

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

DISSERTATION

**Regulation von Selenoproteinen
in inflammatorischen Erkrankungen und durch
synthetische Selenverbindungen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

.....Mette Stuedter.....

aus Dannenberg/Elbe

Datum der Promotion: 11.12.2015.....

Gutachter: 1. N. N.....
2. N. N.....
3. N. N.....



<http://acrazychicken.blogspot.de/2012/01/when-selene-first-mooned-xerox-machine.html>

INHALTSVERZEICHNIS

1. Abkürzungen	6
2. Zusammenfassung	7
2.1 <i>Deutscher Abstract</i>	7
2.2 <i>Englischer Abstract</i>	8
3. Einleitung	9
4. Zielsetzung	10
5. Methodik	11
5.1 <i>Selenbestimmung</i>	11
5.2 <i>Detektion von Proteinen</i>	11
5.3 <i>Genexpressionsanalysen</i>	11
5.4 <i>Enzymassays</i>	11
5.5 <i>Zytokinbestimmung</i>	12
5.6 <i>Sepsis-Modell</i>	12
5.7 <i>Statistik</i>	12
6. Ergebnisse	13
6.1 <i>Regulation der Selenoprotein-Biosynthese durch eine APR</i>	13
6.2 <i>Geschlechter-spezifische Effekte in einer therapeutischen Se-Supplementation in der Maus</i>	13
6.3 <i>Struktur- und Zelltyp-spezifische Effekte von Imidoselenocarbamaten</i>	15
6.4 <i>Hypoxie als grundlegender Modulator der Selenoprotein-Expression</i>	17
6.5 <i>Selenocarbamate als potente Induktoren der DIO-Expression</i>	18
7. Diskussion	20
8. Literaturverzeichnis	25
9. Eidesstattliche Versicherung	27
10. Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen	28

<i>10.1 Selenium controls the sex-specific immune response and selenoprotein expression during the acute-phase response in mice</i>	28
<i>10.2 Structure- and cell-specific effects of imidoselenocarbamates on selenoprotein expression and activity in liver cells in culture.</i>	38
<i>10.3 Hypoxia reduces and redirects selenoprotein biosynthesis.</i>	49
<i>10.4 Strong induction of iodothyronine deiodinases by chemotherapeutic selenocompounds.</i>	57
11. Lebenslauf	65
12. komplette Publikationsliste	66
13. Danksagung	67

1. Abkürzungen

AK	Antikörper
APR	Akutphase Reaktion
cGPx	Cytosolische GPx
CIMA	Centro de Investigación Médica Aplicada
DIO	Dejodase
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GI-GPx	Gastrointestinale GPx
GPx	Glutathionperoxidase
GSSG	oxidiertes Glutathion
h	Stunde
HRP	Horseradish peroxidase
IL-6	Interleukin 6
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat,
nM	Nanomolar
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pGPx	Plasma GPx
PH-GPx	Phospholipid-Hydroperoxid GPx
ppm	Parts per million
qRT-PCR	quantitative Real-time PCR
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Se	Selen
Sec	Selenocystein
SepS; SELS	Selenoprotein S
SePP	Selenoprotein P
SIC	Selenium in Intensive Care
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TRFA	Totalreflektions-Röntgenfluoreszenzanalyse
TxnRd; TXNRD	Thioredoxinreduktase
T3	L-3,5,3`-Triiodthyronin
μM	Mikromolar

2. Zusammenfassung

2.1 Deutscher Abstract

Selen ist ein essentielles Spurenelement, das über den Einbau als 21-ste proteinogene Aminosäure Selenocystein einer kleinen Gruppe von Selenoproteinen den Namen gibt und als Bestandteil des aktiven Zentrums dieser Proteine die enzymatische Katalyse bestimmter Reaktionen ermöglicht. In der Evolution haben sich eine komplexe Synthesemaschinerie zur Biosynthese von Selenoproteinen und besondere Regulationsmechanismen zur Kontrolle der Expressionsraten entwickelt. Selenoproteine sind von besonderer Bedeutung für den Energiestoffwechsel, die Schilddrüse und das Immunsystem. In der Klinik wird Selen als Supplement zur Unterstützung des Immunsystems und zum Ausgleich des Selenverlustes bei Sepsis eingesetzt. Allerdings sind die molekularen Mechanismen des Selenverlustes in Sepsis nicht verstanden, und es herrscht Uneinigkeit über die Wirkung verschiedener Formen selenhaltiger Supplemente. Diese beiden Punkte stehen im Zentrum meiner Arbeit.

In einem murinen Sepsis-Modell wurde durch Endotoxin eine Akutphasenreaktion hervorgerufen. Es zeigte sich eine streng hierarchische Verteilung des verfügbaren Selens auf die Biosynthese der unterschiedlichen Selenoproteine, die darüber hinaus auch geschlechterspezifisch war. Der Selentransporter SePP erwies sich als stabiler Selenbiomarker und als Negativ-Akutphase-Protein, während das ER-residente Selenoprotein SepS als Positiv-Akutphase-Protein eingeordnet werden konnte. Auf molekularer Ebene konnten mit der Regulation geschwindigkeitsbestimmender Proteine des Selenmetabolismus und der Charakterisierung von Hypoxie als starker Modulator der Biosynthese wichtige Mechanismen identifiziert werden, die zu einer Verschiebung der Selenoprotein-Expression in schweren Erkrankungen beitragen. Diese Studien zur Grundlage des Selenstoffwechsels wurden durch Versuche zur Intervention mit neuen selenhaltigen Präparaten ergänzt. Hier konnte mit der Gruppe der Imidoselenocarbamate eine Substanzklasse charakterisiert werden, die therapeutisch vielversprechende Effekte spezifisch in Tumorzellen induzierte und als besonders aktive Induktoren der selenabhängigen Dejodasen wirkt, ohne dabei toxisch zu sein.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit somit neue klinisch relevante Regulationsmechanismen der Expression von Selenoproteinen charakterisiert und mit den Imidoselenocarbamaten eine vielversprechende Substanzklasse für eine zukünftige pharmakologische Intervention identifiziert.

2.2 Englischer Abstract

The view on selenium (Se) changed from a toxic substance to an essential trace element with the discovery of the 21st aminoacid selenocysteine (Sec). Se exerts its biological function as part of Sec-containing selenoproteins. Sec synthesis is mediated by a complex molecular machinery and depends on an optimal selenium status. Se is essential for cellular functions and energy metabolism, thyroid gland and immune system. Se research gained interest by being linked to several diseases through animal and clinical studies. Se is a supplement in the clinics to support the immune system and replenish loss of Se in critical illness. Still, the function of several selenoproteins and the underlying physiological mechanisms controlling Se metabolism are not completely understood or have not even been explored.

The present work includes experimental studies on the role and regulation of Se and selenoproteins in inflammatory diseases. To this end, an endotoxin (LPS)-challenged mouse model with different Se status was analysed, and Se-containing carbamates were characterized in tumor and non-transformed cells. Using LPS-injected mice as sepsis model, our work highlighted a hierarchical distribution of the available Se for the biosyntheses of the selenoproteome. In addition, these regulatory principles acted in a sex-specific way. The secreted SePP proved as stabile Se biomarker in blood. In inflammation, SePP qualified as a hepatic negative acute phase protein whereas SepS was regulated as a positive acute phase protein. SepS is located in the ER membrane and is part of the protein quality control and therefore reduces cellular ER stress.

The second part of my work based on the interesting phenomenon that humans in Se deficient areas are diagnosed more often with cancer than others. In fact, several studies indicate an anticarcinogenic effect of Se. The relevant selenoproteins and physiological mechanisms are unknown. Comparative studies with the chemical class of imidoselenocarbamates using tumor-derived and non-transformed cells showed different effects on translation of different selenoproteins. The specific modulation of the selenoproteome expressed reflects substance- and cell-specific effects of selenocarbamates on specific selenoproteins, but not a general activation of the selenoprotein biosynthesis machinery. Especially methyl-carrying selenocarbamates proved to be efficient modulators. Moreover, this substance class proved to be effective modulators of deiodinase activities without showing toxic effects.

A further characterization of the interaction of selenocompounds with specific selenoproteins and their role in inflammation, cancer and the immune system is needed to provide a better insight into underlying mechanisms needed to optimize Se supplementation.

3. Einleitung

Die griechische Mondgöttin Selene ist Namensgeberin des Spurenelements Selen (Se), das 1817 von dem schwedischen Chemiker Jöns Jakob Berzelius aufgrund seines silbrigen Aussehens entdeckt und so benannt wurde [1]. In den folgenden 150 Jahren wandelte sich dessen Bedeutung immer wieder. Anfänglich als toxisch eingestuft, galt es Anfang 1940 als karzinogen. Erst seit Mitte des 20. Jahrhunderts wurde Se auch als essentielles Spurenelement mit gesundheitsfördernden Eigenschaften durch Schwarz und Foltz erkannt [2]. Seit der Charakterisierung der Glutathionperoxidase (GPx) im Jahr 1973 als Se-abhängiges Enzym, wird dem Spurenelement eine antioxidative Wirkung über den Einbau in Form der 21-ten proteinogenen Aminosäure Selenocystein (Sec) in Selenoproteine zugeschrieben. Damit ist die Wirkung von Se untrennbar mit der Funktion von Selenoproteinen verknüpft. Im Menschen sind bisher 25 Gene bekannt, die für Selenoproteine kodieren, und nur für die Hälfte konnte eine spezifische biologische Funktion definiert werden [3].

