

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

DISSERTATION

Autoantikörper gegen Selenoprotein P als neue Modulatoren
von
Autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen

Autoantibodies to Selenoprotein P as new modulators of
Autoimmune Thyroid Disease

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Qian Sun

Datum der Promotion: 25.06.2023

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	iv
Abbildungsverzeichnis.....	v
Abkürzungsverzeichnis.....	vi
Zusammenfassung.....	1
1. Einleitung.....	2
1.1. Das Spurenelement Selen und Selenoproteine.....	2
1.2. Der Selen-Transporter-Selenoprotein P.....	3
1.3. Selen und Selenoproteine in der Homöostase der Schilddrüsenachse.....	5
1.4. Chronische Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse.....	6
1.5. Se in Autoimmunschilddrüsenerkrankung (AITD).....	7
1.6. Zielsetzung der Arbeit.....	8
2. Methodik.....	9
2.1. Material.....	9
2.1.1. Laborgeräte.....	9
2.1.2. Software und Datenbanken.....	10
2.1.3. Gebrauchsfertige Reaktionssysteme (Kits).....	10
2.1.4. Humane Proben.....	10
2.2. Zellkultur Methoden.....	12
2.2.1. Kryokonservierung von Zelllinien.....	12
2.2.2. Stammerhaltung von Zelllinien.....	12
2.3. Klonierung von SELENOP-SEAP Reporter-Konstrukt.....	12
2.4. Rekombinante Expression von SEAP-SELENOP Reporter-Proteinen.....	13
2.5. Immunoluminometrischer Assay zur Detektion der SELENOP-aAk.....	13
2.6. Isolierung von Immunglobulin G (IgG) aus Serumproben.....	14
2.7. Bestimmung des Selenstatus.....	14
2.7.1 Bestimmung der GPX3-Aktivität.....	14

2.7.2	Bestimmung der Se-Konzentration	15
2.7.3	Bestimmung der SELENOP-Konzentration.....	16
2.8.	Luciferase-Reporter-Gen-Assay	16
2.9.	Statistische Auswertung	17
3.	Ergebnisse	18
3.1.	Querschnittanalyse des Se-Status der Schilddrüsenpatienten aus Berlin	18
3.2.	Se-Supplementation bei Patienten mit Hashimoto Thyreoiditis	20
3.3.	Autoantikörper gegen SELENOP bei Patienten und Probanden	21
3.3.1.	Charakterisierung des Assays zur Detektion von SELENOP-aAk	21
3.3.2.	Prävalenz der SELENOP-aAk in Schilddrüsenpatienten	22
3.4.	Autoimmunität gegen SELENOP beeinflusst den Se-Metabolismus	24
3.4.1.	Interaktionen der Biomarker des Se-Status bei AITD Patienten und die potenzielle Rolle von SELENOP-aAk	24
3.4.2.	Vergleich der drei komplementären Biomarker des Se-Status in Bezug auf die SELENOP-Autoimmunität.....	27
4.	Diskussion	29
4.1.	Se-Status der Schilddrüsenpatienten	29
4.1.1.	Querschnittanalyse des Se-Status der Schilddrüsenpatienten	29
4.1.2.	Auswirkung der Se-Supplementation bei Hashimoto Thyreoiditis.....	30
4.2.	Autoimmunität gegen den Selen-Transporter	32
4.2.1.	Autoimmunität gegen SELENOP in Patienten und Probanden	32
4.2.2.	Autoantikörper gegen SELENOP als neue Modulatoren des Se-Status	32
5.	Schlussfolgerungen	34
	Literaturverzeichnis	35
	Eidesstattliche Versicherung	46
	Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen.....	47
	Auszug aus der Journal Summary List (Publikation 1)	49
	Druckexemplar der Publikation 1	54

Auszug aus der Journal Summary List (Publikation 2)	67
Druckexemplar der Publikation 2.....	76
Auszug aus der Journal Summary List (Publikation 3)	83
Druckexemplar der Publikation 3.....	88
Lebenslauf.....	100
Komplette Publikationsliste.....	102
Danksagung	106

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 <i>Verwendete Laborgeräte und deren Hersteller.</i>	9
Tabelle 2 <i>Verwendete Software und Datenbanken sowie deren Hersteller</i>	10
Tabelle 3 <i>Auflistung der Studienkohorten</i>	11
Tabelle 4 <i>Zusammensetzung der Schilddrüsenpatienten-Kollektiv 1</i>	18
Tabelle 5 <i>Prävalenz von Se-Mangel in Bezug auf Schilddrüsenerkrankungen</i>	19
Tabelle 6 <i>Anti-Schilddrüsen-Antikörper und Schilddrüsenhormone im Serum von Patienten vor und nach einer 6-monatiger Se-Supplementierung</i>	20
Tabelle 7 <i>Se-Status und Antioxidative Kapazität (FRAP) im Serum von Patienten vor und nach 6-monatiger Se-Supplementierung</i>	21
Tabelle 8 <i>Geschlechtsspezifische Prävalenz der SELENOP-aAk in verschiedenen Gruppen</i>	24

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematischer Aufbau von SELENOP	4
Abbildung 2 Selenop-knockout (KO) in Nagern	4
Abbildung 3 Se-Status von Kontrollen und Schilddrüsenpatienten	19
Abbildung 4 Charakterisierung des Assays für die Detektion der SELENOP-spezifischen Autoantikörper	22
Abbildung 5 Prävalenz von SELENOP-aAk bei gesunden Probanden (Kontrolle, n = 400) und Schilddrüsenpatienten (n = 423).....	23
Abbildung 6 Interaktion der drei Serum Biomarker des Se-Status. Drei Biomarker des Se-Status wurden in Serumproben von AITD-Patienten (n = 284) bestimmt.....	25
Abbildung 7 Einfluss der SELENOP-aAk auf den Se-Status	26
Abbildung 8 Vergleich von drei komplementären Biomarkern des Se-Status in Bezug auf die SELENOP-Autoimmunität.....	28

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
aAb / aAk	Autoantibody / Autoantikörper
AITD	Autoimmune Schilddrüsenerkrankungen
ANA	antinukleäre Antikörper
ApoER2	Apolipoprotein E Rezeptor 2
BI	Binding Indices/ Bindungsindizes
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
CV	Coefficient of Variation/ Variationskoeffizient
DIO	Deiodase
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium F12
DMSO	Dimethylsulfoxid
FBS	Fetal Bovine Serum (foetales Rinderserum)
FRAP	Ferric-Ionen-reduzierende-antioxidative Kapazität
GPX	Gluthationperoxidase
GPX3	Glutathionperoxidase 3/ Glutathione Peroxidase 3
GSH	reduziertes Glutathion
HEK293-Zelle	humane embryonale Nierenzelle, Line 293
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HT	Hashimoto Thyreoiditis / Hashimoto's thyroiditis
Hypo	nicht-autoimmun- bzw. iatrogen-bedingte Hypothyreose
ICD-10	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision
IgG	Immunglobulin G
ILMA	Immunoluminometrischer Assay
IQR	Interquartile range/ Interquartilsabstand
CI	Konfidenzintervall
MB	Morbus Basedow
MW	Mittelwert
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
RLU	Relative Light Units / relative Lichteinheiten
RT	Raumtemperatur

SCa	Schilddrüsenkarzinom
SD	Standard Deviation / Standardabweichung
Se	Selen
SEAP	sezernierte embryonale alkalische Phosphatase
Sec	Selenocystein
SECIS	Selenocystein Insertionselemente
SELENOP	Selenoprotein P
SELENOP-aAb	Autoantibody to Selenoprotein P
SELENOP-aAk	Autoantikörper gegen Selenoprotein P
SELENOP-SEAP	rekombinantes Fusionsprotein aus SELENOP und SEAP
STAW	Standardabweichung
STRN	Struma nodosa
T3	Triiodthyronin
T4	Thyroxin
Tg	Thyreoglobulin
Tg-aAk	Autoantikörper gegen Thyreoglobulin
TPO	Thyreoperoxidase / thyroid peroxidase
TPO-aAk	Anti-Thyreoperoxidase-Autoantikörper
TSH	Thyreoida-stimulierendes Hormon
TSHR	TSH-Rezeptor
TSHR-aAk	TSH-Rezeptor-Autoantikörper
TXNRD	Thioredoxinreduktase
TXRF	Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse

Zusammenfassung

Das Spurenelement Selen (Se) ist essentiell für die menschliche Gesundheit. Durch Selenoproteine ist Se an vielen wichtigen physiologischen Vorgängen beteiligt, wie am Schilddrüsenhormonmetabolismus, den antioxidativen Abwehrsystemen, der Immunfunktion und männlichen Fertilität. Die physiologische Bedeutung des Selentransporters Selenoprotein P (SELENOP) wurde anhand eines transgenen Mausmodells erforscht. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Fehlen der SELENOP-Expression im Mausmodell zu einem Schilddrüsen-Phänotyp mit Wachstumsstörung, neurologischen Symptomen und Infertilität führt. Es ist bekannt, dass ein suboptimaler Se-Status ein Risikofaktor für autoimmune Schilddrüsenerkrankungen ist, und Autoantikörper der Schilddrüse die Entwicklung von Schilddrüsenerkrankungen begünstigen. Die Primärsequenz von SELENOP ist aufgrund translationaler Vorgänge im Menschen variabel. Deshalb haben wir die Arbeitshypothese abgeleitet, dass verschiedene SELENOP-Formen als Autoantigene bei Schilddrüsenerkrankungen erkannt werden und SELENOP-Autoantikörper den Se-Metabolismus und Se-Transport beeinflussen. Hierzu wurde ein analytischer Test neu entwickelt und charakterisiert.

