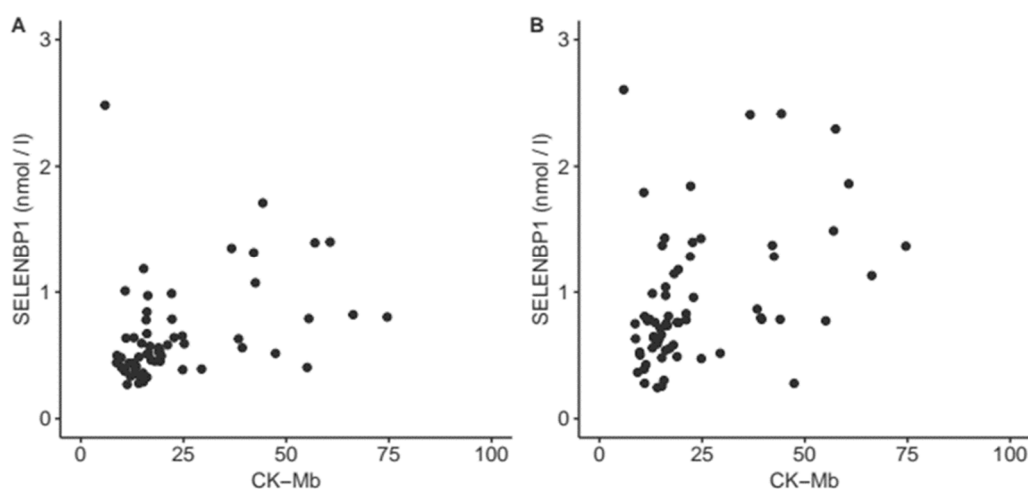
Both interventions are related to ischemia of the heart and may constitute the major stimulus for the release of SELENBP1 into the bloodstream. Accordingly, a strong association of serum SELENBP1 concentrations with the duration of ischemia was observed already at 2 min after reperfusion ( $\rho = 0.5$ ,  $p < 0.0001$ ), and at 15 min after weaning from the CPB ( $\rho = 0.6$ ,  $p < 0.0001$ , Figure 4). Serum SELENBP1 was slightly lower in female than in male patients at 15 min after CPB (median for female sex: 0.6 nM vs. male sex: 0.8 nM,  $p = 0.043$ ). Fewer female patients showed a rise in SELENBP1 concentrations until 2 min after reperfusion (0.6 of female patients vs. 0.9 of male patients,  $p = 0.045$ ), indicating a slightly lower velocity. The peak values did not differ significantly between the sexes.



**Figure 4.** Correlation of serum SELENBP1 concentrations with duration of ischemia. Serum SELENBP1 concentrations were determined at 15 min after weaning from the CBP and are displayed in relation to duration of ischemia. A linear correlation is observed ( $\rho = 0.6$ ,  $p < 0.0001$ ).

### 3.4. Elevated Serum SELENBP1 Concentrations Predict Myocardial Damage

Circulating concentrations of SELENBP1 were unrelated to many routine laboratory markers in patients attending the emergency ward for chest pain, like troponin T, creatinine, the heart-specific isoform of creatine kinase (CK-MB), the liver enzymes ASAT or ALAT, white blood cell count (WBC), potassium or others [30]. In contrast to the former study, this analysis used samples where the time points for analysis were controlled tightly and were pre-defined, allowing a close monitoring and comparison of the kinetic behavior of cardiac biomarkers. Serum SELENBP1 concentrations increased already intraoperatively (2 min after reperfusion or 15 min after weaning from the CPB) and correlated positively to the CK-MB values measured after the intervention. This result indicates that a rise in serum SELENBP1 concentrations constituted an early event and preceded a rise in CK-MB concentrations as a marker for myocardial damage (Figure 5).