Die Biosynthese von Selenoproteinen folgt einem einzigartigen Mechanismus und konnte in den letzten Jahren in Grundzügen aufgeklärt werden. Die mRNA-Transkripte von Selenoproteinen sind durch ein spezifisches UGA-Codon gekennzeichnet, welches im Translationsprozess durch verschiedene cis- und trans-agierenden Faktoren als Sec-Codon interpretiert wird. Nur das reibungslose Zusammenspiel dieser Sec-spezifischen Komponenten und eine ausreichende Se-Verfügbarkeit ermöglicht eine effektive Synthese von funktionellen Selenoproteinen [4, 5]. In den letzten Jahren zeigte sich, dass ein Se-Mangel zur Verstärkung der Symptomatik einiger Erkrankungen führen kann. Dazu gehören z.B. inflammatorische und kardiovaskuläre Erkrankungen, Infektionskrankheiten, Autoimmunerkrankungen sowie einige Krebsarten [6-8]. So konnte in der SIC-Studie gezeigt werden, dass bei Sepsispatienten eine niedrige Gesamt-Se-Konzentration mit einer höheren Mortalitätsrate einhergeht und eine hoch dosierte Se-Substitution die Überlebenschance erhöhte [9]. Hierbei zeigte sich aber ein noch nicht erklärbarer Unterschied zwischen den Geschlechtern [10].

Es stellen sich somit die Fragen nach dem Mechanismus des Se-Defizits bei Sepsis, den Geschlechterunterschieden und geeigneten Se-haltigen Supplementen.

4. Zielsetzung

Europa ist als Se-Mangelgebiet einzustufen. Das zeigt sich u.a. darin, dass in Europäern eine zusätzliche Se-Aufnahme die Konzentration von zirkulierenden Selenoproteinen erhöht. Es wird davon ausgegangen, dass Selenoproteine unter guter Versorgung maximal exprimiert werden und ein stabiles Expressionsniveau erreichen. Das wird z.B. in US Amerikanern beobachtet, da deren tägliche Se-Aufnahme deutlich höher liegt als in der EU und eine weitere Aufnahme nicht zu einer Erhöhung der Selenoprotein-Expression führt. Für gesunde Europäer scheint dieser tendenzielle Se-Mangel aber nicht direkt problematisch zu sein. Allerdings weisen eine Reihe epidemiologischer und klinischer Studien darauf hin, dass dadurch das Risiko für Infektionen, Krebserkrankungen, Autoimmunerkrankungen und im Besonderen das Mortalitätsrisiko in schweren inflammatorischen Erkrankungen erhöht ist. Es stellt sich die Frage nach dem molekularen Zusammenhang von Krebserkrankung, Immunsystem und Inflammation mit dem Se-Metabolismus und der Regulation der Selenoprotein-Expression.

Zur Beantwortung dieser Fragen soll ein möglichst umfassendes Bild des Se-Metabolismus gewonnen werden, das sich aus der Kombination von Zellkulturversuchen mit entzündungsrelevanten Stimuli, geeigneten Modellsystemen und neuen synthetischen Se-haltigen Substanzen ergibt. Hierbei wird der Se-Metabolismus von Leberzellen im Vordergrund stehen, da diesem Organ eine Schlüsselstellung für die physiologische Regulation des Se-Status und der Se-Verteilung im Organismus zukommt.

5. Methodik

5.1 Selenbestimmung

Die Spurenelementanalyse erfolgte nach dem Prinzip der Totalreflektions-Röntgenfluoreszenzanalyse (TRFA). Dabei ist die Wellenlänge und Energie der Fluoreszenzstrahlung charakteristisch für die in der Probe vorhandenen Elemente, die Intensität der Fluoreszenzstrahlung wiederum ist proportional zur Konzentration des Spurenelements in der Probe. Als interner Standard diente Gallium [11].

5.2 Detektion von Proteinen

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erlaubt die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in ihrer denaturierten Form anhand ihres Wanderungsverhaltens, das sich aus Form, Ladung und Molekulargewicht ergibt. Für die Analyse von Proteinen wurden gleiche Mengen Proteinlysate über SDS-PAGE aufgetrennt. Die auf eine Nitrocellulose-Membran mittels elektrischer Spannung transferierten Proteine wurden über spezifische Erstantikörper (AK) nachgewiesen. Als Detektions-AK diente ein HRP-markierter Zweit-AK.

Die Konzentrationen des Se-Transporters SePP in den Zellkulturüberständen wurden mit Hilfe eines Sandwich-Immunoassays vermessen. Bei dieser Methode wird der Analyt (SePP) als Sandwich durch zwei spezifische AK erkannt, detektiert und quantifiziert [12].

5.3 Genexpressionsanalysen

Die quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und diente der Vervielfältigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren. Hierbei wird zunächst die Gesamtheit exprimierter mRNA Moleküle aus einer Probe isoliert, revers transkribiert und quantifiziert. In der qRT-PCR wird dann mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen während der PCR-Zyklen die relative Transkriptmenge bestimmt, wobei die Fluoreszenz proportional zur Menge des doppelsträngigen PCR-Produktes ansteigt.

5.4 Enzymassays

Die GPx-Aktivität wurde mittels eines gekoppelten enzymatischen Tests bestimmt. Hierzu wurde der Verbrauch von NADPH gemessen, welches bei der Reduktion von oxidiertem Glutathion (GSSG) zu reduziertem Glutathion (GSH) durch das Enzym angefallen ist. Die Konzentration an GSSG ist hierbei proportional zu der zu messenden GPx-Aktivität. Unspezifischer NADPH-Umsatz wurde parallel in einem inhibierten Ansatz bestimmt und bei der Berechnung der GPx-Aktivität berücksichtigt [13].

Die Thioredoxinreduktase (TxnRd) ist eine Disulfidreduktase. Durch Reduktion von DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)) kann auf die Aktivität der TxnRd geschlossen werden. Spektroskopisch gemessen wird das Sulfid (5-Thio-2-nitrobenzoesäure; TNB), welches unter NADPH-Verbrauch während der Reaktion gebildet wird.

Die Dejodase (DIO)-Aktivität wurde mit einem nicht-radioaktiven Assay bestimmt. Dieser basiert auf die Freisetzung von Iodid unter Verwendung des bevorzugten Substrates und wird photometrisch nach Sandell und Kolthoff vermessen [14].

5.5 Zytokinbestimmung

Mittels eines Multiplex Analyse Systems (Luminex 200, Austin, U.S.A.) und den dafür entwickelten Cytokine Immunoassay Kits (LINCOplex) wurden die Konzentrationen von Zytokinen bestimmt. Die Basis für diese Methode sind farbcodierte Beads (Polystyrenemicrospheres). Jedes Bead ist mit einem spezifischen AK („Capture“) gekoppelt, der nur mit seinem spezifischen Antigen reagiert. Fluoreszenzmarkierte „Reporter Tags“ verbinden sich dann mit dem Molekül und werden über einen Laser detektiert.

5.6 Sepsis-Modell

Als geeignetes Modell für die akute Phase einer Sepsis wurde das Mausmodell der Endotoxin(LPS)-Injektion genutzt. Die Mäuse wurden in der Tierexperimentellen Einrichtung Charité gehalten und gemäß dem genehmigten Tierversuchsantrag behandelt und analysiert.

5.7 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software Graphpad Prism. Zum Vergleich von zwei Gruppen normalverteilter Daten wurde der Student's t-Test verwendet. Für den statistischen Vergleich von mehr als zwei Gruppen mit einer Kontrollgruppe wurde eine Varianzanalyse (ANOVA, analysis of variance) gefolgt von einem Dunnett- oder Bonferoni-post hoc Test durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden Werte mit einem p-Wert kleiner 0,05 bezeichnet ($p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

6. Ergebnisse

6.1 Regulation der Selenoprotein-Biosynthese durch eine APR

Grundlage dieser Arbeit ist eine vorangehende Publikation, in der wir in einem Mausmodell eine akute Sepsis durch eine Endotoxin(LPS)-Injektion nachgestellt hatten [15]. Es zeigten sich die erwarteten starken negativen Auswirkungen auf den Se-Status im Serum.

Zu unserer Überraschung war dieser Effekt aber nicht primär durch eine reduzierte Transkriptkonzentration des hepatischen Se-Transporters SePP verursacht, wie zuvor vermutet, sondern offensichtlich durch eine Reduktion der Transkription und Proteinmenge von geschwindigkeitsbestimmenden Enzymen der Selenoprotein-Biosynthese, hierbei im Besonderen von der Phosphoseryl-tRNA-Kinase (PSTK).

Zusammenfassend lieferten unsere Analysen somit ein neues Modell zum Mechanismus der Reduktion des Se-Status in Sepsis, in dem nun die Enzyme des Se-Metabolismus im Zentrum der Dysregulation stehen, nicht aber die Transkription der Selenoprotein-codierenden Gene (Abb. 1). Diese Ergebnisse bildeten die Grundlage für die vorliegende Arbeit.