Drei genehmigte klinische Studien waren verfügbar, um diese Hypothese experimentell zu testen. Die Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen hatten im Vergleich zu gesunden Probanden eine relativ niedrigere Se Konzentration im Serum. In einer Se-Interventionsstudie senkte die Se-Supplementierung signifikant den Spiegel der Anti-Thyreoperoxidase (TPO)-Antikörper, was die Schilddrüsenfunktion stabilisieren könnte. Eine erhöhte Prävalenz der SELENOP-Autoantikörper zeigte sich in den Schilddrüsen Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden. Die höchste Prävalenz wurde bei den Patienten mit Hashimoto Thyreoiditis beobachtet. Interessanterweise zeigte sich in den Patienten mit hohen SELENOP-Autoantikörpertitern relativ geringe Enzymwerte für die Glutathionperoxidase-3 (GPX3) im Serum, welche in der Niere produziert wird. Da SELENOP die Niere mit Se für die GPX3 Biosynthese versorgt, deutet dieser Befund auf eine beeinträchtigte renale Se-Aufnahme durch SELENOP-Autoantikörper hin. Diese Beobachtung wurde auch in Zellkulturversuchen zur Se-Aufnahme mit SELENOP spezifischen Antikörpern bestätigt. Unsere Ergebnisse zeigen somit, dass der Se-Transport durch natürliche SELENOP-Autoantikörper beeinträchtigt werden kann und die Autoimmunität gegen SELENOP als zusätzlicher Biomarker des Se-Status einzubeziehen ist.

Abstract

The trace element selenium (Se) is essential for human health. Through selenoproteins, Se is involved in many important physiological processes, such as thyroid hormone metabolism, antioxidant defence systems, immune function and male fertility. The physiological significance of the selenium transporter selenoprotein P (SELENOP) was investigated by a transgenic mouse model. It was shown that the absence of SELENOP expression in mice leads to a thyroid phenotype with growth disturbance, neurological symptoms and infertility. It is known that suboptimal Se status is a risk factor for autoimmune thyroid disease, and thyroid autoantibodies promote the development of thyroid disease. The primary sequence of SELENOP is variable due to translational processes in humans. Therefore, we hypothesized that different SELENOP forms are recognized as autoantigens in thyroid diseases and that SELENOP autoantibodies influence Se metabolism and Se transport. For this purpose, an analytical assay was newly developed and characterized.

Three approved clinical trials were available to test this hypothesis experimentally. Patients with thyroid disease had relatively lower serum Se concentrations compared to healthy subjects. In a Se intervention study, Se supplementation significantly lowered levels of anti-thyroid peroxidase (TPO) antibodies, which could stabilize thyroid function. An increased prevalence of SELENOP autoantibodies was seen in thyroid patients compared to healthy subjects. The highest prevalence was observed in the patients with Hashimoto's thyroiditis. Interestingly, the patients with high level of SELENOP autoantibody showed relatively low enzyme levels for glutathione peroxidase-3 (GPX3), which is produced in the kidney. Since SELENOP supplies the kidney with Se for GPX3 biosynthesis, this finding suggests impaired renal Se uptake by SELENOP autoantibodies. This observation was also confirmed in cell culture experiments on Se uptake with SELENOP specific antibodies. Our results thus indicate that Se transport can be impaired by natural SELENOP autoantibodies and that autoimmunity to SELENOP should be included as an additional biomarker of Se status.

1. Einleitung

Die genetische Prädisposition, Umweltfaktoren, Ernährungsfaktoren und Immunstörungen tragen zur Entwicklung von Autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen (AITD) bei. Humane Studien und tierexperimentelle Arbeiten deuten auf eine bedeutende Rolle von Selen (Se) und Selenoproteinen für die Schilddrüsengesundheit hin, jedoch gibt es Diskrepanzen in verschiedenen Studien über den Vorteil des verbesserten Se-Status bei AITD. Die Bedeutung des Se-Status für die AITD und ein potentieller neuer Modulator der Se-Schilddrüsen-Interaktion wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

1.1. Das Spurenelement Selen und Selenoproteine

Selen (Se) ist sowohl ein essentielles Spurenelement als auch ein gefährliches Toxin. Bis zur Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts wurde Se nur mit den toxischen Eigenschaften in Verbindung gebracht, während der positive Charakter jahrhundertlang unentdeckt blieb. Der erste Hinweis auf die essentiellen Eigenschaften des Se wurden von Schwarz und Foltz publiziert ^{1, 2}. Hierbei wurde die protektive Wirkung von Se in Form einer organischen Komponente aus Schweineleber und in anorganischer Form im Tierversuch gegen nahrungsinduzierte Lebernekrose entdeckt. Seitdem wurden immer weitere Beteiligungen im Organismus entdeckt. Als ein essentielles Spurenelement spielt Se eine unverzichtbare Rolle bei der Aufrechterhaltung des Immunsystems und für endokrine, metabolische und zelluläre Homöostase ³.

Die physiologischen Funktionen von Se werden hauptsächlich durch Selenoproteine ausgeübt, die in ihrer Primärstruktur Se in Form der 21ten proteinogenen Aminosäure Selenocystein (Sec) enthalten ⁴. Sec besitzt ein erhöhtes Redox-Potential im Vergleich zu ihrem schwefelhaltigen Homolog Cystein. Sec ist dabei Bestandteil des aktiven Zentrums von einer heterogenen Gruppe von Selenoproteinen mit enzymatischer Aktivität für Redoxreaktionen ⁵. Die Insertion von Sec in die Polypeptidkette während der Translation ist genetisch durch das Codon UGA kodiert und wird durch eine Vielzahl an Faktoren reguliert ⁶.

Das humane Selenoproteom wird von nur 25 Genen codiert ⁷, dazu gehören die Glutathionperoxidasen (GPX) 1-4, und 6, die Deiodasen (DIO) 1-3, Thioredoxinreduktasen (TXNRD) 1-3, und der Se-Transporter Selenoprotein P

(SELENOP)⁸. Durch bioinformatisches Screening wurden auch weitere Selenoprotein-Gene identifiziert. Diese konnten bisher weniger gut charakterisiert werden⁷.

Viele Selenoproteine sind Bestandteile der zellulären antioxidativen Abwehr. Während GPX und TXNRD für den Abbau reaktiver Sauerstoffspezies zuständig sind, beteiligt sich Selenoprotein R (Methionin-Sulfoxid-Reduktase B) an der Reparatur oxidierter Metaboliten, und Selenoprotein S ist am Abbau von falsch gefalteten Proteinen im endoplasmatischen Retikulum beteiligt⁷. Enzyme der DIO-Familie katalysieren die Aktivierung und Inaktivierung der Schilddrüsenhormone Thyroxin (T4) und Trijodthyronin (T3)^{9, 10}.

Die Synthese von Selenoproteinen ist durch die Se-Verfügbarkeit des Organismus reguliert. Insbesondere in einer Se-Mangelsituation unterliegt die Expression der Selenoproteine einem stringent regulierten Mechanismus¹¹. Bei anhaltenden und extremen Se-Mangelsituationen konnten in der Bevölkerung zwei endemische Mangelkrankungen identifiziert werden: die Keshan- und die Kashin-Beck-Krankheit¹². Für beide konnte eine Prophylaxe bzw. Therapie durch Se-Supplemente erfolgreich gezeigt werden^{13, 14}. Im Vergleich zu anderen Spurenelementen besitzt Se einen relativ geringen sicheren therapeutischen Bereich. Ab einer täglichen Aufnahme von 800 µg kann eine Se-Intoxikation auftreten, welche als Selenose bezeichnet wird. Diese äußert sich durch Haarausfall, Veränderungen der Nägel, Erbrechen, Durchfälle, Müdigkeit und Depression¹⁵.

1.2. Der Selen-Transporter-Selenoprotein P

Das Se-Transporterprotein SELENOP ist hinsichtlich der Struktur und Funktion einzigartig unter den Selenoproteinen. Die SELENOP mRNA besitzt, statt einem einzelnen Sec wie bei anderen humanen Selenoproteinen, im Menschen zehn Sec-codierende UGA-Codone im offenen Leseraster und dazu noch zwei Selenocystein Insertionselemente (SECIS) im 3'-untranslatierten Bereich. Somit könnte ein humanes SELENOP bis zu zehn Sec-Reste pro Protein enthalten¹⁶. Davon befindet sich ein Sec in der Nähe der N-terminalen Domäne, welches möglicherweise Redox-enzymatische Aktivitäten besitzt¹⁷. Die verbleibenden neun Sec befinden sich in der Nähe der C-terminalen Domäne, und fungieren als Selenspeicher und Transporter¹⁸. Der schematische Aufbau des SELENOP-Proteins ist in der **Abbildung 1** gezeigt.

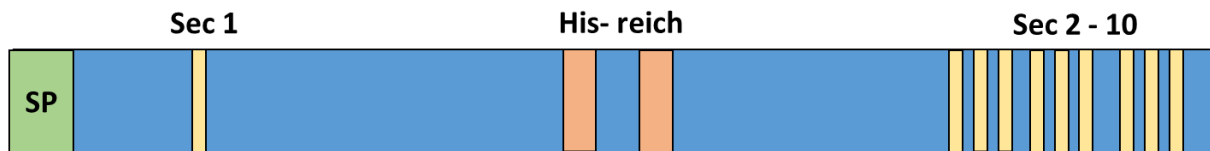


Abbildung 1 Schematischer Aufbau von SELENOP. SELENOP besitzt ein Signalpeptid (SP), einen ersten katalytisch relevanten Sec-Rest (Sec1), gefolgt von einer Histidin-reichen Domäne (His-reich). Der C-Terminus kann bis zu 9 weitere Sec-Reste enthalten (Sec 2-10), die nach zellulärer Aufnahme abgespalten und für die Synthese anderer Selenoproteine verwendet werden können (Adaptiert aus Hatfield et al. 2011).

SELENOP umfasst über 50 % des im Blut zirkulierenden Total-Se, und stellt zusammen mit GPX3 den Großteil der Plasma-Selenoproteine dar ¹⁹. Um den Selenstatus ausreichend gut zu bestimmen, empfiehlt es sich deshalb, drei Biomarker in humanen Probenmaterial zu bestimmen. Diese Analyse umfasst dann den Gesamtselengehalt (Total-Se), die SELENOP-Konzentration und die GPX-Aktivität ²⁰. Die physiologische Bedeutung von SELENOP im Organismus wurde erstmals im SELENOP knockout Maus Modell gezeigt ²¹. Die Abwesenheit von SELENOP im Mausmodell war nicht letal, aber induzierte schwere neurologische Störungen, einen Schilddrüsen-Phänotyp mit Wachstumsstörung und Infertilität bei Männchen ²¹ (**Abbildung 2**).