**Figure 5.** Correlation of intraoperative serum SELENBP1 concentrations with heart-specific creatinine kinase (CK-MB) after surgery. Serum SELENBP1 measured during intervention and heart-specific CK-MB concentrations measured after intervention display a positive correlation, both to the SELENBP1 concentrations measured at (A) 2 min after reperfusion ( $\rho = 0.5$ ,  $p < 0.0001$ ), and at (B) 15 min after weaning from the CBP ( $\rho = 0.4$ ,  $p = 0.0007$ ), respectively.

### 3.5. Elevated Serum SELENBP1 Concentrations Are Indicative of Adverse Outcomes

Next, the potential association of serum SELENBP1 with adverse outcomes was evaluated. The elevated serum concentrations of SELENBP1 were significantly associated with adverse outcomes, and predictive to discriminate patients at risk from those with negligible risk for death, bradycardia, cerebral ischemia, stay at the ICU for > 40 days, acute kidney injury or pneumonia (Table 2).

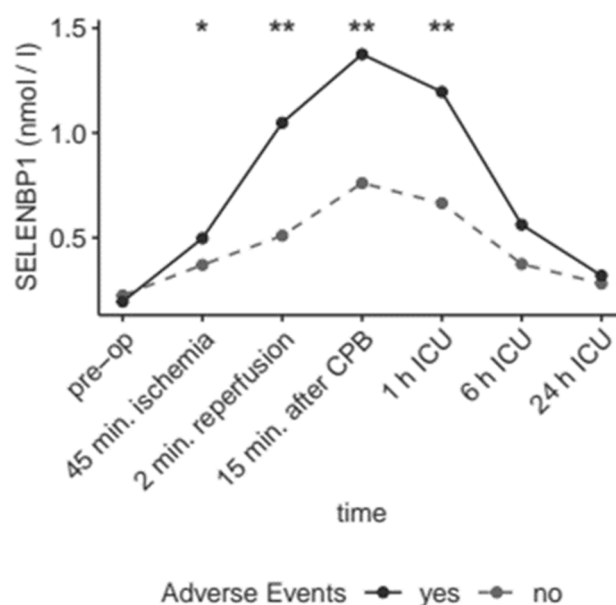
Patients suffering from bradycardia, death, or cerebral ischemia (combined endpoint 1) displayed markedly elevated serum concentrations of SELENBP1 at several points compared to those patients without any of these serious events ( $p = 0.033$  at 45 min after induction of ischemia,  $p = 0.0051$  at 2 min after reperfusion,  $p = 0.0011$  at 15 min after weaning from the CPB, and  $p = 0.0017$  at 1 h after arrival on the ICU) (Figure 6).