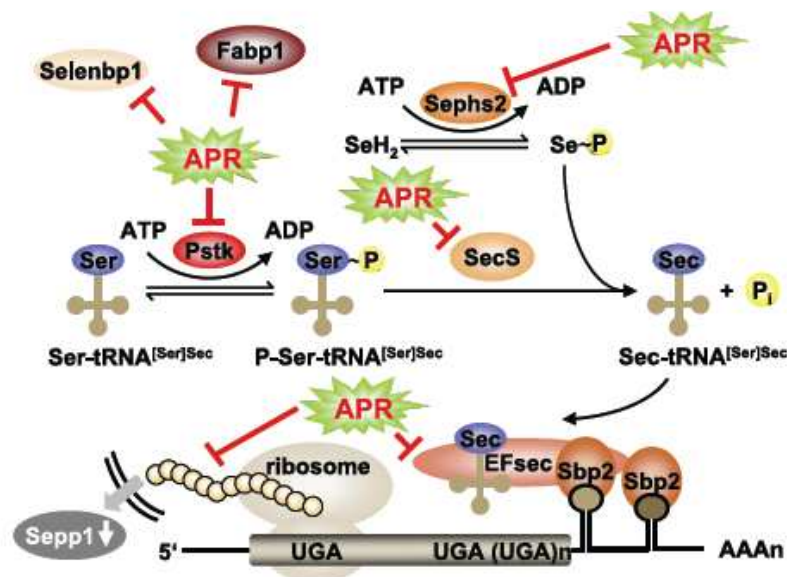


Abbildung 1: Vereinfachtes Schema zur molekularen Dysregulation der Selenoprotein-Biosynthese in Hepatozyten im Sepsismodell (aus [15]). Die APR führt zu einer reduzierten mRNA Expression der an der Transkription beteiligten Selenoenzyme und somit zu einer verminderten SePP Expression. Der Se-Transport ist beeinträchtigt und die Serum-Se-Spiegel sinken kontinuierlich.

6.2 Geschlechter-spezifische Effekte in einer therapeutischen Se-Supplementation in der Maus

Als nächste Frage wurde die Geschlechterspezifität der Effekte untersucht. Klinische Studien hatten Hinweise darauf gegeben, dass sich männliche und weibliche Patienten bei den Effekten einer Selenit-Supplementation unterscheiden.

Es wurde folglich wiederum das Sepsismodell der Maus herangezogen, diesmal aber sowohl weibliche als auch männliche Mäuse unter dem Aspekt des Se-Status. Eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus ist untenstehend gegeben (Abb. 2).

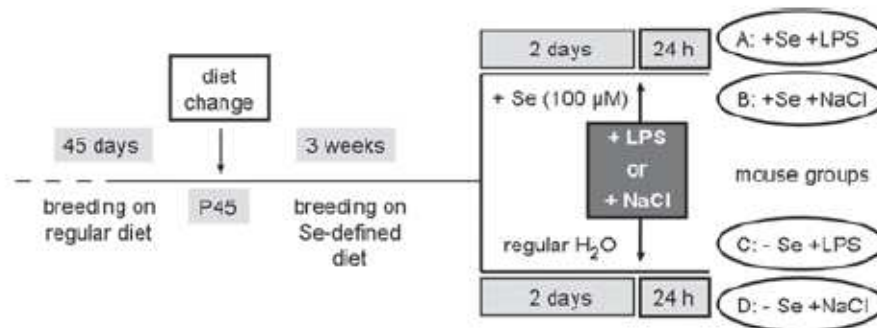


Abbildung 2: Schema zur Durchführung des Mausversuchs zur Analyse des Se-Status in der APR unter Berücksichtigung geschlechterspezifischer Aspekte (aus [16]). Alle Tiere erhielten im Alter P45 für 3 Wochen Se-armes Futter (0,1 ppm Se). Anschließend wurde die Hälfte der Tiere für 3 Tage mit 100 µM Na-Selenit über das Trinkwasser supplementiert, die Kontrollgruppe erhielt Wasser. Am zweiten Supplementationsstag erhielten die Mäuse entweder eine NaCl- oder LPS-Injektion (i. p.). Die Nekroskopie erfolgte 24h nach der Injektion.

Die Versuche belegten, dass es in der Tat zu geschlechterspezifisch unterschiedlichen Effekten der Selenitsupplementation kommt, es insofern physiologisch relevante Unterschiede im Se-Metabolismus von männlichen und weiblichen Individuen gibt. Das zeigte sich am Deutlichsten bei den Zytokinkonzentrationen nach LPS-Injektion, die nur in den männlichen Versuchstieren signifikant vom Se-Status beeinflusst waren, nicht aber in den parallel und gleich behandelten weiblichen Versuchstieren (Abb. 3).

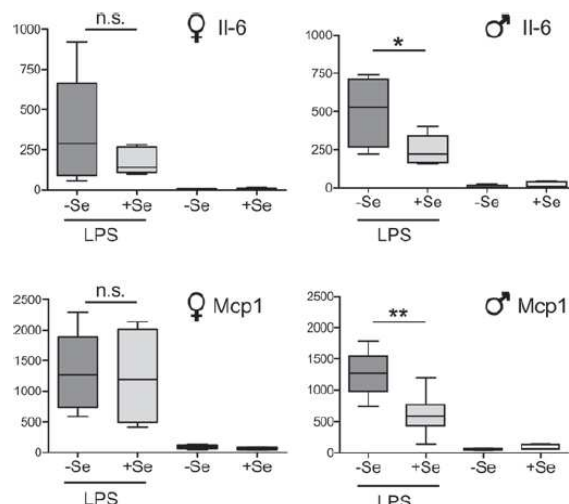


Abbildung 3: Geschlechter-spezifischer Effekt des Se-Status auf die Zytokinkonzentrationen nach LPS-Injektion im Tiermodell (aus [16]). LPS erhöhte die Serum-Zytokin-Konzentrationen in den Mäusen unabhängig vom Geschlecht. Die Se-Supplementation führte nur in männlichen Mäusen zu einer abgeschwächten Immunantwort, hingegen nicht in weiblichen Tieren (n=6). *P<0,05 und **P<0,01 (Student`s t test). n. s., nicht signifikant.

Als potentielle molekulare Ursache dieses deutlichen Geschlechterunterschieds konnte ich in diesen Versuchen das ER-residente Selenoprotein S (SepS) identifizieren, das in Hepatozyten von männlichen und weiblichen Versuchstieren unterschiedlich stark exprimiert und reguliert wurde (Abb. 4).

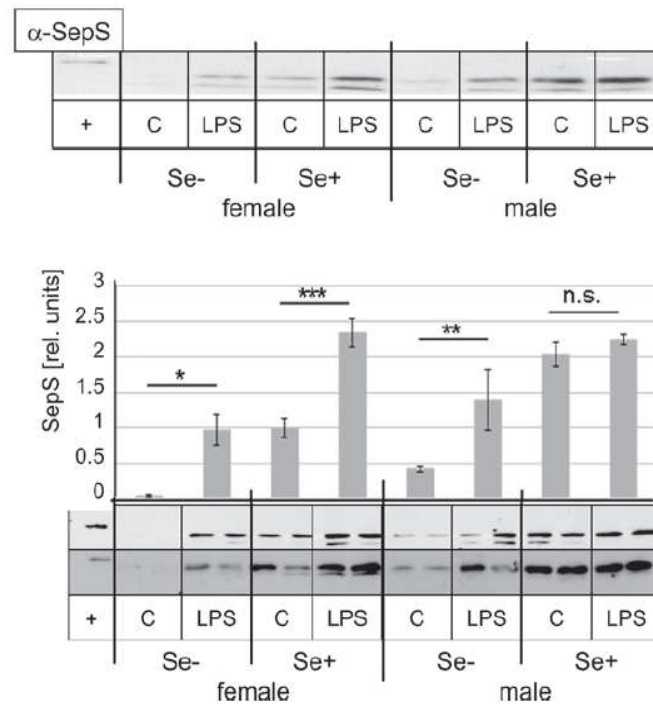


Abbildung 4: Expressionsanalyse des ER-residenten Selenoproteins SepS in männlichen und weiblichen Versuchstieren im Rahmen einer APR (aus [16]). Westernblot Analysen von Leberhomogenaten zeigen eine maximale SepS Expression in supplementierten Tieren, wobei sich die Geschlechter in ihrem SepS Expressionsmuster unterscheiden (n=4). *P<0,05; **P<0,01 und ***P<0,001 (Student's t test). n.s., nicht signifikant.

6.3 Struktur- und Zelltyp-spezifische Effekte von Imidoselenocarbamaten

Die vorangegangenen Versuche haben gezeigt, dass eine Se-Supplementation im Versuchstier die Expression von Selenoproteinen beeinflussen kann, die Effekte aber vom basalen Se-Status und Geschlecht abhängig sind. Überdies wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits deutlich unterschiedliche Toxizitäten und anabole Effekte verschiedener Se-haltiger Supplemente beschrieben [11]. Durch eine langjährige Kooperation mit Wissenschaftlern des Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) der Universidad de Navarra, Pamplona, Spanien, waren wir in der Lage, eine Reihe neuartiger Se-haltiger Substanzen zu testen (Abb. 6). Diese Moleküle zeichneten sich durch eine Imidoselenocarbamat-Grundstruktur aus und waren bereits in einem dort analysierten Tiermodell als potentielle Chemotherapeutika charakterisiert worden [17]. Nun stellte sich die Frage nach deren Effekten auf die Expression von Selenoproteinen, die im

Rahmen der antioxidativen Abwehr, des Redox-Status, der Reparatur oxidierter Proteine und des Schilddrüsenhormon(TH)-Metabolismus von zentraler Bedeutung sind.