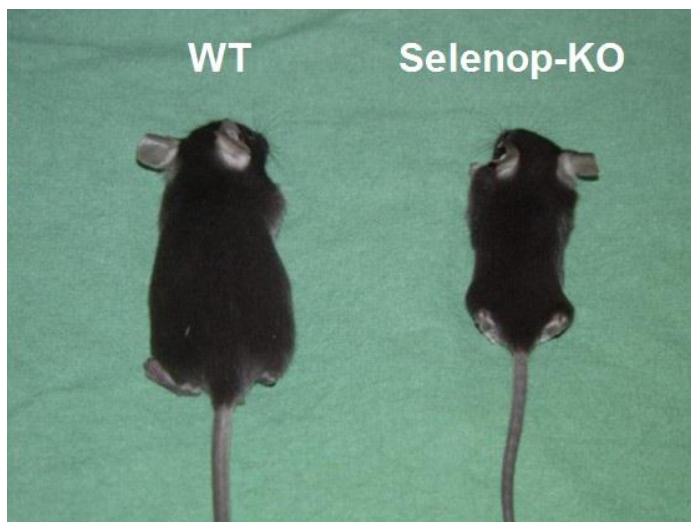


Abbildung 2 Selenop-knockout (KO) in Nagern. Photo einer homozygoten Selenop-KO-Maus (rechts) neben einem Wildtyp-Wurfgeschwister (links) im Alter von 5 Wochen (Modifiziert nach Schomburg L et al., 2003).

Die SELENOP-abhängige Se-Versorgung von Zielzellen lässt sich durch eine rezeptorvermittelte Aufnahme vermitteln. Das zirkulierende SELENOP kann dabei an den Apolipoprotein E Rezeptor 2 (ApoER2) ²² oder Megalin ²³ binden. Es wurde gezeigt, dass SELENOP wichtig für die Se-Versorgung des Gehirns und der Geschlechtsorgane ist ¹⁹.

Sowohl das SELENOP Knockout Modell als auch Se-defizientes Futter im ApoER2 Knockout Mausmodell induzieren neurodegenerative Phänotypen ²⁴.

Die Expression des SELENOP ist hauptsächlich durch die Se-Verfügbarkeit des Organismus reguliert ²⁵. Weiterhin wird die SELENOP Transkription durch inflammatorische Signale, wie Zytokine und TGF β Signalkaskaden, moduliert ²⁶. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Lipopolysaccharide (LPS) eine starke Reduzierung der SELENOP-Konzentration im Serum erzeugen ²⁷. Auch bei Patienten mit starken oder chronischen inflammatorischen Bedingungen, wie Sepsis, COVID-19 oder Krebs-Erkrankungen, wurde ein ausgeprägter Abfall von SELENOP beobachtet ^{20, 28, 29}. Eine weitere Besonderheit weist die humane SELENOP-Expression hinsichtlich Translationsfehlern auf ³⁰. Unter limitierter Se-Versorgung oder antibiotischer Behandlung kann irrtümlich bei der Decodierung der UGA-Triplets innerhalb des offenen Leserasters Sec durch Cystein oder andere Se-freie Aminosäuren ersetzt werden. Sequenzierungen zeigten, dass anstelle des Sec auch Tryptophan oder Arginin in die Primärsequenz eingebaut werden. Aufgrund dieser translationalen Ungenauigkeit stellt neu synthetisiertes SELENOP eine Mischung aus leicht unterschiedlichen Proteinvarianten dar und kann somit vermutlich Autoantikörper gegen SELENOP (SELENOP-aAK) auf natürliche Weise induzieren, insbesondere bei Patienten mit bestehenden Autoimmunerkrankungen.

1.3. Selen und Selenoproteine in der Homöostase der Schilddrüsenachse

Die Schilddrüse stellt mit einer Selenkonzentration von 0,2–2 $\mu\text{g/g}$ eines der Se-reichsten Organe dar. Hier werden die meisten Selenoproteine exprimiert ³¹. Aufgrund dieser Beobachtung wird Se mit der Schilddrüsengesundheit und Schilddrüsenerkrankungen in Verbindung gebracht. Die essentielle Rolle von Se für die Schilddrüsenfunktion rückte erstmals durch die Beschreibung eines endemischen Kretinismus in den Fokus der Forschung. Dieser äußert sich durch eine Hypothyreose, Myxödeme und Entwicklungsstörungen bei gleichzeitigem Mangel an Jod und Se, und ist als Myxödematöser Kretinismus bekannt ³². Seitdem wurde immer mehr über die Funktionen von Se in der Schilddrüse erforscht. Heutzutage ist es gesichert, dass mehrere Selenoproteine wichtige Aufgabe in der Schilddrüse übernehmen ^{31, 33}. Vor allem spielen zwei Selenoprotein-Familien eine unersetzbare Rolle bei der Homöostase der Schilddrüse, die DIO- und die GPX-Familie. DIOs kontrollieren den Umsatz der

Schilddrüsenhormone und katalysieren die Umwandlung von Thyroxin (T4) in seine biologisch aktive Form Triiodthyronin (T3) durch das Abspalten eines Jod-Moleküls vom äußeren Ring, oder auch inaktivieren Schilddrüsenhormone durch das Abspalten eines Jod-Moleküls des inneren Rings, wobei T4 bzw. T3 in inaktive Metaboliten umgewandelt wird⁹. GPXs tragen zur antioxidativen Abwehr in der Schilddrüse bei, indem sie den Überschuss an freien Sauerstoffradikalen abbauen, die während der normalen Biosynthese der Schilddrüsenhormone produziert werden³⁴. In Tiermodellen wurde gezeigt, dass eine beeinträchtigte GPX-Aktivität zusammen mit einem Se-Mangel zu einer oxidativen Schädigung der Thyreozyten führt. Dabei kann es zu einer Ausbildung einer Fibrose kommen³⁵.

1.4. Chronische Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse

Autoimmune Schilddrüsenerkrankungen (AITD) sind die häufigsten organspezifischen Autoimmunerkrankungen und betreffen 2–5 % der Bevölkerung³⁶. Es gibt dabei eine große Geschlechtsvariabilität (Frauen 5–15 % und Männer 1–5 %)³⁷. Eine AITD kann durch fehlerhafte Immuntoleranz zu Schilddrüsenproteinen, durch das Ausmaß der Lymphozyten-Infiltration, der Inflammation in der Schilddrüse und den Hormonstatus charakterisiert werden. Die Autoantikörperbildung gegen Schilddrüsenantigene kennzeichnet AITD^{38, 39}. Zu den AITD gehören unter anderem die zwei häufigsten Formen der Schilddrüsenerkrankungen, Morbus Basedow (MB) und Hashimoto Thyreoiditis (HT), welche die Hauptursachen für Hyperthyreose und Hypothyreose darstellen⁴⁰. Obwohl HT und MB beide auf Autoimmunität der Schilddrüse zurückgehen, unterscheiden sie sich hinsichtlich ihres pathologischen Mechanismus. Im Fall der HT kommt es durch Lymphozyten-Infiltration und Inflammation zur Schädigung des Schilddrüsengewebes und damit zu initialer und kurzfristiger Hyperthyreose und langfristiger Hypothyreose durch den Verlust von Thyreozyten⁴¹. Beim MB sind natürliche aAk gegen den Rezeptor des Thyroidea-stimulierenden Hormons (TSHR-aAk, kurz TRAKs) ursächlich für den klinischen Phänotyp, da sie als endokrin aktive Agonisten an den TSH-Rezeptor binden und eine Hyperthyreose und Schilddrüsen-Augenerkrankungen stimulieren⁴². Während die TSHR-aAk als entscheidende diagnostische Biomarker für MB gelten, gehören aAk zu den anderen beiden prominenten Schilddrüsenautoantigenen Thyreoperoxidase (TPO-aAk) und Thyreoglobulin (Tg-aAk), auch zu den essentiellen diagnostischen Markern der AITD,

welche sowohl bei MB als auch bei HT nachweisbar und mit zellvermittelter Zytotoxizität assoziiert sind ⁴³. Es werden auch aAk gegen spezifische Nicht-Schilddrüsen-Antigene beobachtet. Dies umfasst antinukleäre Antikörper (ANA), welche bei Patienten mit AITD beschrieben sind, und eine höhere Prävalenz bei Kopräsenz von TPO-aAk und Tg-aAk (75 % bzw. 69 %) zeigen ⁴⁴. AITD ist die häufigste diagnostizierte Autoimmunerkrankung, die mit anderen organspezifischen und nicht-organspezifischen Autoimmunerkrankungen assoziiert ist ⁴⁵. Neben der AITD ist das weibliche Geschlecht ein gemeinsamer Faktor, der signifikant mit Polyautoimmunität assoziiert ist ⁴⁶.