**Table 2.** Association of elevated serum SELENBP1 concentrations with adverse outcomes.

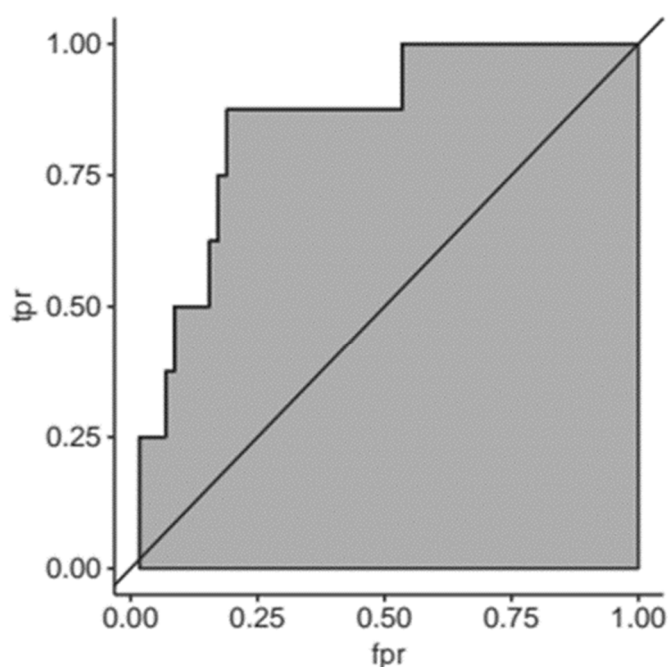
Parameter	Threshold [nM]	OR	CI	p	PPV	NPV	AUC	n
15 min after CPB								
combined endpoint 1 *	0.988	22	3–194	0.0005	0.333	0.978	0.84	8
combined endpoint 2 *	0.820	18	2–152	0.0011	0.310	0.976	0.81	9
1 h ICU								
death	2.238	124	6.2777	0.0042	0.667	0.984	0.92	2
acute kidney injury	0.889	20	1–411	0.029	0.158	1.000	0.83	4
combined endpoint 1 *	0.956	30	3–269	0.0003	0.389	0.979	0.84	7
combined endpoint 2 *	0.889	33	4–296	<0.0001	0.421	0.979	0.84	7
6 h ICU								
death	1.292	63	4–1018	0.0077	0.500	0.984	0.88	3
maximal levels								
bradycardia	0.988	23	1–439	0.014	0.167	1.000	0.81	5
cerebral ischemia	1.396	25	1–544	0.034	0.143	1.000	0.90	3
combined endpoint 1 *	0.988	25	3–215	0.0003	0.333	0.980	0.88	8
combined endpoint 2 *	0.968	24	3–199	0.0003	0.333	0.979	0.86	9
stay in ICU for >40 day	0.870	4	1–10	0.013	0.484	0.795	0.70	14

\* Combined endpoints; combined endpoint 1 comprises bradycardia, death, and cerebral ischemia; combined endpoint 2 comprises bradycardia, death, cerebral ischemia, as well as acute kidney injury. OR; odds ratio; CI, confidence interval; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value, AUC, area under the curve.



**Figure 6.** SELENBP1 before, during and after cardiac surgery in relation to outcome. Elevated serum SELENBP1 concentrations are associated with adverse events during the full course of surgery, especially directly after reperfusion, after weaning from the CPB, and shortly after arriving on the ICU. Adverse events comprise death, cerebral ischemia, bradycardia ( $p = 0.033$  for 45 min after induction of ischemia,  $p = 0.0051$  for 2 min after reperfusion,  $p = 0.0011$  for 15 min after weaning from the CPB, and  $p = 0.0017$  for 1 h after arrival on the ICU) (AUC; 0.8). \*\*,  $p < 0.01$ , \*,  $p < 0.05$ .

The clinical data along with the information on serum SELENBP1 were finally used to conduct a Receiver-Operator-Curve (ROC) analysis for predicting adverse events on the basis of elevated serum concentrations of SELENBP1 (Figure 7).



**Figure 7.** Receiver-Operator-Curve (ROC) analysis for SELENBP1 predicting adverse events. The receiver-operator-analysis for SELENBP1 concentrations and adverse events (death, cerebral ischemia, bradycardia) indicates a relatively meaningful predictive value (AUC; 0.8).

#### 4. Discussion

In this study, circulating SELENBP1 concentrations were monitored in patients undergoing cardiac surgery along the time span from preparation for the intervention until 24 h after arriving at the ICU. The surgical intervention involved a CPB, and this procedure constitutes a clinical model for ischemia and reperfusion. Importantly, all time points could be reliably analyzed as the patients were not arriving at the hospital after an adverse incidence but underwent an elective and tightly scheduled procedure. To our surprise, a strong increase in serum SELENBP1 concentrations was detected in all but one patient. The SELENBP1 concentrations in serum reflected the myocardial damage already during surgery and nicely correlated with the levels of the heart-specific isoform of creatine kinase (CK-MB) measured after the intervention. The comparison of serum SELENBP1 concentrations with the duration of ischemia indicated an almost linear relationship, suggesting that serum SELENBP1 constituted a reliable novel marker of myocardial stress.