Meine Versuche in Leberzellen in Kultur zeichneten ein klares Bild der relativen Potenz dieser neuen Substanzklasse und identifizierten potentielle Zielmoleküle, die in ihrer Expression durch diese Se-haltigen Substanzen reguliert werden (Abb. 5).

Table 2 Summary of the compound- and cell type-specific effects

Comp.	SePP ^a		SELS ^b		GPx ^c		TXNRD ^d	
	HepG2	AML12	HepG2	AML12	HepG2	AML12	HepG2	AML12
1b	↑	n.d. ^e	↑↑↑↑	n.d.	↑↑	n.d.	↓	n.d.
2b	↑	↔	↑↑↑↑	↑↑	↑↑	↔	↓	↑
3b	↑	n.d.	↑↑↑↑	n.d.	↑↑	n.d.	↓	n.d.
4b	↑	n.d.	↑↑↑	n.d.	↑↑	n.d.	↓	n.d.
5b	↑	n.d.	↑↑↑↑	n.d.	↑↑	n.d.	↓	n.d.
7b	↑	n.d.	↑↑↑↑	n.d.	↑↑	n.d.	↓	n.d.
8b	↑	↔	↑↑↑↑	↔	↑↑	↔	↓	↑
9b	↑	n.d.	↑↑↑	n.d.	↑↑	n.d.	↓	n.d.
10b	↔	↔	↑↑↑↑	↑↑	↔	↔	↓	↔
1c	↑	n.d.	↑↑↑↑	n.d.	↔	n.d.	↔	n.d.
2c	↑	↔	↑↑↑	↑↑	↔	↔	↔	↑
3c	↑	n.d.	↑↑↑↑	n.d.	↓	n.d.	↓	n.d.
4c	↑	n.d.	n.d.	n.d.	↑	n.d.	↔	n.d.
5c	↑	n.d.	↑↑↑↑	n.d.	↔	n.d.	↔	n.d.
7c	↑	n.d.	↑↑↑↑	n.d.	↔	n.d.	↔	n.d.
8c	↑	↔	↑↑↑↑	↑	↔	↔	↓	↑
9c	↑	n.d.	↑↑↑↑	n.d.	↔	n.d.	↔	n.d.
10c	↔	↔	↑↑↑	↑	↓	↔	↓	↑

Abbildung 5: Selenoprotein-spezifische Effekte von Imidoselenocarbamaten in HepG2 und AML12 Zellen in Kultur (aus [18]). ^a SePP Sekretion, ^b SELS (SepS) Expression, ^c GPx Aktivität, ^d TXNRD Aktivität, ^e n.d.: nicht bestimmt; ↑: ≤2x; ↑↑: 2–4x; ↑↑↑: 4–8x; ↑↑↑↑: ≥8x.

Diese Analysen unterstrichen die hohe Potenz dieser Substanzen und zeigten, dass gerade im Rahmen der Tumorbehandlung die beobachtete Suppression der Thioredoxin-Reduktasen, die für die Zellteilung benötigt werden, in Kombination mit der Verbesserung der Expression des Selenoproteins S (SELS/SepS), das gerade für die Überwachung der körpereigenen Zellen durch das Immunsystem von großer Relevanz ist, von grundlegender Bedeutung sein könnte. Dieses Bild deckt sich insofern mit den positiven Effekten der Substanzen im Tumormodell der Maus und motiviert zu Folgestudien mit diesen Substanzen.

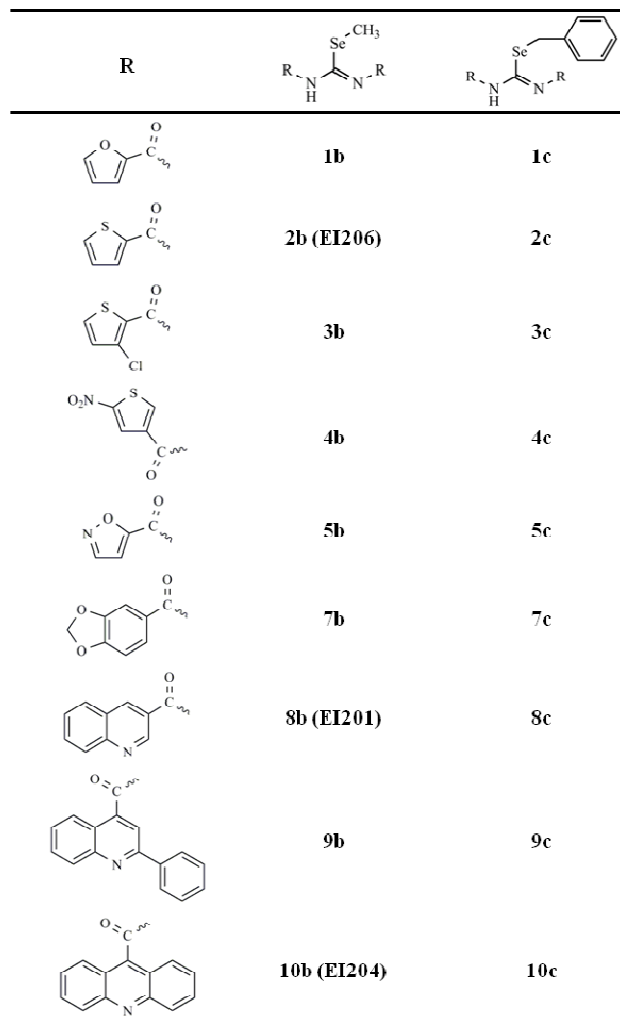


Abbildung 6: Strukturübersicht über die getesteten Methyl- und Benzylselenoimidocarbamate (aus [18]).

6.4 Hypoxie als grundlegender Modulator der Selenoprotein-Expression

Es verbleibt die Frage nach dem komplexen Geschehen während einer Sepsis, welches der beobachteten Reduktion des Se-Status im Blut zugrunde liegt. In Kooperation innerhalb unserer Arbeitsgruppe sind wir in einer weiteren Versuchsreihe der Hypothese nachgegangen, dass die Minderdurchblutung während einer schweren Sepsis einen Einfluss auf den Se-Metabolismus haben könnte. Eine Minderdurchblutung bedingt im Gewebe einen Sauerstoffmangel (Anämie), der als starkes Signal über den sauerstoffabhängigen Transkriptionsfaktor HIF eine Reihe molekularer Effekte in hypoxischen Zellen vermittelt [19]. Ziel der Versuche war nun herauszufinden, ob die Hypoxie einen Effekt auf die Expression von Selenoproteinen hat und ob dieser Effekt durch den Transkriptionsfaktor HIF vermittelt wird.

Hierzu haben wir uns wieder der Leberzelllinie HepG2 und des sensitiven SePP-ELISA als Modell und zentrale Methodik bedient. Es zeigten sich überraschend starke Effekte von Hypoxie auf die SePP-Expression. Überdies wurde deutlich, dass es nicht zu einer generellen Suppression

der Selenoprotein-Biosynthese kam, sondern eher eine Umverteilung des Se auf die verschiedenen Selenoproteine stattfand. Hierbei profitierte das essentielle Selenoprotein GPx4, offenbar auf Kosten des Se-Transporters SePP (Abb. 7).

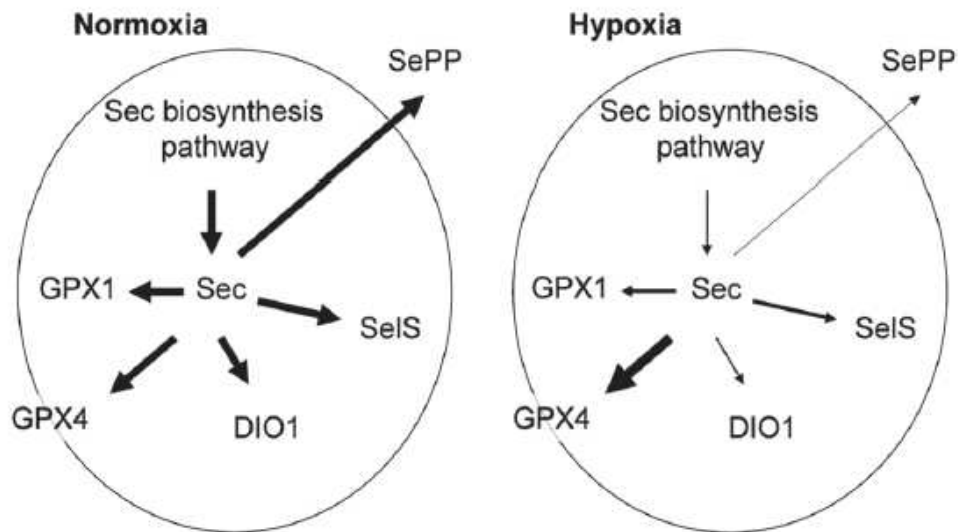


Abbildung 7: Selenoprotein-spezifische Effekte einer Hypoxie in HepG2 Zellen in Kultur (aus [20]). In der Normoxie wird das verfügbare Se auf die Biosynthese aller Selenoproteine verteilt. Der Se-Transport über SePP wird in der Hypoxie zu Gunsten einer erhöhten GPx4 Expression runterreguliert, wobei der Se-Metabolismus so verändert wird, dass essentielle Selenoproteine bevorzugt synthetisiert werden.