1.5. Se in Autoimmunschilddrüsenerkrankung (AITD)

Die Interaktion von Se und der Schilddrüse wurde wie in 1.3. geschrieben in zahlreichen Studien nachgewiesen. Es wurde daher intensiv über die positive Rolle von Se bei AITD diskutiert, sowohl für die Schilddrüsenfunktion als auch bezüglich der immunregulierten Funktionen ⁴⁷. Viele Studien haben die Wirkung einer Se-Supplementation auf die Progression von Hashimoto-Thyreoiditis untersucht. In der Studie von Gärtner et al. zeigte sich z.B., dass eine Supplementierung von 200 µg Natriumselenit pro Tag über einen Zeitraum von 90 Tage bei einer Gruppe von erwachsenen HT-Patienten mit niedrigem Se-Status die TPO-Ak-Konzentration signifikant reduziert hat und das Ultraschallbild der Schilddrüse verbesserte ⁴⁷. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurde bei Patienten mit HT in einer griechischen Studie auch über eine signifikante Abnahme der TPO-Ak-Konzentrationen bei kombinierter Behandlung mit 200 µg Selenomethionin und Levothyroxin über 6 Monate berichtet ⁴⁸. Auf der anderen Seite zeigte sich in einer Studie von Karanikas et al., dass die Se-Supplementation in einer Kohorte von HT-Patienten keine signifikanten immunologischen Veränderungen hervorrief, weder in Bezug auf Zytokin-Produktionsmuster von peripheren T-Lymphozyten noch auf TPO-Ak-Spiegel ⁴⁹. Diese kontroversen Ergebnisse deuten darauf hin, dass HT-Patienten mit unterschiedlicher Krankheitsaktivität möglicherweise nicht im gleichen Maße von einer Se-Supplementierung profitieren. Ferner wurde in diesen Studien auf die Relevanz von zusätzlichem Se für die aAk-Spiegel der Schilddrüsenantigene fokussiert. Wichtig wäre es aber auch, den Se-Status vor, während und nach der Intervention zu beobachten, um heterogene Schlussfolgerungen besser diskutieren zu können und Dosis-Wirkungsbeziehungen abzuleiten.

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Die chronische Inflammation bei AITD führt zu einem niedrigen Se-Status und damit zu einer größeren Wahrscheinlichkeit der translationalen Ungenauigkeit bei der SELENOP-Biosynthese. Hierdurch steigt das Risiko für die Biosynthese von SELENOP Varianten mit veränderter Primärsequenz und so für die Entwicklung von SELENOP-aAk, insbesondere bei Patienten mit bestehender autoimmuner Prädisposition. Ziel dieser Arbeit war es, diese Hypothese durch den Nachweis von SELENOP-aAk bei AITD Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen zu testen und die Auswirkungen von SELENOP-aAk auf andere Biomarker der Erkrankung und des Selenstatus zu analysieren.

2. Methodik

2.1. Material

Verbrauchsmaterialien sowie Chemikalien für den Laborbedarf wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, von den folgenden Herstellern erworben: Bio-Rad Laboratories (München), Carl Roth (Karlsruhe), Eppendorf (Hamburg), Sigma (München), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Biochrom (Berlin) oder Merck (Darmstadt).

Das Plasmid pIRESneo (Clontech, Palo Alto, Kalifornien) mit der inserierten Sequenz der sezernierten embryonalen alkalischen Phosphatase (SEAP) wurde von Dr. W. B. Minich bereitgestellt.

2.1.1. Laborgeräte

In der nachfolgenden Tabelle (**Tabelle 1**) sind die verwendeten Laborgeräte und deren Hersteller aufgelistet.

Tabelle 1 *Verwendete Laborgeräte und deren Hersteller.*

Geräte	Hersteller
Analysenwaage CP 423S	Sartorius (Göttingen)
CO ₂ -Brutschrank HeraCell	Heraeus Sepatech (Osterode)
Heating block Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Hydroflex Washer	Tecan Group (Maennedorf, Schweiz)
Magnetrührer M 32	GLW (Würzburg)
Mikrotiterplattenschüttler Titramax 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach)
Multikanal Pipette Research Pro	Eppendorf (Hamburg)
Tecan NanoQuant infinite M200 PRO	Tecan Group (Maennedorf, Schweiz)
Reinstwasser-Anlage EASYpure UVTM	Barnstead Int. (Dubuque, USA)
Spektrophotometer NanoDrop 1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Personal spin vortex microspin FV-2400	Lab4you (Berlin)
Pipetten 0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand (Wertheim)
Zentrifugen-Röhrchen 15, 50ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße 1,5ml, 2,0ml	Eppendorf (Hamburg)
Serologische Pipetten 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Corning (Wiesbaden)
Tiefkühler profiline und Comfort	Liebherr (Bulle, Schweiz)

Total-reflection X-ray fluorescence S2-Picofox	Bruker Nano GmbH (Berlin)
Vortex-Genie 2	BioSan, Riga (Lettland)
Vortex REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG (Schwabach)
Waagen CP 2201, CP 323S	Sartorius (Göttingen)
Zentrifuge 5415D	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heareus Sepatec GmbH (Hanau)

2.1.2. Software und Datenbanken

Verwendete Software und Datenbanken sind in **Tabelle 2** aufgelistet.

Tabelle 2 *Verwendete Software und Datenbanken sowie deren Hersteller*

Software/Datenbanken	Hersteller
EndNote X7	Thomson Reuters, New York, U.S.A
GraphPad Prism 9.3.1	GraphPad Software, San Diego, U.S.A
Microsoft Office 2016	Microsoft Deutschland, Unterschleißheim
SPSS Statistics Version 25	IBM Deutschland GmbH, Ehningen
TEspirit 1.0	Bruker Nano GmbH, Berlin
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

2.1.3. Gebrauchsfertige Reaktionssysteme (Kits)

Zur Bestimmung der Konzentration des SELENOP in Serumproben oder in IgG-Fractionen wurde der selenOtest ELISA Kit der Firma selenOmed GmbH Berlin verwendet.

2.1.4. Humane Proben

Die Serumproben von Patienten mit verschiedenen Schilddrüsenerkrankungen (Schilddrüsenpatienten-Kollektiv 1 und 2, **Tabelle 3**) wurden in einer Gemeinschaftspraxis in Berlin, Deutschland, gesammelt und bis zum Messen bei -80°C gelagert. Die Rekrutierung der Patienten verlief konsekutiv. Anhand der klinischen Präsentation und den Krankheitsparametern wurden die Patienten gemäß der Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (ICD 10) klassifiziert, in folgende Gruppen eingeteilt: autoimmunbedingte Schilddrüsenerkrankung, wie MB und HT, oder andere Schilddrüsenerkrankungen, wie nicht-autoimmun- bzw. iatrogen-bedingte Hypothyreose (Hypo), Struma nodosa (STRN), oder Schilddrüsenkarzinom (SCa). Als Kontrolle wurden

zwei Serumkollektive gesunder Probanden ($n = 200$ und $n = 400$) von einem kommerziellen Anbieter (in.vent Diagnostica GmbH, Hennigsdorf, Deutschland) bezogen (**Tabelle 3**). Alle eingeschlossenen Proben wurden nach schriftlicher Einverständniserklärung von den in die Studie aufgenommenen Probanden entnommen, und die Laboranalysen erfolgten verblindet im Analyselabor des Instituts für Experimentelle Endokrinologie der Charité. Die Studie wurde in Übereinstimmung mit der Helsinki-Deklaration zu ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen durchgeführt und von der ethischen Prüfungskommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin genehmigt (#EA2/173/17).

Tabelle 3 Auflistung der Studienkohorten

Studienkohorte	Charakter	Beteiligte Studie
Kontroll-Kollektiv 1	$n = 200$	Studienleiter: Prof. Schomburg, Studienarzt: Seb. Mehl
Geschlecht, w/m [n/n]	100/100	
Alter, Median (95% CI) [Jahre]	46 (43-48)	
Kontroll-Kollektiv 2	$n = 400$	Q. Sun et al., 2021
Geschlecht, w/m [n/n]	200/200	
Alter, Median (95% CI) [Jahre]	31 (29-32)	
Schilddrüsenpatienten-Kollektiv 1	$n = 323$	Studienleiter: Prof. Schomburg, Studienarzt: Seb. Mehl.
Geschlecht, w/m [n/n]	278/45	
Alter, Median (95% CI) [Jahre]	51 (49-53)	
Schilddrüsenpatienten-Kollektiv 1+2	$n = 423$	Q. Sun et al., 2021
Geschlecht, w/m [n/n]	362/61	
Alter, Median (95% CI) [Jahre]	49 (47-51)	
Schilddrüsenpatienten-Kollektiv 3	$n = 29$	Paweł Zagrodzki, Krakau, Polen
Geschlecht, w/m [n/n]	29/0	
Alter, MW \pm STABW [Jahre]	37,0 \pm 7,4	

w: weiblich, m: männlich, MW: Mittelwert, STABW: Standardabweichung, CI: Konfidenzintervall

Außerdem wurden in einer Kooperation mit Kollegen aus Krakau, Polen, eine Interventionsstudie bei 29 Frauen (Schilddrüsenpatientinnen-Kollektiv 3) mit neu diagnostizierter und zuvor unbehandelter Hashimoto-Thyreoiditis mit Euthyreose oder subklinischer Hypothyreose, die zwischen April 2012 und Dezember 2016 eines der medizinischen Zentren in Krakau besuchten, Serumproben analysiert. Die Patientinnen hatten 6 Monate lang Selen in einer Dosis von 100 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ bekommen. Während der 6-monatigen Studiendauer wurden Serum- und Morgenurinproben gesammelt und bis zur Analyse bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Das Protokoll dieser Studie wurde von der Ethikkommission

der Jagiellonen-Universität in Krakau, Polen, genehmigt (KBET/55/B/2010, KBET/281/B/2012, 122.6120.182.2016). Die Proben wurden tiefgefroren an unser Labor in Berlin geliefert und dort ohne Kenntnis der klinischen Parameter analysiert.

2.2. Zellkultur Methoden

2.2.1. Kryokonservierung von Zelllinien

Zur längerfristigen Lagerung wurden die Zelllinien in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Für die Kryokonservierung wurden Zellen in 75 cm²-Kulturflasche bis zur 80% Konfluenz inkubiert, anschließend zweimal mit warmem PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin dissoziiert. Die abgelösten und vereinzelt Zellen wurden in 13 ml Kulturmedium suspendiert und bei 1000xg, Raumtemperatur (RT) für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Kryomedium (40% (v/v) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM/F12; Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland), 50 % (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS) und 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)) resuspendiert und in 1 mL Aliquots in Kryogefäße abgefüllt. Bevor sie dauerhaft in Stickstoff gelagert werden, wurden die Stocks zunächst für 24 h in einer Styroporbox bei -80°C eingefroren.