This notion is supported by the strong association of circulating SELENBP1 levels during and directly after the procedure, with a higher mortality risk and incidence rate of adverse events, including, e.g., length of stay at the ICU, bradycardia or cerebral ischemia. The thresholds with good positive and strong negative predictive power were in the same range as determined before in relation to chest pain and suspected myocardial infarction [30]. Collectively, serum concentrations of SELENBP1 seem to reliably indicate severe cardiac damage in patients, whereas no relevant amounts of serum SELENBP1 were detectable under control conditions in healthy subjects where SELENBP1 is located intracellularly [10,14,34]. Notably, the increased levels and fast kinetics of circulating SELENBP1 were not affected by traditional risk-factors and the baseline values did not reflect perioperative risk as assessed by the EURO-Score [33], supporting the notion that circulating SELENBP1 reflects acute events rather than indicating chronic risk-related factors. It remains to be studied whether the extent of SELENBP1 release is related to baseline Se status, as determined by the activity of circulating GPX3, SELENOP or total serum Se concentrations, and whether SELENBP1 is increased in chronic inflammatory heart disease as a potentially valuable prospective biomarker.

The previous study indicated that elevated serum concentrations of SELENBP1 in patients suspected of myocardial infarction were indicative of a higher mortality and other major adverse cardiac events [30]. There were no significant correlations with the commonly used clinical markers, such as troponin, as measured with a high-sensitivity assay, aspartate aminotransferase, creatinine, fibrinogen, prothrombin time or blood cell counts [30]. Consequently, we assumed that the stimulus for the release of SELENBP1 into the bloodstream should be different from necrosis of cardiomyocytes, which would be associated with increased circulating cardiac troponins. The fast appearance of SELENBP1 already during surgery and the linear relationship between circulating SELENBP1 and the duration of myocardial ischemia suggests that SELENBP1 may have been released by cardiomyocytes upon stress and before necrosis. This hypothesis is supported by the moderate linear correlation of serum SELENBP1 during surgery to CK-MB measured at later time-points and the biologically plausible time span needed for necrosis to occur in response to hypoxia and acidosis [35].

Heart tissue is not the only potential source of extracellular SELENBP1, as urinary SELENBP1 was described as a new biomarker of heavy metal-induced kidney injury, where the protein increased strongly in the renal cortex after mercury administration in a rodent model of nephrotoxicity [36]. The authors propose urinary SELENBP1 as a novel sensitive and specific biomarker for early stages of kidney injury before irreversible damage has taken place [29,36]. Accordingly, serum SELENBP1 may indicate severe and acute noxae to cardiomyocytes at an early time point before the onset of necrosis, i.e., at a time when protective measures may possibly reverse the path to cell death. In this context, it may be speculated that a secretion of SELENBP1 caused an associated decline of intracellular Se stores, thereby depriving the cardiomyocyte of the trace element with essential importance for antioxidative defense systems [37]. This notion is supported by clinical studies, where supplementation with Se along with coenzyme Q10 significantly reduced cardiovascular mortality in a prospective randomized double-blind controlled intervention study in European seniors [38].

There was an unexpected small difference between male and female patients concerning the velocity of the increase. However, peak values were similar and larger studies are needed in order to elucidate whether SELENBP1 secretion into the circulation constitutes another example of sex-specific differences in Se metabolism and selenoprotein expression [5]. The initial symptoms, disease development and mortality risk upon myocardial infarction show strong sex-specific differences that attenuate with age, highlighting sex as an important modifier of cardiovascular physiology and heart disease course [39]. It will therefore be important to conduct larger studies with both male and female patients in order to elucidate the importance of sex and age for the increase of circulating SELENBP1 concentrations, its dynamics and predictive value.

A limitation of this clinical study constitutes the relatively small sample size, limiting the results to testing the major hypothesis without providing the power for detailed and stratified analyses of subgroups of patients or sex-specific differences. A major strength of this study was the reliable, sensitive and highly reproducible analytical technique used, i.e., the novel luminometric immunoassay used for SELENBP1 quantification, which is based on specific monoclonal antibodies and is therefore available for verification analyses and additional clinical studies.