6.5 Selenocarbamate als potente Induktoren der DIO-Expression

Schließlich wollte ich die vielversprechenden Effekte der neuen Imidoselenocarbamate weiter charakterisieren, da inzwischen zunehmend Publikationen erschienen waren, die eine zentrale Rolle des Schilddrüsenhormon (TH)-Metabolismus und damit der Se-abhängigen DIO für das Tumorstadium nahelegten [21, 22]. Zudem hatte mein Kollege Dr. Renko inzwischen einen neuen zuverlässigen nicht-radioaktiven Test zur Messung der enzymatischen Aktivität dieser Enzyme entwickelt [14]. Insofern war ein guter Zeitpunkt gekommen, um die Hypothese zu prüfen, dass eventuell ein Teil der chemotherapeutischen Effekte der Imidoselenocarbamate über eine veränderte Expression der DIO vermittelt wird.

Es wurden wiederum HepG2 Zellen wie oben beschrieben kultiviert, inkubiert und analysiert. Überdies wurden stabile HEK293-Zelllinien, die jeweils eine der drei DIO-Isoformen exprimieren, herangezogen und analog inkubiert und analysiert. Es zeigten sich sehr starke Effekte auf die DIO-Expression, und zwar auf alle drei Isoenzyme mit unterschiedlich starker Potenz (Abb. 8). Diese Ergebnisse unterstreichen eindrucksvoll die interessanten biologischen Effekte dieser neuen Substanzklasse als potentielle Modulatoren des TH-Metabolismus.

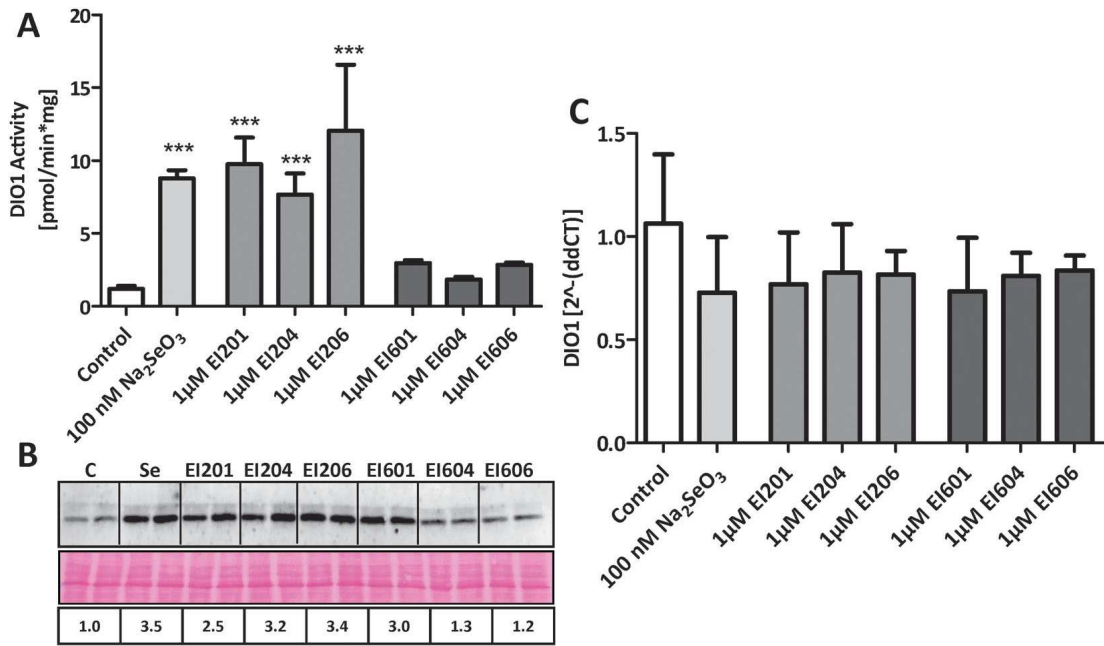


Abbildung 8: Starke Induktion der DIO1 in HepG2 Zellen in Kultur (aus [23]). Analysen der Enzymaktivität (A), der Proteinexpression (B) und der Transkriptmengen (C) (n=3-6) zeigen substanzspezifische Effekte auf DIO1, die auf posttranskriptionaler Ebene vermittelt werden. *P<0,05; **P<0,01 und ***P<0,001 (ONE-WAY-ANOVA, Dunnett`s post hoc Test).

7. Diskussion

Se als „Allheilmittel“; das wäre wohl zu schön, um wahr zu sein. Doch scheint das Spurenelement Se im wahrsten Sinne des Wortes überlebenswichtig zu sein. Es ist bekannt, dass Se entscheidend in die Aktivität des Immunsystems eingreift. Durch den Einbau von Se in Selenoproteine wird so Einfluss auf oxidativen Stress, Redoxstatus und andere wichtige zelluläre Prozesse in fast allen Geweben und Zelltypen genommen. Eine große Anzahl von Studien liefert Einblicke, wie sowohl ein Se-Defizit als auch eine Se-Supplementation auf das Immunsystem wirken [24, 25].

So ist bekannt, dass in Sepsispatienten die Serum-Se-Spiegel absinken [6, 9]. Der physiologische Zweck und die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen für dieses Phänomen sind zurzeit noch nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass wie im Menschen die Gesamt-Se-Konzentrationen und SePP-Level auch im septischen Mausmodell sinken. Hierbei lag diesem Phänomen molekular ein starker Effekt auf geschwindigkeitsbestimmende Enzyme der Selenoprotein-Biosynthese zugrunde. Überdies zeigten sich geschlechter-spezifische Unterschiede, die von klinischer Relevanz sein dürften.

Eine Supplementation von Sepsispatienten mit Se könnte sich insofern in der Intensivmedizin als vorteilhaft erweisen, da im Mausmodell eine kurzfristige Supplementation schon reichte, um den Se-Status positiv zu beeinflussen. Interessanterweise spiegelt sich dieser Effekt nicht ungeteilt wider, da die Se-Konzentrationen und die GPx-Expressionen Se-abhängige und geschlechtsabhängige Besonderheiten aufweisen. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der hepatischen Regulation von Selenoproteinen wurden schon beschrieben [13]. Ein Vergleich des LPS-bedingten SePP-Abfalls im Serum der supplementierten und Se-armen Tiere lässt vermuten, dass aufgrund der reduzierten Se-Level die hepatische SePP-Biosynthese herunter reguliert wird. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Herunterregulierung eines anderen hepatischen Selenoproteins, Sep15, durch ER-Stress [26]. Die beobachteten reduzierten Se- und SePP-Konzentrationen repräsentieren und reflektieren somit einen veränderten Metabolismus in der Leber. Es bestehen zwar generell keine Unterschiede im Gesamt-Se-Gehalt der männlichen und weiblichen Leber, die Se-Konzentration war unter homogenen Bedingungen innerhalb der Gruppen vergleichbar. Allerdings zeigte sich eine unterschiedliche Regulation von cGPx, pGPx sowie SePP nach Se-Gabe.

In diesem Zusammenhang beobachteten wir gleichzeitig ansteigende hepatische SepS-Konzentrationen als positives Akutphase-Protein. LPS führte zu Veränderungen auf Proteinebene von SePP und SepS, ohne die jeweiligen Transkriptmengen zu beeinflussen. Der Vergleich von mRNA- und Protein zeigte, dass die Regulation auf posttranskriptioneller Ebene

stattfindet, also vermutlich die Translationseffizienzen durch den Se-Status und das Geschlecht kontrolliert werden. Diese Daten zeigen eindrücklich die hierarchische Verteilung des verfügbaren Se auf die Biosynthese der unterschiedlichen Selenoproteine [27]. Unter den Selenoproteinen reagieren einige rasch auf einen Se-Mangel und reduzieren ihre Aktivitäten, mRNA- und Proteinkonzentrationen (z.B. cGPx, pGPx). Andere reagieren erst auf eine drastische Se-Defizienz mit der Reduktion von Proteinmenge (z.B. SePP, GI-GPx, PH-GPx) [28]. Es ist zu vermuten, dass diese Regulation von hoher physiologischer Bedeutung für die Bewältigung der APR ist. Von besonderem Interesse für das Verständnis klinischer Studienergebnisse sind die geschlechtsspezifischen Unterschiede, die hier beschrieben sind.