2.2.2. Stammerhaltung von Zelllinien

Die Kryogefäße mit Zellen wurden bei Bedarf aus dem Stickstofftank direkt in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaucht. Im Anschluss wurden die Zellen in 10 mL vorgewärmten Kulturmedium überführt und bei 1000xg bei RT für 5 min zentrifugiert, um das DMSO zu entfernen. Anschließend wurde das Zellpellet in 12 ml Kulturmedium aufgenommen und in einer 75 cm² Zellkulturflasche ausgesät. Die Passagierung erfolgte bei einem Konfluenzgrad von ungefähr 80 %. Waren ausreichend Zellen vorhanden, wurden diese in eine unbeschichtete Flasche (75 cm²) übertragen. Ein Mediumwechsel (DMEM + 10 % (v/v) FBS) erfolgte jeden zweiten Tag.

2.3. Klonierung von SELENOP-SEAP Reporter-Konstrukt

Die cDNA eines UGA-freien humanen SELENOP-Leserahmens wurde synthetisiert, wobei alle UGA Codons durch Cystein-Codons ersetzt wurden (Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Deutschland). Das cDNA Fragment wurde durch PCR amplifiziert. Nach Restriktionsverdau und Extraktion über Agarosegelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente in die Vektoren pIRESneo-SEAP ligiert und anschließend in *E. coli*

transformiert. Positive Klone mit hoher Produktion wurden identifiziert und die Expressionsplasmide wurden durch Sequenzierung verifiziert.

2.4. Rekombinante Expression von SEAP-SELENOP Reporter-Proteinen

Für die Proteinproduktion von SELENOP-SEAP wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK 293-Zellen) in DMEM/F12 (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) mit 10 % (v/v) FBS bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und mit dem Expressionsvektor, pIRESneo-SEAP-SELENOP, unter Verwendung von FuGENE®-Reagenz (Promega) transfiziert. Erfolgreich transfizierte Zellen wurde 48 Stunden nach der Transfektion durch Kultivieren in DMEM/F12 mit 10 % (v/v) FBS und 0,8 mg/ml Geneticin (G418) selektiert. Stabile Klone mit hoher Expression des rekombinanten Proteins (SELENOP-SEAP) wurden expandiert. Die Zellkulturüberstände wurden gesammelt und in Aliquots von 1,0 mL verteilt und bis zur analytischen Verwendung bei -80°C gelagert.

2.5. Immunoluminometrischer Assay zur Detektion der SELENOP-aAk

Der SELENOP-aAk-Detektionsassay basiert auf der Bindung von aAk an rekombinantes SEAP-SELENOP und anschließender Präzipitation des Antikörper-Antigen-Reporter-Komplexes durch Protein A. Zu diesem Zweck wurden 40 µL verdünnte Zellkulturüberstände aus der rekombinanten SEAP-SELENOP Expression mit 5 µL Serumprobe bei 4°C über Nacht inkubiert. Am zweiten Tag erfolgte die Präzipitation der aAk-Antigen-Komplexe mit 40 µl eines 20%(v/v) Agarose-Protein A Präparats (ASKA Biotech GmbH, Berlin, Deutschland) für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) und 650 rpm. Um ungebundenes SEAP-SELENOP und andere Serumproteine zu entfernen wurden die an Protein A gebundenen Komplexe sechsmal mit Waschpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin und 0,5 % (v/v) Triton X-100) gewaschen. Am Ende wurde die Reporteraktivität als Lumineszenz durch Zugabe von Substrat der SEAP (CSPD Substrate, Thermo Fischer) nachgewiesen. Der Bindungsindex (BI) wurde für jede Probe berechnet, indem die relativen Lichteinheiten (RLU) der Probe mit der durchschnittlichen RLU von den niedrigsten 50% der Signale (als BI = 1,0 gesetzt) in derselben Assay-Platte dividiert wurden. Diese mathematische Berechnungsmethode zur Definition von Hintergrundsignalen basiert auf der Annahme, dass SELENOP-aAk in weniger als 50 % der getesteten Proben vorhanden sind. Basierend auf den konstant mitgeführten positiven und negativen Serumproben in jedem

Testlauf wurden die Variationskoeffizienten (CV) des Tests analysiert, dabei lagen Intra- und Inter-Assay CV beide jeweils deutlich unter 20 %.

2.6. Isolierung von Immunglobulin G (IgG) aus Serumproben

Die gesamte IgG-Fraktion aus ausgewählten positiven und negativen Serumproben wurde durch Präzipitation mit Protein A-Präparat (ASKA Biotech GmbH, Berlin, Deutschland) isoliert. Dazu wurden Serumproben mit dem zweifachen Volumen von Protein A-Präparat in PBS (50 %) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Überstände wurden am nächsten Tag verworfen und die Pellets wurden sechsmal mit PBS gewaschen. An Protein A gebundene IgG wurden mit dem dreifachen Volumen Zitronensäure (25 mM, pH 2,0) eluiert und anschließend unter Verwendung des 1-fachen Volumens von HEPES (1 M, pH 8,0) neutralisiert.

2.7. Bestimmung des Selenstatus

2.7.1 Bestimmung der GPX3-Aktivität

Die GPX3-Aktivität in Serumproben wurde mittels einen gekoppelten enzymatischen Assays bestimmt. Unter Verbrauch von Glutathion in reduzierter Form (GSH) katalysiert GPX3 die Reduktion von Wasserstoffperoxid. Zum Regenerieren des oxidierten GSH wurde in der anschließenden Reaktion Nicotinamid-Adenindinukleotid-Phosphat (NADPH) verbraucht, welches als Abnahme der Lichtabsorption bei 340 nm gemessen wurde und proportional zur GPX3-Aktivität in der Probe ist ⁵⁰. Zu diesem Zweck wurden je 5 µl Serumprobe mit 200 µl einer Reaktionsmischung gemischt. Die Reaktionsmischung wurde wie folgt bei Raumtemperatur lichtgeschützt für eine 96-Well-Platte hergestellt.

21,5 mL Basischer Puffer (100 mM Tris/HCl pH 7.6, 5 mM EDTA und 1 mM NaN ₃)
250 µL 10% Triton-X (1:10 Triton-X in ddH ₂ O)
150 µL 48 mM NADPH (NADPH in 10 mM KPO ₄ -Puffer pH 7.0)
250 µL 300 mM reduziertes GSH (GSH in ddH ₂ O)
7 U Glutathion-Reduktase (1,27 U/µL GR in Ammoniumsulfat)

22,2 mL Gesamtvolumen

Zum Starten der Reaktion wurde die Platte zuerst auf 25 °C temperiert und dann wurden 10 µL 0,00375% (v/v) H₂O₂ (1:8000 30% (v/v) H₂O₂ in ddH₂O) pro Reaktion zugegeben. Eine konstante Serumprobe wurde zur Qualitätskontrolle in jedem Assay-Durchlauf als Standard mitgeführt, und der Inter- und Intra-Assay-CV lagen beide je unter 15 %. Die GPX-Enzymaktivität wurde wie folgt berechnet:

$$GPx \text{ Aktivität } [U/L] = \frac{\Delta E_{340 \text{ nm}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot V_{\text{Ansatz}}}{6200 [M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] \cdot d[\text{cm}] \cdot V_{\text{Probe}}}$$

V_{Ansatz} : Gesamtansatzvolumen

V_{Probe} : Probeansatzvolumen

$\Delta E_{340 \text{ nm}}$: Extinktionsänderung pro Minute bei 340 nm

d: adjustierter Durchmesser in einem Well (0,64 cm)

Eine Enzymeinheit U entspricht dabei einem µmol Substratumsatz (NADPH-Umsatz) pro Minute unter 25°C.

2.7.2 Bestimmung der Se-Konzentration

Totale Se-Konzentrationen in Serumproben oder IgG-Isolaten wurden durch Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse (TXRF) mit einem TXRF-Analysator (S4 T-STAR, Bruker Nano GmbH, Berlin, Deutschland) gemessen. Dazu wurden die Serumproben mit einem Gallium-HPLC-H₂O Standard (1 mg/L, Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) 1:2 verdünnt, davon 8 µL auf polierte Quarzglasplatten aufgetragen und anschließend bei 37 °C über Nacht getrocknet. Isolierte IgG-Komplexe aus SELENOP-aAk positiven und negativen Serumproben wurden durch Zugabe von neun-Fach Volumina eiskaltem Ethanol (100%) über Nacht bei -80 °C und anschließender Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 14.000 rcf präzipitiert. Die Präzipitate wurden bei 80 °C für 2 h in 100 µL HNO₃ (61 %, mit 1 mg/L Gallium-Standard) gelöst, und anschließend wie bei Serumproben analysiert. Die Kalibrierung des Messgerätes erfolgte im Vorfeld durch einen Gallium-Standard. Als Kontrolle diente bei jedem Analysenlauf ein kommerzieller Serumstandard (Seronorm, Sero AS, Billingstad, Norwegen). Die Auswertung erfolgte anhand einer gerätespezifischen Software (TESprit 1.0). Die ermittelten Se-Konzentrationen lagen im spezifizierten Bereich des Standards und der Intra- und Inter-Assay CV lagen unter 5 %.

2.7.3 Bestimmung der SELENOP-Konzentration

SELENOP-Konzentrationen wurden mit einem kommerziellen SELENOP-spezifischen ELISA Kit (selenOtest ELISA, selenOmed GmbH, Berlin, Deutschland) gemäß der mitgelieferten Anleitung bestimmt. Zu diesem Zweck wurden 100 µL unverdünntes IgG-Isolat oder 1:33 verdünnte Serumproben in den Assay eingesetzt. Standards und Kalibrationen wurden zur Qualitätskontrolle in jeden Assay-Lauf eingeschlossen. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit einer 5-Parameter-Log-Funktion mithilfe der Software Graph Pad Prism 9. Der Intra- und Inter-Assay CV zwischen den Tests wurde als unter 10 % bestimmt.