## 5. Conclusions

In this study, the kinetics and modifying factors of circulating SELENBP1 in response to myocardial injury were characterized. Increased concentrations reflected the duration of ischemia and myocardial damage, and reliably identified patients at risk of adverse outcomes. It is hoped that these insights will be useful for improving the care of cardiac surgery patients and help to identifying individuals with high risks for adverse events in order to raise increased attention and enable fast curative measures when first signs of worsening of the clinical condition become apparent.

**Author Contributions:** E.C.D.K.-H., E.C.K., C.S. (Christian Stoppe) and L.S. designed the study. E.C.D.K.-H. and E.C.K. did the statistical analyses. E.C.D.K.-H., E.C.K., C.S. (Christian Stoppe) and LS wrote the manuscript. E.C.D.K.-H., E.C.K., J.N., S.W., J.S., C.S. (Christian Schwiebert), W.B.M. and C.S. (Christian Stoppe) collected the

material and conducted the measurements, respectively. All authors critically reviewed the final manuscript and approved its submission.

**Funding:** Schomburg and Stoppe were supported by grants from Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG Research Unit 2558 TraceAge, Scho 849/6-1 to LS; and STO 1099/-2 to CS). In addition, we acknowledge support from the DFG and the Open Access Publication Fund of Charité – Universitätsmedizin Berlin.

**Acknowledgments:** We thank Vartitir Seher and Katja Schreiber for excellent technical support, and Andreas Goetzenich, RWTH Aachen, for helpful advice during the initiation of this study.

**Conflicts of Interest:** J.N., S.W., J.S., C.S. (Christian Schwiebert) and C.S. (Christian Stoppe) have nothing to declare in relation to this study. L.S. holds shares in selenOmed GmbH, a company involved in Se status assessment and supplementation. E.C.D.K.-H., E.C.K., W.B.M. and L.S. are named as inventors on a related patent application.

## References

1. Hondal, R.J.; Marino, S.M.; Gladyshev, V.N. Selenocysteine in thiol/disulfide-like exchange reactions. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *18*, 1675–1689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Brigelius-Flohé, R.; Flohé, L. Selenium and redox signaling. *Arch. Biochem. Biophys.* **2017**, *617*, 48–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Méplán, C. Selenium and chronic diseases: A nutritional genomics perspective. *Nutrients* **2015**, *7*, 3621–3651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Burk, R.F.; Hill, K.E. Regulation of Selenium Metabolism and Transport. *Ann. Rev. Nutr.* **2015**, *35*, 109–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Schomburg, L.; Schweizer, U. Hierarchical regulation of selenoprotein expression and sex-specific effects of selenium. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1790*, 1453–1462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Schomburg, L.; Riese, C.; Renko, K.; Schweizer, U. Effect of age on sexually dimorphic selenoprotein expression in mice. *Biol. Chem.* **2007**, *388*, 1035–1041. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Rayman, M.P. Food-chain selenium and human health: Emphasis on intake. *Br. J. Nutr.* **2008**, *100*, 254–268. [[CrossRef](#)]