Neben der LPS-, Se- und geschlechtsabhängigen sowie gewebsspezifischen Regulation von SepS konnten wir darüber hinaus mit Hilfe eines Mausmodells mit veränderter Selenoprotein-Biosynthese zeigen, dass anscheinend Hepatozyten während einer APR verfügbares Se in die Synthese von essentiellen Selenoproteinen wie SepS verlagern. SepS ist ein einzigartiges Selenoprotein und ist im ER lokalisiert. Es ist zum einen an der Qualitätskontrolle von Proteinen beteiligt und verhindert so, dass durch die Akkumulation falsch gefalteter Proteine ER-Stress in der Zelle entsteht [29]. Zum anderen ist bekannt, dass SNPs im Promotor von SepS mit unterschiedlichen SepS-Expressionen und einem veränderten Zytokinstatus im Menschen einhergehen [30]. Diese Umstände belegen eine Abhängigkeit und molekulare Interaktion von Immunsystem, proinflammatorischen Zytokinen und SepS Expression.

Eine solche induzierte Umverteilung des Se auf die verschiedenen Selenoproteine, was zu einem veränderten Muster der Expression führt, konnten wir auch als Reaktion auf Hypoxie beobachten. Wir müssen also zusammenfassend davon ausgehen, dass es selten isolierte Effekte nur auf einzelne Selenoproteine gibt, sondern man gerade bei der Betrachtung klinisch-relevanter Veränderungen im Se-Status das Gesamtmuster der Selenoproteine im Blick behalten muss.

Hinweise aus tierexperimentellen und klinischen Studien häufen sich, dass Se eine chemoprotektive Rolle hat [31, 32]. Um einen potentiell präventiven Einfluss von Se zu prüfen und dessen molekulare und physiologische Mechanismen aufzuklären, wurden in der Vergangenheit eine Vielzahl von *in vivo* und *in vitro* Experimenten durchgeführt. Darmkrebs ist nach Prostatakrebs bei Männern und nach Brustkrebs bei Frauen die häufigste Krebserkrankung, an der immer noch ein Großteil der Betroffenen stirbt. Obwohl große Fortschritte in dessen Behandlung gemacht wurden, haben die meisten der zur Verfügung stehenden Medikamente starke Nebenwirkungen. Aus diesem Grund ist es erstrebenswert, neue synthetische Se-enthaltene Medikamente zu entwickeln.

In diesen Zusammenhang stellt diese Arbeit die Einzigartigkeit der Wirkungsweise von kürzlich neu synthetisierten Imidoselenocarbamaten heraus. Die hier gewonnenen Ergebnisse zeigen spezifische Effekte auf die Krebszelllinie HepG2 ohne toxische Nebenwirkungen und unterstützen deren Einordnung als potentielleres Krebstherapeutikum.

Das als Marker für die Se-Verfügbarkeit angesehene SePP konnte sowohl durch die Stimulation von Imidoselenocarbamaten mit einer Methyl- als auch einer Benzyl-Gruppe in HepG2 Überstand gesteigert werden. Dass die Substanzen aber die Selenoprotein-Biosynthese nicht im generellen steigert, zeigt sich beim Betrachten der GPx- und TxnRd-Aktivitäten. Insbesondere die Methyl-Carbamate führten zwar zu einer gesteigerten GPx-Aktivität in HepG2-Zellen, auf die TxnRd wirkten sie hingegen inhibierend. Dieser Effekt konnte ein weiteres Mal eindrücklich bestätigt werden. Denn die direkte *in vitro* Inkubation von Leberproteinlysate aus der Maus zeigte den gleichen Effekt auf die Enzymaktivität der TxnRd.

In vorangegangenen Arbeiten haben Ibáñez et al. [17] gezeigt, dass die Methylselenocarbamate als Kinase-Inhibitoren agieren können. Insbesondere die Substanz 8b unterdrückte den PI3K/AKT/mTOR Signalweg. Des Weiteren wurde eine Reduktion in der Anzahl von Tumorstammzellen und eine Verringerung des Tumorstwachstums *in vivo* beobachtet. Die Verminderung dieser metabolischen Signalwege tragen zum programmierten Zelltod (Autophagozytose) bei, da die Zellproliferation, Proteinsynthese und DNA-Reparaturmechanismen gehemmt werden. Autophagozytose ist Teil der oxidativen Stress-Antwort. Diesbezüglich ist bereits bekannt, dass mit einer erniedrigten SepS-Expression erhöhte Stresslevel einhergehen und dessen Expression stark von der Se-Verfügbarkeit abhängt [16, 33]. Die von uns beobachteten Effekte der Carbamate auf die SepS-Expression waren bemerkenswert, da sie substanzspezifisch wirkten. Sie erhöhten die SepS-Expression unabhängig von der Grundstruktur der Selenocarbamate mit Methyl- oder Benzyl-Gruppe. Die Annahme von erhöhtem ER-Stress ließ sich mit weiteren Analysen nicht vollends bestätigen, denn die Ergebnisse lieferten ein eher heterogenes Bild. Die biologische Funktion von SepS bleibt an dieser Stelle unklar und bedarf weiterer Analysen.

Ein Vergleich der Effekte zwischen der Krebszelllinie HepG2 und den untransformierten AML12-Zellen zeigt einige Parallelen mit überlappenden Effekten auf die Expression von SePP, GPx und SepS. Aber die Aktivitäten von TxnRd werden genau entgegengesetzt reguliert. Insbesondere die Substanzen 2b, 8b, 8c und 10c erhöhten die Aktivität in den untransformierten Zellen, hingegen wirkten sie in den Krebszellen gleichzeitig inhibierend. Diese zelltypspezifische Wirkung ist vielversprechend und kennzeichnet die bedeutenden Vorteile gegenüber herkömmlichen antitumoralen Strategien. Anscheinend kombinieren die Methyl-

Imidoselenocarbamate einen stärkenden Effekt auf untransformierte Zellen mit einem schwächenden Effekt auf die Proliferation von Tumorzellen und ihrer Abwehr.

Eine weitere Analyse der DIO bewiesen abermals den therapeutisch vielversprechenden Charakter der Methyl-Carbamate ohne dabei toxische Effekte auf Zellen zu haben. Mit der Aktivierung bzw. Inaktivierung von TH nehmen die DIO Einfluss auf den TH-Status in jeder Zelle des Körpers und modulieren so viele grundlegende Signalwege. Eine adäquate Kontrolle der TH-Aktivität ist wichtig für eine koordinierte Entwicklung, den Energiemetabolismus und andere endokrine Signalwege [34, 35]. Es ist also naheliegend, dass DIO auch die Tumorigenese beeinflussen können. Da ihre Expression in den verschiedenen Tumorgeweben stark variiert, ist ihre Rolle in diesem Zusammenhang nicht vollständig geklärt. Doch können DIO über TH Zellproliferation und Differenzierung im Gleichgewicht halten und somit entscheidend auf das weitere Tumorwachstum einwirken. Wie die hier aufgeführten Ergebnisse zeigen, scheint die antikanzerogene Wirkung nicht durch ein einzelnes Selenoprotein vermittelt zu werden. Es ist vielmehr ein „fine-tuning“ unterschiedlicher Selenoproteine, die sich in ihrer Expression in gesunden und kranken Zellen unterscheiden und synergistisch wirken.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Effekte der Carbamate wurden bei einer Konzentration von 1 μM beobachtet, was der Größenordnung der Se-Konzentration im menschlichen Blut entspricht. Die bisherigen Ergebnisse sind vielversprechend und sollten in weiteren Experimenten und klinischen Studien auf ihre antikanzerogene Wirkung und Verträglichkeit im Testorganismus überprüft werden.

Die Verbindung von Se und Immunsystem stellt sich als komplexer dar als die Vorstellung, Se wäre ein genereller „Immunbooster“. Die Rolle des Se im Immunsystem und der Wirkungsmechanismus sind immer noch in vielen Aspekten unklar. Einige Selenoproteine spielen eine wichtige Rolle zur Bewältigung von oxidativem Stress und für die Kontrolle des Redoxstatus, aber die Funktion vieler anderer ist ungeklärt [3]. Die Analyse weiterer Selenoproteine im Zusammenhang von Inflammation, Krebs und Immunsystem würde weitere mechanistische Einblicke liefern und die Einsatzmöglichkeiten einer Se-Supplementation besser definieren.

Es wird insofern spannend bleiben, die klinischen Studien zur Se-Supplementation bei Sepsis unter Gesichtspunkten des basalen Se-Status und des Geschlechts der Patienten zu betrachten und zu analysieren. Ob es die Imidoselenocarbamate tatsächlich so oder in veränderter Form in eine klinische Anwendung schaffen werden, kann derzeit nicht abschließend eingeschätzt werden. Angesichts der enormen Kosten klinischer Studien ist es ohne weitere überzeugende präklinische Daten aber zu bezweifeln. Dennoch hat diese Arbeit ihr enormes Potential weiter

unterstrichen, sowohl in Bezug auf die Chemotherapie als auch in Bezug auf eine Verbesserung des TH-Status, wie es gerade in schweren Erkrankungen notwendig ist („Low-T3-Syndrom“) [36]. Es wäre deshalb wünschenswert, wenn die in dieser Arbeit dargelegten Erkenntnisse und Effekte der Imidoselenocarbamate in Folgestudien weiter charakterisiert würden.