2.8. Luciferase-Reporter-Gen-Assay

Ein Se-dosisabhängiger Reporter-Gen-Assay mit stabil transfizierten humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) wurde zur Analyse des Einflusses der SELENOP-Antikörper bei der SELENOP-Aufnahme eingesetzt. Die Zellen exprimierten einen Luciferase-Reporter, der ein Fusionsprotein von Firefly und Renilla Luciferase, dazwischenliegendem UGA-Codon und ein Selenocystein-Insertionssequenz (SECIS)-Element von GPX4 enthält³⁰. Für den Reporter-Gen-Assay wurden 20×10^3 Zellen pro Kavität in 96-Kavität-Platten in DMEM/F12 mit 10 % (v/v) FBS für 24 h kultiviert und anschließend in DMEM/F12 mit 2,5 % (v/v) FBS mit unterschiedlichen Se-Quellen, Natrium-Selenit (0, 5 oder 10 nM) oder Humanserum (in.vent Diagnostica GmbH Hennigsdorf, Germany) ± eines SELENOP-spezifischen Antikörpers (0,8 ng/mL fc, #SM-MAB-7356, selenOmed GmbH, Berlin, Deutschland) stimuliert. Die beiden verwendeten Humansen sind frei von SELENOP-aAk. Mit den Se-Konzentrationen dieser Seren von 100,6 µg/L und 109,7 µg/L werden entsprechende Se-Endkonzentrationen im Zellkulturmedium (0,5 % Serum, v/v) von 6,4 nM bzw. 6,9 nM erzielt. Nach 48 h Inkubation wurde das Medium entfernt und die Zellen in 40 µL passivem Lysis-Puffer (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) für 10 min bei RT lysiert und bei -30 °C bis zur Messung gelagert. Die Renilla-Luciferase-Aktivität wurde in 25 µL Zelllysaten nach Zugabe von Coelenterazin (100 µL/Well, 2,5 µg/mL in PBS, Synchem UG, Altenburg, Deutschland) für 30 s mit einem Mikroplatten-Luminometer gemessen (PerkinElmer, Waltham, USA).

2.9. Statistische Auswertung

Die Statistischen Analysen wurden mit SPSS (Version 25, SAS Institute, Cary, NC, USA) und GraphPad Prism v.9.1.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert mit Standardabweichung, Median mit Interquartilsabstand oder direkt durch die Einzelwerte dargestellt. Die Normalverteilung der Daten wurde durch den Shapiro-Wilk-Test getestet. Vergleich zwischen zwei Gruppen wurden mit dem Student's t-Test, und für nicht normalverteilte Variablen mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Korrelationen wurden durch die Korrelationsanalyse nach Pearson und für nicht normalverteilte Variablen durch den Korrelationstest nach Spearman getestet. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde als p-Wert ausgedrückt, wobei ein p-Wert $< 0,001$ als extrem signifikant, ein p-Wert $< 0,01$ als hochsignifikant, ein p-Wert $< 0,05$ als signifikant und ein p-Wert $> 0,05$ als nicht signifikant gilt.

3. Ergebnisse

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse wurden bereits in den Publikationen unserer Arbeitsgruppe beschrieben ⁵¹⁻⁵³.

3.1. Querschnittanalyse des Se-Status der Schilddrüsenpatienten aus Berlin

Um einen Überblick des Se-Staus von Schilddrüsenpatienten zu gewinnen, wurden erwachsene Patienten mit unterschiedlichen Schilddrüsenerkrankungen in der Stadt Berlin rekrutiert, um an der Querschnittsanalyse teilzunehmen. Es waren 323 Schilddrüsenpatienten zum Zeitpunkt der Analyse rekrutiert worden und konnten in die Querschnittsanalyse des Se-Status eingeschlossen werden.

Tabelle 4 Zusammensetzung der Schilddrüsenpatienten-Kollektiv 1

Diagnose	Alter, Median (95% CI) [Jahre]	n (w)	n (m)	n (Summe)
DQ	56 (31-70)	4	0	4
STRN	63 (57-67)	47	14	61
SCa	50 (43-65)	13	4	17
Hypo	45 (40-54)	57	4	61
MB	50 (42-54)	61	12	73
HT	49 (45-51)	96	11	107
Summe	51 (49-53)	278	45	323

w: weiblich, m: männlich, MW: Mittelwert, CI: Konfidenzintervall, DQ: de Quervain thyroiditis, STRN: Struma nodosa, SCa: Schilddrüsenkarzinom, Hypo: Hypothyreose (nicht-autoimmun/ iatrogen-bedingt), MB: Morbus Basedow, HT: Hashimotos Thyreoiditis. (Modifiziert nach Table 1 aus Mehl S. et al., 2020).

Die analysierten Schilddrüsenpatienten waren überwiegend Frauen (n=278, 86 %), was den typischen Geschlechtsunterschied der Prävalenz von Schilddrüsenerkrankungen reflektiert ⁵⁴. Das mittlere Alter der Schilddrüsenpatienten betrug 51 Jahre (**Tabelle 4**). Gleichzeitig wurden Serumproben von 200 gesunden Probanden (Kontroll-Kollektiv 1, **Tabelle 3**) aus der gleichen Region von einem kommerziellen Anbieter (in.vent Diagnostica GmbH, Hennigsdorf, Deutschland) bezogen und dienten als Kontrollen.

Die Mehrheit der Patienten litt an HT, GD, Hypothyreose oder Struma nodosa, und war in Behandlung. Eine kleine Anzahl von Patienten (n=18) wurde neu als Hypothyreose-Patienten identifiziert und war zum Zeitpunkt des Einschlusses in diese Studie therapienaiv. Weniger als 10 % der Patienten (n = 29) berichteten über eine gelegentliche oder regelmäßige Supplementation von Se im Dosisbereich von 45–150 µg pro Tag. Im

Vergleich zu den Kontrollen wurden signifikant niedrigere Se-Konzentrationen im Serum bei den Patienten beobachtet ($76,9 \pm 18,8 \mu\text{g/L}$ gegenüber $85,1 \pm 17,4 \mu\text{g/L}$) (**Abbildung 3**).

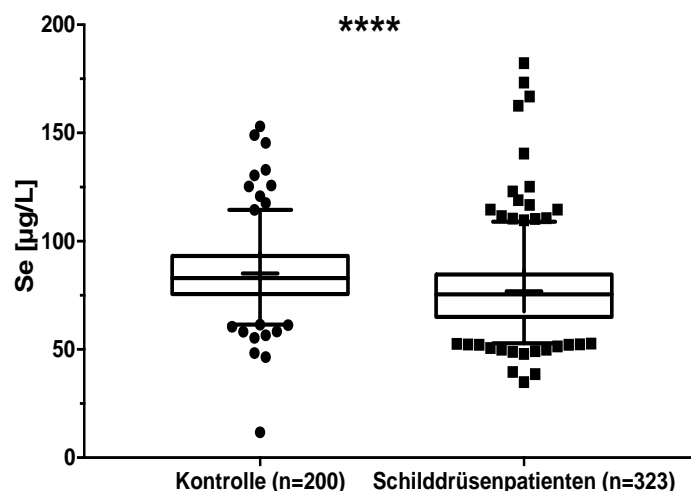


Abbildung 3 Se-Status von Kontrollen und Schilddrüsenpatienten. Ein direkter Vergleich der Serum-Se-Konzentration zwischen den zwei Gruppen zeigt eine deutlich niedrigere Se-Konzentration bei Schilddrüsenpatienten als bei Kontrollen. Die statistische Analyse wurde mit dem Student's t-Test durchgeführt, **** bedeutet $P < 0,0001$. (Modifiziert nach Fig. 1C aus Mehl S. et al., 2020)

Ein Vergleich innerhalb der Patientenkohorte zeigte, dass kein deutlicher Zusammenhang zwischen Se-Mangel und den einzelnen Erkrankungen bestand. Die einzige Ausnahme war eine große Fraktion der Patienten mit Schilddrüsenkarzinom, welche einen besonders niedrigen Se-Status aufwiesen (58,8%) (**Tabelle 5**). Bei der europäischen Querschnittsstudie EPIC zeigten von $n=1915$ analysierten Proben $n=473$ einen Se-Wert im Serum von $<70 \mu\text{g/L}$, also 24,7%²⁹, also deutlich weniger, als bei den Patienten.

Tabelle 5 Prävalenz von Se-Mangel in Bezug auf Schilddrüsenerkrankungen

	DQ	STRN	SCa	Hypo	MB	HT	Summe
n (Se < 70 µg/L)	0	22	10	26	29	34	121
n (summe)	4	61	17	61	73	107	323
% (Se < 70 µg/L)	0,0	36,1	58,8	42,6	39,7	31,8	37,5

DQ: de Quervain thyroiditis, STRN: Struma nodos, SCa: Schilddrüsenkarzinom, Hypo: Hypothyreose (nicht-autoimmun/ iatrogen-bedingt), MB: Morbus Basedow, HT: Hashimotos Thyreoiditis. (Modifiziert nach Table 3 aus Mehl S. et al., 2020)

3.2. Se-Supplementation bei Patienten mit Hashimoto Thyreoiditis

In dieser Kooperation wurde eine Studie an 29 Patienten mit neu diagnostizierter und zuvor unbehandelter Hashimoto-Thyreoiditis mit Euthyreose oder subklinischer Hypothyreose durchgeführt. Die Patienten wurden zwischen April 2012 und Dezember 2016 in einem der medizinischen Zentren in Krakau, Polen, rekrutiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Patienten erhielten eine Se-Supplementierung mit Dosis von 100 µg pro Tag für sechs Monate. Die Ergebnisse der schilddrüsenrelevanten Laborparametern im Serum der Patienten sind in Tabelle 6 gelistet. Nach der 6-monatigen Se-Supplementierung wurde eine signifikante Abnahme der durchschnittlichen TPO-aAk-Konzentrationen von 272,2 auf 248,5 IU/ml ($p = 0,02$) bei den Patienten beobachtet, während anderen Parametern nicht signifikant geändert wurden (**Tabelle 6**).