8. Labunskyy, V.M.; Hatfield, D.L.; Gladyshev, V.N. Selenoproteins: Molecular pathways and physiological roles. *Physiol. Rev.* **2014**, *94*, 739–777. [[CrossRef](#)]
9. Bansal, M.P.; Oborn, C.J.; Danielson, K.G.; Medina, D. Evidence for two selenium-binding proteins distinct from glutathione peroxidase in mouse liver. *Carcinogenesis* **1989**, *10*, 541–546. [[CrossRef](#)]
10. Elhodaky, M.; Diamond, A.M. Selenium-Binding Protein 1 in Human Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3437. [[CrossRef](#)]
11. Chang, P.W.; Tsui, S.K.; Liew, C.; Lee, C.C.; Waye, M.M.; Fung, K.P. Isolation, characterization, and chromosomal mapping of a novel cDNA clone encoding human selenium binding protein. *J. Cell Biochem.* **1997**, *64*, 217–224. [[CrossRef](#)]
12. Lanfear, J.; Fleming, J.; Walker, M.; Harrison, P. Different patterns of regulation of the genes encoding the closely related 56 kDa selenium- and acetaminophen-binding proteins in normal tissues and during carcinogenesis. *Carcinogenesis* **1993**, *14*, 335–340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Yang, M.; Sytkowski, A.J. Differential expression and androgen regulation of the human selenium-binding protein gene hSP56 in prostate cancer cells. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 3150–3153. [[PubMed](#)]
14. Fang, W.; Goldberg, M.L.; Pohl, N.M.; Bi, X.; Tong, C.; Xiong, B.; Koh, T.J.; Diamond, A.M.; Yang, W. Functional and physical interaction between the selenium-binding protein 1 (SBP1) and the glutathione peroxidase 1 selenoprotein. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 1360–1366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Xia, Y.J.; Ma, Y.Y.; He, X.J.; Wang, H.J.; Ye, Z.Y.; Tao, H.Q. Suppression of selenium-binding protein 1 in gastric cancer is associated with poor survival. *Hum. Pathol.* **2011**, *42*, 1620–1628. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Zhang, S.; Li, F.; Younes, M.; Liu, H.; Chen, C.; Yao, Q. Reduced selenium-binding protein 1 in breast cancer correlates with poor survival and resistance to the anti-proliferative effects of selenium. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e63702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ha, Y.S.; Lee, G.T.; Kim, Y.H.; Kwon, S.Y.; Choi, S.H.; Kim, T.H.; Kwon, T.G.; Yun, S.J.; Kim, I.Y.; Kim, W.J. Decreased selenium-binding protein 1 mRNA expression is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma. *World J. Surg. Oncol.* **2014**, *12*, 288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Burk, R.F.; Hill, K.E.; Motley, A.K. Plasma selenium in specific and non-specific forms. *BioFactors* **2001**, *14*, 107–114. [[CrossRef](#)]