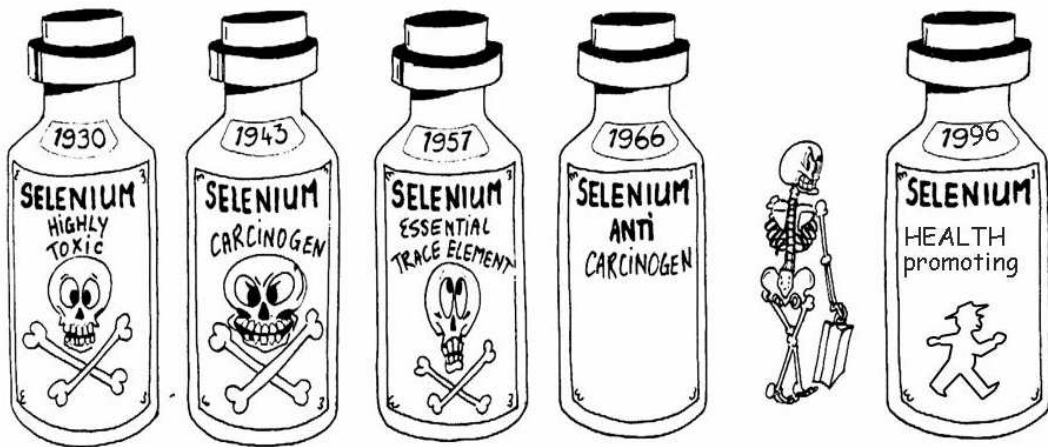


Abbildung 9: Veränderung der Sichtweise auf die biologische und medizinische Bedeutung des Se. Ausgehend von der Wahrnehmung des Se als toxische Substanz wird es seit den Studien von 1957 durch die Forscher Schwarz und Foltz zunehmend als potentielles und viel versprechendes Nahrungsergänzungsmittel mit antikanzerogenen Eigenschaften betrachtet. Neben einer wichtigen Bedeutung in der Ernährung wird Se nun auch eine gesundheitsfördernde Funktion zugesprochen (modifiziert nach Vernie [37] und Köhrle [38]).

8. Literaturverzeichnis

1. Foster, L.H. and Sumar, S., *Selenium in health and disease: a review*. Crit Rev Food Sci Nutr, 1997. **37**(3): p. 211-28.
2. Schwarz, K. and Foltz, C.M., *Factor 3 activity of selenium compounds*. J Biol Chem, 1958. **233**(1): p. 245-51.
3. Kryukov, G.V., Castellano, S., Novoselov, S.V., Lobanov, A.V., Zehtab, O., Guigo, R., and Gladyshev, V.N., *Characterization of mammalian selenoproteomes*. Science, 2003. **300**(5624): p. 1439-43.
4. Hatfield, D.L. and Gladyshev, V.N., *How selenium has altered our understanding of the genetic code*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(11): p. 3565-76.
5. Hatfield, D.L., Carlson, B.A., Xu, X.M., Mix, H., and Gladyshev, V.N., *Selenocysteine incorporation machinery and the role of selenoproteins in development and health*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2006. **81**: p. 97-142.
6. 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 Surg Res, 2009. **43**(4): p. 338-47.
7. Fairweather-Tait, S.J., Bao, Y., Broadley, M.R., Collings, R., Ford, D., Hesketh, J.E., and Hurst, R., *Selenium in human health and disease*. Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(7): p. 1337-83.
8. Sanmartin, C., Plano, D., Font, M., and Palop, J.A., *Selenium and clinical trials: new therapeutic evidence for multiple diseases*. Curr Med Chem, 2011. **18**(30): p. 4635-50.
9. Angstwurm, M.W., Engelmann, L., Zimmermann, T., Lehmann, C., Spes, C.H., Abel, P., Strauss, R., Meier-Hellmann, A., Insel, R., Radke, J., Schuttler, J., and Gartner, 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): p. 118-26.
10. Schomburg, L., *Selenium in intensive care (SIC) study: the XX files are still unresolved*. Crit Care Med, 2007. **35**(3): p. 995-6; author reply 996-7.
11. Hoefig, C.S., Renko, K., Kohrle, J., Birringer, M., and Schomburg, L., *Comparison of different seleno compounds with respect to nutritional value vs. toxicity using liver cells in culture*. J Nutr Biochem, 2011. **22**(10): p. 945-55.
12. Hollenbach, B., Morgenthaler, N.G., Struck, J., Alonso, C., Bergmann, A., Kohrle, 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): p. 24-32.
13. Riese, C., Michaelis, M., Mentrup, B., Gotz, F., Kohrle, J., Schweizer, U., and Schomburg, L., *Selenium-dependent pre- and posttranscriptional mechanisms are responsible for sexual dimorphic expression of selenoproteins in murine tissues*. Endocrinology, 2006. **147**(12): p. 5883-92.
14. Renko, K., Hoefig, C.S., Hiller, F., Schomburg, L., and Kohrle, J., *Identification of iopanoic acid as substrate of type 1 deiodinase by a novel nonradioactive iodide-release assay*. Endocrinology, 2012. **153**(5): p. 2506-13.
15. Renko, K., Hofmann, P.J., Stoedter, M., Hollenbach, B., Behrends, T., Kohrle, J., Schweizer, U., and Schomburg, L., *Down-regulation of the hepatic selenoprotein biosynthesis machinery impairs selenium metabolism during the acute phase response in mice*. FASEB J, 2009. **23**(6): p. 1758-65.
16. Stoedter, M., Renko, K., Hog, A., and Schomburg, L., *Selenium controls the sex-specific immune response and selenoprotein expression during the acute-phase response in mice*. Biochem J, 2010. **429**(1): p. 43-51.
17. Ibanez, E., Agliano, A., Prior, C., Nguewa, P., Redrado, M., Gonzalez-Zubeldia, I., Plano, D., Palop, J.A., Sanmartin, C., and Calvo, A., *The quinoline imidoselenocarbamate EI201 blocks the AKT/mTOR pathway and targets cancer stem cells leading to a strong antitumor activity*. Curr Med Chem, 2012. **19**(18): p. 3031-43.
18. Ibanez, E., Stoedter, M., Hofmann, P.J., Plano, D., Calvo, A., Nguewa, P.A., Palop, J.A., Sanmartin, C., and Schomburg, L., *Structure- and cell-specific effects of*

- imidosenocarbamates on selenoprotein expression and activity in liver cells in culture.* Metallomics, 2012. **4**(12): p. 1297-307.
19. Naranjo-Suarez, S., Carlson, B.A., Tsuji, P.A., Yoo, M.H., Gladyshev, V.N., and Hatfield, D.L., *HIF-independent regulation of thioredoxin reductase 1 contributes to the high levels of reactive oxygen species induced by hypoxia.* PLoS One, 2012. **7**(2): p. e30470.
 20. 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): p. 1079-86.
 21. Dentice, M., Antonini, D., and Salvatore, D., *Type 3 deiodinase and solid tumors: an intriguing pair.* Expert Opin Ther Targets, 2013. **17**(11): p. 1369-79.
 22. Dentice, M. and Salvatore, D., *Deiodinases: the balance of thyroid hormone: local impact of thyroid hormone inactivation.* J Endocrinol, 2011. **209**(3): p. 273-82.
 23. Stoedter, M., Renko, K., Ibanez, E., Plano, D., Becker, N.P., Martitz, J., Palop, J.A., Calvo, A., Sanmartin, C., and Schomburg, L., *Strong induction of iodothyronine deiodinases by chemotherapeutic selenocompounds.* Metallomics, 2015.
 24. Spallholz, J.E., Boylan, L.M., and Larsen, H.S., *Advances in understanding selenium's role in the immune system.* Ann N Y Acad Sci, 1990. **587**: p. 123-39.
 25. Hoffmann, P.R. and Berry, M.J., *The influence of selenium on immune responses.* Mol Nutr Food Res, 2008. **52**(11): p. 1273-80.
 26. Labunskyy, V.M., Yoo, M.H., Hatfield, D.L., and Gladyshev, V.N., *Sep15, a thioredoxin-like selenoprotein, is involved in the unfolded protein response and differentially regulated by adaptive and acute ER stresses.* Biochemistry, 2009. **48**(35): p. 8458-65.
 27. Schomburg, L. and Schweizer, U., *Hierarchical regulation of selenoprotein expression and sex-specific effects of selenium.* Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**(11): p. 1453-62.
 28. Flohe, L., Gunzler, W.A., and Schock, H.H., *Glutathione peroxidase: a selenoenzyme.* FEBS Lett, 1973. **32**(1): p. 132-4.
 29. Ye, Y., Shibata, Y., Yun, C., Ron, D., and Rapoport, T.A., *A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol.* Nature, 2004. **429**(6994): p. 841-7.
 30. Curran, J.E., Jowett, J.B., Elliott, K.S., Gao, Y., Gluschenko, K., Wang, J., Abel Azim, D.M., Cai, G., Mahaney, M.C., Comuzzie, A.G., Dyer, T.D., Walder, K.R., Zimmet, P., MacCluer, J.W., Collier, G.R., Kissebah, A.H., and Blangero, J., *Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response.* Nat Genet, 2005. **37**(11): p. 1234-41.
 31. Clark, L.C., Combs, G.F., Jr., Turnbull, B.W., Slate, E.H., Chalker, D.K., Chow, J., Davis, L.S., Glover, R.A., Graham, G.F., Gross, E.G., Krongrad, A., Leshner, J.L., Jr., Park, H.K., Sanders, B.B., Jr., Smith, C.L., and Taylor, J.R., *Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group.* JAMA, 1996. **276**(24): p. 1957-63.
 32. Hatfield, D.L., Tsuji, P.A., Carlson, B.A., and Gladyshev, V.N., *Selenium and selenocysteine: roles in cancer, health, and development.* Trends Biochem Sci, 2014. **39**(3): p. 112-20.
 33. Gao, Y., Feng, H.C., Walder, K., Bolton, K., Sunderland, T., Bishara, N., Quick, M., Kantham, L., and Collier, G.R., *Regulation of the selenoprotein Sels by glucose deprivation and endoplasmic reticulum stress - Sels is a novel glucose-regulated protein.* FEBS Lett, 2004. **563**(1-3): p. 185-90.
 34. Kohrle, J., Jakob, F., Contempre, B., and Dumont, J.E., *Selenium, the thyroid, and the endocrine system.* Endocr Rev, 2005. **26**(7): p. 944-84.
 35. McAninch, E.A. and Bianco, A.C., *Thyroid hormone signaling in energy homeostasis and energy metabolism.* Ann N Y Acad Sci, 2014. **1311**: p. 77-87.
 36. Gartner, R., *Selenium and thyroid hormone axis in critical ill states: an overview of conflicting view points.* J Trace Elem Med Biol, 2009. **23**(2): p. 71-4.
 37. Vernie, L.N., *Selenium in carcinogenesis.* Biochim Biophys Acta, 1984. **738**(4): p. 203-17.
 38. Kohrle, J., *The trace element selenium and the thyroid gland.* Biochimie, 1999. **81**(5): p. 527-33.

9. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Mette Stoedter, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Regulation von Selenoproteinen in inflammatorischen Erkrankungen und durch synthetische Selenverbindungen“ selbständig 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 (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

10. Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Mette Stoedter hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: **Stoedter M**, Renko K, Hög A, Schomburg L.; Selenium controls the sex-specific immune response and selenoprotein expression during the acute-phase response in mice., *Biochem. J.*, 2010. Impact Factor 2014: 4.779

50% Anteil: Begleitende Durchführung des Mausversuches und Probennahme sowie Probenaufarbeitung für Westernblots, Enzymassays sowie Se-Bestimmung, Durchführen der Westernblots für SepS und SePP, Zytokinmessung, Enzymassays für GPx und TxnRd, Se-Bestimmung sowie deren statistischen Auswertung und Darstellung

Publikation 2: Ibáñez E*, **Stoedter M***, Hofmann PJ, Plano D, Calvo A, Nguewa PA, Palop JA, Sanmartín C, Schomburg L.; Structure- and cell-specific effects of imidoselenocarbamates on selenoprotein expression and activity in liver cells in culture., *Metallomics*, 2012. Impact Factor 2014: 3.978

25% Anteil: Durchführung der Experimente in Zellkultur (HepG2- und AML12-Zellen), Aufarbeiten der Proben für folgende Assays sowie deren Durchführung: Westernblots für SepS, XBP1, Grp94; PCR für XBP1; Enzymassays für GPx und TxnRd, sowie deren statistischen Auswertung und Darstellung; Beteiligung beim Erstellen des Manuskripts

Publikation 3: Becker NP, Martitz J, Renko K, **Stoedter M**, Hybsier S, Cramer T, Schomburg L.; Hypoxia reduces and redirects selenoprotein biosynthesis., *Metallomics*, 2014. Impact Factor 2014: 3.978

10% Anteil: Reporterassays inklusive der dazugehörigen Zellkultur und Durchführung des Experiments sowie der statistischen Auswertung und Darstellung

Publikation 4: **Stoedter M**, Renko K, Ibáñez E, Plano D, Becker NP, Martitz J, Palop JA, Calvo A, Sanmartín C, Schomburg L.; Strong induction of iodothyronine deiodinases by chemotherapeutic selenocompounds., *Metallomics*, 2015. Impact Factor 2014: 3.978

50% Anteil: Durchführung der Experimente, Aufarbeiten der Proben für folgende Assays sowie für die Se-Bestimmung und deren Durchführung: Zytotoxizitätstests, Mitdurchführen des radioaktiven und nicht-radioaktiven Deiodase-Assays, Westernblots für DIO1 und FLAG, qRT-PCR für DIO1, 2 und 3 sowie deren statistischen Auswertung und Darstellung, Federführung beim Erstellen des Manuskripts

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden

Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

10.1 Selenium controls the sex-specific immune response and selenoprotein expression during the acute-phase response in mice

Biochem. J., 2010

DOI: <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20091868>

10.2 Structure- and cell-specific effects of imidoselenocarbamates on selenoprotein expression and activity in liver cells in culture.

Metallomics, 2012

DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c2mt20096a>

10.3 Hypoxia reduces and redirects selenoprotein biosynthesis.

Metallomics, 2014

DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c4mt00004h>

10.4 Strong induction of iodothyronine deiodinases by chemotherapeutic selenocompounds.

Metallomics, 2015

DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c4mt00273c>

11. Lebenslauf

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

12. komplette Publikationsliste

Publikation 1: **Stoedter M**, Renko K, Ibáñez E, Plano D, Becker NP, Martitz J, Palop JA, Calvo A, Sanmartín C, Schomburg L.; Strong induction of iodothyronine deiodinases by chemotherapeutic selenocompounds., *Metallomics*, 2015.

Publikation 2: Becker NP, Martitz J, Renko K, **Stoedter M**, Hybsier S, Cramer T, Schomburg L.; Hypoxia reduces and redirects selenoprotein biosynthesis., *Metallomics*, 2014.

Publikation 3: Pietschmann N, Rijntjes E, Hoeg A, **Stoedter M**, Schweizer U, Seemann P, Schomburg L.; Selenoprotein P is the essential selenium transporter for bones.; *Metallomics*, 2014.

Publikation 4: Ibáñez E, **Stoedter M**, Hofmann PJ, Plano D, Calvo A, Nguewa PA, Palop JA, Sanmartín C, Schomburg L.; Structure- and cell-specific effects of imidoselenocarbamates on selenoprotein expression and activity in liver cells in culture., *Metallomics*, 2012.

Publikation 5: Meyer HA, 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.

Publikation 6: **Stoedter M**, Renko K, Hög A, Schomburg L.; Selenium controls the sex-specific immune response and selenoprotein expression during the acute-phase response in mice., *Biochem. J.*, 2010.

Publikation 7: **Mette Stoedter**, Ulrich Schweizer & Lutz Schomburg; Selenium – an essential micronutrient and controversial health-promoting supplement., *The BIOCHEMIST*, 2010.

Publikation 8: Renko K, Hofmann PJ, **Stoedter M**, Hollenbach B, Behrends T, Köhrle J, Schweizer U, Schomburg L.; Down-regulation of the hepatic selenoprotein biosynthesis machinery impairs selenium metabolism during the acute phase response in mice., *FASEB J*, 2009.

13. Danksagung

Allen, die mich bei meiner Promotion unterstützt haben, gilt mein aufrichtiger Dank. Einige Personen möchte ich besonders würdigen, die durch ihre Persönlichkeit und ihre intellektuelle Auseinandersetzung nicht nur diese Promotion, sondern mich im Ganzen begleitet haben.

Mein herzlichster Dank geht zuerst an meinen Mentor Prof. Lutz Schomburg. Seine großartige fachliche Kompetenz und seine Fähigkeit zu motivieren und zu eigenem Denken anzuregen hat mir den Eintritt in die Welt der Wissenschaft sehr einfach gestaltet.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Kostja Renko, der in experimentell auswegslosen Situationen immer Rat wusste.

Prof. Dr. Josef Köhrle gilt als Leiter des Instituts für Experimentelle Endokrinologie mein großer Dank für die Möglichkeit zur Promotion in seinem Institut.

Ein besonderer Dank geht an das Graduiertenkolleg 1208. Die Möglichkeiten zur Aus- und Weiterbildung waren großartig und vielfältig. Mentoren und Betreuer waren immer für Gespräche offen und standen einem mit guten Ratschlägen zur Seite. Allen Mitgliedern möchte ich für die tolle Atmosphäre und viele schöne Stunden danken.

Allen Kollegen am Institut für Experimentelle Endokrinologie gilt ein ganz persönlicher Dank. Die Stimmung ist einfach sehr angenehm und freundschaftlich.

Ich danke meinen Kooperationspartnern sowie allen Autoren und Co-Autoren der Publikationen, an denen ich beteiligt war. Durch ihren wissenschaftlichen Ehrgeiz kamen gemeinsame Projekte zu einem hervorragenden Abschluss.

Meinen Mitdoktoranden danke ich für die tolle kollegiale Stimmung, die Unterstützung bei Problemen und viele hilfreiche Ratschläge.

Katja Schreiber, Antje Kretschmer und Vartitér Seher danke ich für die großartige Hilfe und Unterstützung bei vielen Experimenten.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern, Geschwistern und Dirk bedanken. Für deren Unterstützung und Förderung auf allen denkbaren Ebenen wofür ich viel zu selten Danke sage. Sie waren immer für mich da und waren mir eine große Stütze, indem sie mich immer wieder motiviert haben.