Tabelle 6 Anti-Schilddrüsen-Antikörper und Schilddrüsenhormone im Serum von Patienten vor und nach einer 6-monatiger Se-Supplementierung

Parameter	Initiale Werte	Finale Werte	Referenzbereich	p-Werte
TPO-aAk (IU/mL)	272,2 (117,5; 630,9) *	248,5 ± 155,3	< 34	p = 0,02
TSH (mIU/L)	3,37 ± 2,01	2,70 ± 1,13	0,27-4,20	p > 0,05
fT4 (pmol/L)	14,57 ± 2,04	14,89 ± 2,22	12-22	p > 0,05
T3 (nmol/L)	1,64 ± 0,29	1,64 ± 0,33	1,3-3,1	p > 0,05

*TPO-aAk: Thyreoperoxidase-Antikörper; fT4: freies Thyroxin; T3: Trijodthyronin. TSH: Thyroidea-stimulierendes Hormon. * Mittelwert und Konfidenzintervall nach Umrechnung in Logarithmen. (Modifiziert nach Table 1 aus Kryczyk-Kozioł J. et al., 2021)*

Neben den obengenannten Parametern wurde der Se-Status anhand von drei Serum Se-Biomarkern und die antioxidative Kapazität (FRAP, Ferric-Ionen-reduzierende-antioxidative Kapazität) im Serum der Patienten analysiert. Die durchschnittliche Konzentration von total-Se und SELENOP im Serum stieg nach Supplementierung von 75,0 auf 87,7 µg/L ($p < 0,01$) bzw. von 3,73 auf 4,40 mg/L ($p < 0,01$) signifikant an, während die GPX3 Aktivität und FRAP vor und nach Supplementierung nicht signifikant unterschiedlich waren (**Tabelle 7**).

Table 7 Se-Status und Antioxidative Kapazität (FRAP) im Serum von Patienten vor und nach 6-monatiger Se-Supplementierung

Parameter	Initiale Werte	Finale Werte	Referenzbereich*	p-Werte
Se (µg/L)	75,0 ± 11,1	87,7 ± 6,3	52,7-100,0	p < 0,01
SELENOP (mg/L)	3,73 ± 0,49	4,40 ± 0,61	2,4-5,1	p < 0,01
GPX3 (U/L)	222,9 ± 74,5	240,9 ± 118,7	191,0-644,5	p > 0,05
FRAP (µmol Fe ²⁺ /L)	600,4 ± 112,8	649,0 ± 114,1	491-945	p > 0,05

FRAP: Ferric-Ionen-reduzierende-antioxidative Kapazität. GPX3: Glutathionperoxidase 3; Se: Selen; SELENOP: Selenoprotein P. * Basierend auf Daten aus Studien, die in der Bevölkerung von gesunden Menschen in Polen durchgeführt wurden⁵⁵⁻⁶⁰. (Modifiziert nach Table 2 aus Kryczyk-Kozioł J. et al., 2021)

3.3. Autoantikörper gegen SELENOP bei Patienten und Probanden

3.3.1. Charakterisierung des Assays zur Detektion von SELENOP-aAk

Um SELENOP-aAk zu detektieren, wurde ein neuer immunoluminometrischer Assay (ILMA) aufgebaut. Die Testfunktionalität wurde mit einem SELENOP-spezifischen Antikörper und unterschiedlichen Serumproben von Patienten verifiziert. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der Signalintensität bei der Verdünnungsreihe von SELENOP-spezifischen Antikörper in einem Bereich von 0,078–5,0 µg/mL (**Abbildung 4A**), und es resultierten Bestimmtheitsmaße (R^2) durch sigmoidale 4 PL-Kurvenanpassung von über 0,99. Das dosisabhängige Signal wurde auch in den Verdünnungsexperimenten mit Serumproben von Patienten, die als positiv für SELENOP-aAk identifiziert wurden (P01–P05) bestätigt, während die Proben, die als negativ für SELENOP-aAb kategorisiert wurden (N01–N03), unabhängig von der Verdünnung nur Hintergrundsignale zeigten (**Abbildung 4B**). Um die Spezifität des Signals zu validieren wurden drei weitere Bedingungen getestet: 1) die Signalstärke der SELENOP-aAk-positiven Proben wurde durch das kompetitive Binden von rekombinanten SELENOP ohne Reporter (1 mg/mL) an SELENOP-aAk gehemmt; 2) BSA-freier Puffer (Kontrolle 1) oder 3) BSA-haltiger Puffer (Kontrolle 2, BSA: 1 mg/mL) zeigten keine kompetitive Hemmung der Signalstärke der SELENOP-aAk-positiven Proben (**Abbildung 4C**). Ferner zeigten alle drei Bedingungen keinen Einfluss auf die Signalstärke der SELENOP-aAk-negativen-Proben (**Abbildung 4C**). Diese Ergebnisse weisen auf geeignete Detektionsbedingungen des Assay für die Quantifizierung von SELENOP-spezifischen-aAk aus humanen Serumproben hin.

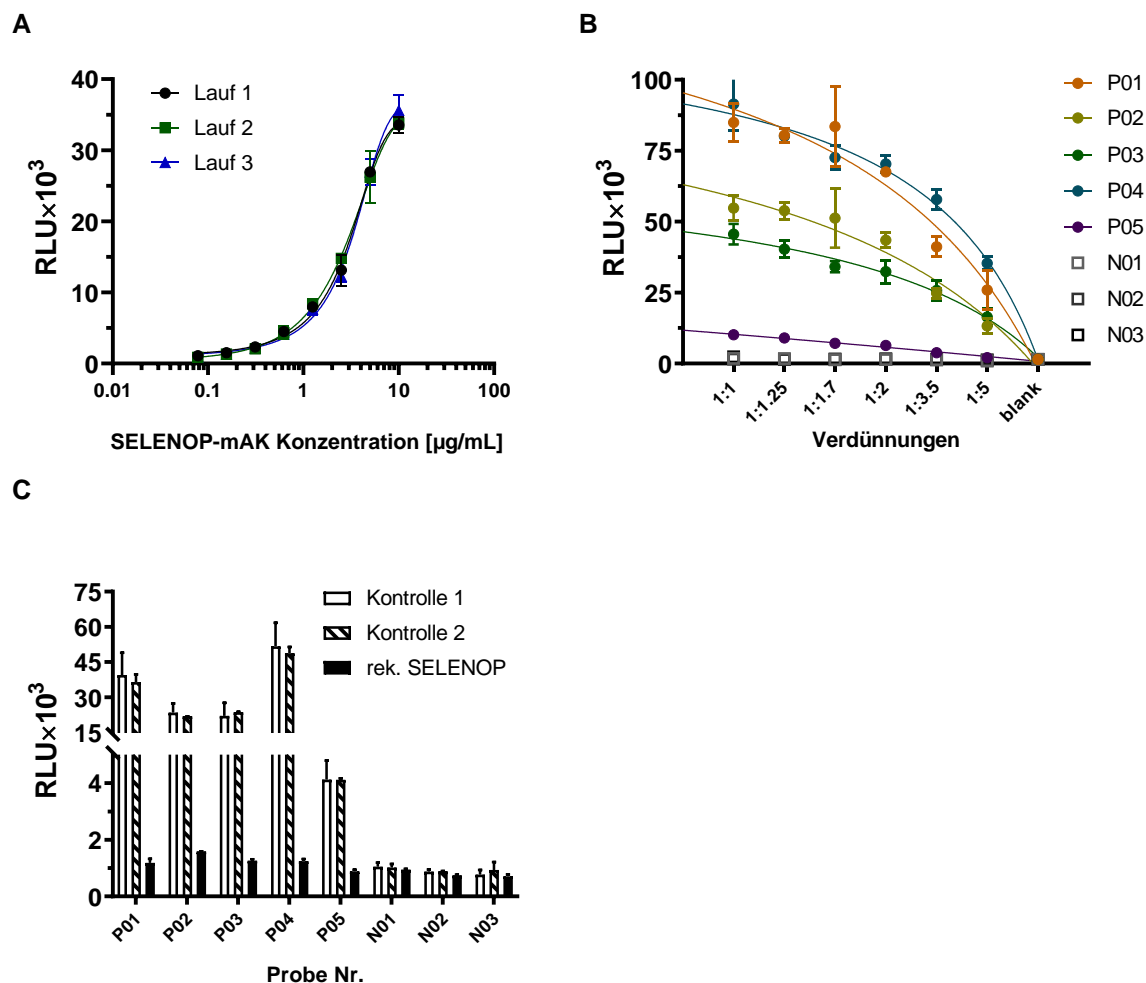


Abbildung 4 Charakterisierung des Assays für die Detektion der SELENOP-spezifischen Autoantikörper. (A) Der SELENOP-aAk-Assay wurde durch eine lineare Verdünnungsreihe eines SELENOP-spezifischen Antikörpers verifiziert. Signal Intensität (RLU, relative Lichteinheiten) korrelierte mit der Antikörperkonzentration über einen Bereich von 0,078–5,0 $\mu\text{g/ml}$, und ergab ein R^2 durch sigmoidale 4 PL-Kurvenanpassung von über 0,99. (B) Stufenweise Reduktionen der hohen Signalintensitäten (RLU) entsprechen den Verdünnungsstufen von SELENOP-aAk-positiven Proben (P01–P05), aber Signalintensitäten (RLU) von negativen Proben (N01–N03) blieben unverändert. (C) Kompetitive Hemmung der SELENOP-aAk-Signale durch rekombinantes SELENOP ohne SEAP (1 mg/mL) unter Verwendung gleicher Puffer ohne (Kontrolle 1) oder mit BSA (1 mg/mL; Kontrolle 2) als Kontrolle. (Modifiziert nach Figure 1 A-C aus Sun Q. et al., 2021)

3.3.2. Prävalenz der SELENOP-aAk in Schilddrüsenpatienten

Um die Prävalenz von aAk gegen SELENOP bei gesunden Probanden und Schilddrüsenpatienten zu bestimmen, wurden Serumproben von zwei Teilen der

Kohorten von Schilddrüsenpatienten (Schilddrüsenpatienten-Kollektiv 1 und 2, $n = 423$) zusammen mit einem Kollektiv gesunder Kontrollen (Kontroll-Kollektiv 2, $n = 400$) verglichen (**Tabelle 3**). Es zeigte sich bei der Analyse der gesamten Probenkohorte ($n = 823$) eine schiefe Verteilung von SELENOP-aAk-Signalen (**Abbildung 5A**), welche als relative Bindungsindex (BI) präsentiert werden. In dieser ersten Analyse wurden die Schwellenwerte von $BI = 5$ bzw. $BI = 10$ für die Klassifizierung von positiven gegen negativen Proben gewählt. Unabhängig von der Schwelle waren SELENOP-aAk bei Schilddrüsenpatienten deutlich häufiger als bei den Kontrollen (4,3 % gegen 0,3 % bei $BI > 5$ bzw. 2,4 % gegen 0,3 % bei $BI > 10$) (**Abbildung 5B**). Außerdem wurde die Prävalenz von SELENOP-aAk in den unterschiedlichen Subgruppen der Schilddrüsenpatienten analysiert. Unter den Patienten wurde eine erhöhte Prävalenz der SELENOP-aAk hauptsächlich bei Patienten mit HT gefunden (6,6 % bei $BI > 5$ bzw. 3,8 % bei $BI > 10$) (**Abbildung 5C**).