19. Bierl, C.; Voetsch, B.; Jin, R.C.; Handy, D.E.; Loscalzo, J. Determinants of human plasma glutathione peroxidase (GPx-3) expression. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 26839–26845. [[CrossRef](#)]
20. Burk, R.F.; Olson, G.E.; Winfrey, V.P.; Hill, K.E.; Yin, D. Glutathione peroxidase-3 produced by the kidney binds to a population of basement membranes in the gastrointestinal tract and in other tissues. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2011**, *301*, G32–G38. [[CrossRef](#)]
21. Schomburg, L.; Schweizer, U.; Holtmann, B.; Flohé, L.; Sendtner, M.; Köhrle, J. Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *Biochem. J.* **2003**, *370*, 397–402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Hill, K.E.; Zhou, J.; McMahan, W.J.; Motley, A.K.; Atkins, J.F.; Gesteland, R.F.; Burk, R.F. Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 13640–13646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Hollenbach, B.; Morgenthaler, N.G.; 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. Organ Soc. Miner. Trace Elem. (GMS)* **2008**, *22*, 24–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Barrett, C.W.; Short, S.P.; Williams, C.S. Selenoproteins and oxidative stress-induced inflammatory tumorigenesis in the gut. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2017**, *74*, 607–616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Polyzos, S.A.; Kountouras, J.; Mavrouli, M.; Katsinelos, P.; Douberis, M.; Gavana, E.; Duntas, L. Selenoprotein P in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes Off. J. Ger. Soc. Endocrinol. Ger. Diabetes Assoc.* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Meyer, H.A.; Endermann, T.; Stephan, C.; Stoedter, M.; Behrends, T.; Wolff, I.; Jung, K.; Schomburg, L. Selenoprotein P status correlates to cancer-specific mortality in renal cancer patients. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e46644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Forceville, X.; Mostert, V.; Pierantoni, A.; Vitoux, D.; Le Toumelin, P.; Plouvier, E.; Dehoux, M.; Thuillier, F.; Combes, A. Selenoprotein P, rather than glutathione peroxidase, as a potential marker of septic shock and related syndromes. *Eur. Surg. Res. Eur. Chir. Forsch. Rech. Chir. Eur.* **2009**, *43*, 338–347. [[CrossRef](#)]
28. Braunstein, M.; Kusmenkov, T.; Zuck, C.; Angstwurm, M.; Becker, N.P.; Bocker, W.; Schomburg, L.; Bogner-Flatz, V. Selenium and Selenoprotein P Deficiency Correlates with Complications and Adverse Outcome After Major Trauma. *Shock (AugustaGa)* **2019**. [[CrossRef](#)]
29. Kim, K.S.; Yang, H.Y.; Song, H.; Kang, Y.R.; Kwon, J.; An, J.; Son, J.Y.; Kwack, S.J.; Kim, Y.M.; Bae, O.N.; et al. Identification of a sensitive urinary biomarker, selenium-binding protein 1, for early detection of acute kidney injury. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* **2017**, *80*, 453–464. [[CrossRef](#)]
30. Kühn, E.C.; Slagman, A.; Kühn-Heid, E.C.D.; Seelig, J.; Schwiebert, C.; Minich, W.B.; Stoppe, C.; Möckel, M.; Schomburg, L. Circulating levels of selenium-binding protein 1 (SELENBP1) are associated with risk for major adverse cardiac events and death. *J. Trace Elem. Med. Biol. Organ Soc. Miner. Trace Elem. (GMS)* **2019**, *52*, 247–253. [[CrossRef](#)]
31. Suadican, P.; Hein, H.O.; Gyntelberg, F. Serum selenium concentration and risk of ischaemic heart disease in a prospective cohort study of 3000 males. *Atherosclerosis* **1992**, *96*, 33–42. [[CrossRef](#)]
32. Wendt, S.; Schomburg, L.; Manzanares, W.; Stoppe, C. Selenium in Cardiac Surgery. *Nutr. Clin. Pract. Off. Publ. Am. Soc. Parenter. Enter. Nutr.* **2019**, *34*, 528–539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Nashef, S.A.; Roques, F.; Michel, P.; Gauducheau, E.; Lemeshow, S.; Salamon, R. European system for cardiac operative risk evaluation (EuroSCORE). *Eur. J. Cardio Thorac. Surg.* **1999**, *16*, 9–13. [[CrossRef](#)]
34. Ying, Q.; Ansong, E.; Diamond, A.M.; Yang, W. A Critical Role for Cysteine 57 in the Biological Functions of Selenium Binding Protein-1. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 27599–27608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Graham, R.M.; Frazier, D.P.; Thompson, J.W.; Haliko, S.; Li, H.; Wasserlauf, B.J.; Spiga, M.G.; Bishopric, N.H.; Webster, K.A. A unique pathway of cardiac myocyte death caused by hypoxia-acidosis. *J. Exp. Biol.* **2004**, *207*, 3189–3200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lee, E.K.; Shin, Y.J.; Park, E.Y.; Kim, N.D.; Moon, A.; Kwack, S.J.; Son, J.Y.; Kacew, S.; Lee, B.M.; Bae, O.N.; et al. Selenium-binding protein 1: A sensitive urinary biomarker to detect heavy metal-induced nephrotoxicity. *Arch. Toxicol.* **2017**, *91*, 1635–1648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Boucher, F.R.; Jouan, M.G.; Moro, C.; Rakotvoa, A.N.; Tanguy, S.; de Leiris, J. Does selenium exert cardioprotective effects against oxidative stress in myocardial ischemia? *Acta Physiol. Hung.* **2008**, *95*, 187–194. [[CrossRef](#)]

38. Alehagen, U.; Aaseth, J.; Johansson, P. Reduced Cardiovascular Mortality 10 Years after Supplementation with Selenium and Coenzyme Q10 for Four Years: Follow-Up Results of a Prospective Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial in Elderly Citizens. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0141641. [[CrossRef](#)]
39. Canto, J.G.; Rogers, W.J.; Goldberg, R.J.; Peterson, E.D.; Wenger, N.K.; Vaccarino, V.; Kiefe, C.I.; Frederick, P.D.; Sopko, G.; Zheng, Z.J.; et al. Association of age and sex with myocardial infarction symptom presentation and in-hospital mortality. *JAMA* **2012**, *307*, 813–822. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## **Lebenslauf**

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

## Publikationsliste

1. Pilli T, Cantara S, Schomburg L, Cenci V, Cardinale S, Heid E C D, **Kühn E C**, Cevenini G, Sestini F, Fioravanti C, D'Hauw G, Pacini F.

*IFN $\gamma$ -Inducible Chemokines Decrease upon Selenomethionine Supplementation in Women with Euthyroid Autoimmune Thyroiditis: Comparison between Two Doses of Selenomethionine (80 or 160  $\mu$ g) versus Placebo.*

Eur Thyroid J. 2015;4(4):226-233. doi:10.1159/000439589

Journal Impact Factor: 3,025 (Journal Citation Report 2018)

2. **Kühn E C**, Slagman A, Kühn-Heid E C D, Seelig J, Schwiebert C, Minich W B, Stoppe C, Möckel M, Schomburg L.

*Circulating levels of selenium-binding protein 1 (SELENBP1) are associated with risk for major adverse cardiac events and death.*

J Trace Elem Med Biol. 2019;52:247-253. doi:10.1016/j.jtemb.2019.01.005

Journal Impact Factor: 3,755 (Journal Citation Report 2017)

3. Kühn-Heid E C D, **Kühn E C**, Ney J, Wendt S, Seelig J, Schwiebert C, Minich W B, Stoppe C, Schomburg L.

*Selenium-Binding Protein 1 Indicates Myocardial Stress and Risk for Adverse Outcome in Cardiac Surgery.*

Nutrients. 2019;11(9). doi:10.3390/nu11092005

Journal Impact Factor: 4,171 (Journal Citation Report 2018)



## Danksagungen

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Lutz Schomburg danken - für seine Unterstützung, für viele spannende Diskussionen, für wertvollen Rat und eine stets offene Tür. Seine stets ansteckende Begeisterung für praktisch jedes Thema und seine unkonventionelle Herangehensweise, um die vielen aufkommenden kleineren und größeren Fragestellungen auch alle beantworten zu können, haben mich durch diese Dissertation getragen und meine Augen für „Wissenschaft“ geöffnet. In bester Erinnerung bleiben die vielen Abende und Blutentnahmen für Versuche mit kleiner Fallzahl, um schnell und unkompliziert Fragen zu beantworten, der Kontakt zu einer Gruppe ganz besonderer Menschen mit einer seltenen Erkrankung und eine Reise an den Entdeckungsort des Selens.

Ich möchte mich bei Herrn Dr. Waldemar Minich bedanken, der mich bei meinen ersten Schritten im Labor an die Hand nahm und dessen Rat und Gespür bei methodischen Fragen sich als unglaublich hilfreich erwies.

Mein Dank geht auch an Frau Dr. Sandra Hybsier, die ihre Expertise bei der Assay-Entwicklung gerne teilte, an Herrn Dr. Eddy Rintjies, der sich immer Zeit nahm, wenn es Fragen zur Statistik gab, und an das unglaublich tolle Team der experimentellen Endokrinologie für die schöne Zusammenarbeit, offenen Ohren und helfenden Hände.

Zu guter Letzt danke ich meiner tollen Frau, Ellen Kühn-Heid, für die schöne Zusammenarbeit im Labor - und viel wichtiger noch für die Unterstützung im restlichen Teil meines Lebens, in dem sie stets verlässlicher Anker und Quell großer Freude ist, und meiner Familie für die tolle und bedingungslose Unterstützung.