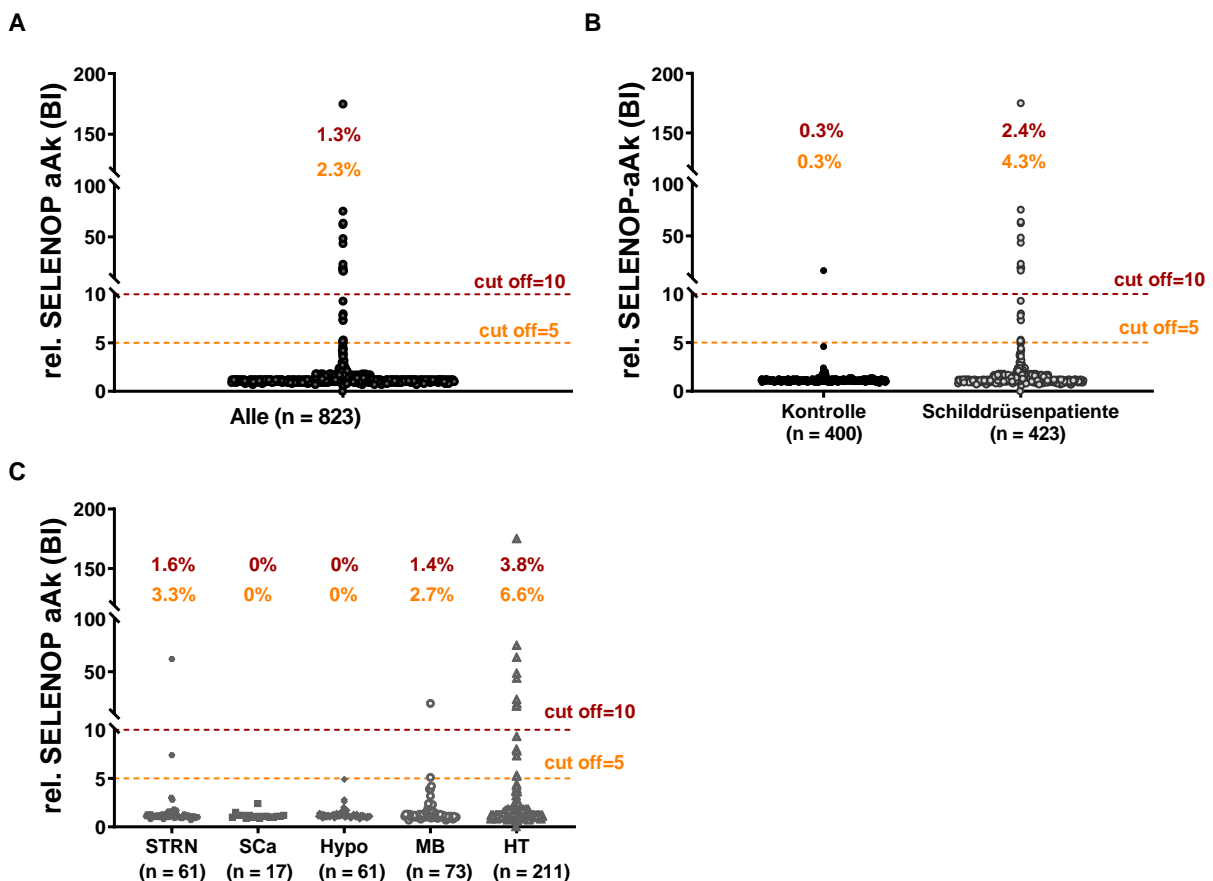


Abbildung 5 Prävalenz von SELENOP-aAk bei gesunden Probanden (Kontrolle, $n = 400$) und Schilddrüsenpatienten ($n = 423$). (A) Analyse der gesamten Probenkohorte ($n = 823$) ergab eine schiefe Verteilung von SELENOP-aAk-Signalen; die Schwellen von $BI = 5$ oder $BI = 10$ sind durch

gestrichelte Linien angegeben. (B) SELENOP-aAk-positive Proben waren bei Schilddrüsenpatienten häufiger als bei Kontrollen (BI > 5; 4,3 % vs. 0,3 % oder BI > 10; 2,4 % vs. 0,3 %). (C) Unter den Patienten waren SELENOP-aAk am häufigsten bei Hashimoto-Thyreoiditis (HT). STRN – Struma nodosa; SCa – Schilddrüsenkarzinom; Hypo – Hypothyreose (nicht-autoimmun/ iatrogen-bedingt); MB – Morbus Basedow. (Modifiziert nach Figure 1 D-F aus Sun Q. et al., 2021)

Interessanterweise wurde ein für Autoimmunerkrankungen typischer geschlechtsspezifischer Prävalenzunterschied bei SELENOP-aAk beobachtet, da alle SELENOP-aAk positiven Seren von Frauen stammten. Das entspricht eine Prävalenz von 5 % bei Frauen gegen 0 % bei Männern unter den Schilddrüsenpatienten und 0,5 % bei Frauen gegen 0 % bei Männern unter den gesunden Probanden (**Tabelle 8**). Somit haben Frauen mit einem Schilddrüsenleiden ein 10-fach höheres Risiko, und die HT-erkrankten Frauen 15-fach höheres Risiko, eine Autoimmunität gegen SELENEOP zu entwickeln, als Frauen ohne eine erste Autoimmunerkrankung.

Tabelle 8 Geschlechtsspezifische Prävalenz der SELENOP-aAk in verschiedenen Gruppen

	Kontrollen		Schilddrüsenpatienten		HT-Patienten	
	BI>5	BI>10	BI>5	BI>10	BI>5	BI>10
Frauen	0,5 %	0,5 %	5,0 %	2,8 %	7,6 %	4,3 %
Männer	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
Summe	0,3 %	0,3 %	4,3 %	2,4 %	6,6 %	3,8 %

BI: Bindungsindex; (eigene Darstellung)

3.4. Autoimmunität gegen SELENOP beeinflusst den Se-Metabolismus

3.4.1. Interaktionen der Biomarker des Se-Status bei AITD Patienten und die potenzielle Rolle von SELENOP-aAk

Als nächstes wurde der Einfluss von SELENOP-aAk auf den Se-Status bei den AITD-Patienten analysiert. Die Interaktion der drei komplementären Biomarker des Se-Status, nämlich Serum Se- und SELENOP-Konzentrationen sowie GPX3-Aktivität, wurden analysiert. Die Serum SELENOP-Konzentrationen korrelierten stark positiv mit der Se-Konzentration und der GPX3-Aktivität im Serum (**Abbildung 6A, 6C**), während das Serum-Se nur schwach mit der GPX3-Aktivität korrelierte (**Abbildung 6B**). Interessanterweise zeigte eine Probe eine relativ niedrige GPX3-Aktivität in Kombination mit außergewöhnlich hohen Se- und SELENOP-Konzentrationen (angezeigt als roter

Punkt; Se: 495 µg/L; SELENOP: 13,2 mg/L; GPX3-Aktivität: 179 U/L). Diese Beobachtung weist möglicherweise auf eine beeinträchtigte GPX3-Genexpression, eine mutierte GPX3-Variante mit reduzierter enzymatischer Aktivität, ein beschleunigter GPX3-Abbau, oder auf wenig renale GPX3-Biosynthese hin. Möglicherweise aufgrund einer beeinträchtigten renalen Se-Aufnahme. Gleichzeitig zeigte diese Probe die höchste SELENOP-aAk-Konzentration (BI = 175), in Übereinstimmung mit der Hypothese des gestörten Se-Transports zur Niere wegen der SELENOP-aAk, was zu einer Verarmung der Nierenzellen an Selen führt und damit die GPX3 Biosynthese senkt.

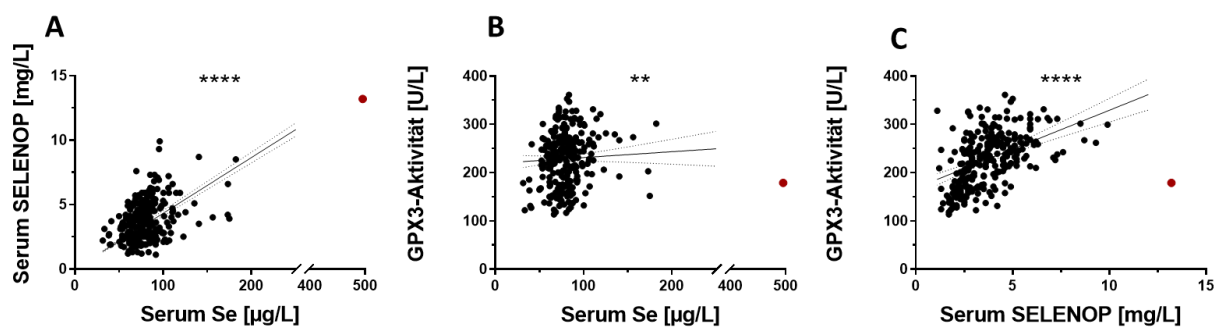


Abbildung 6 Interaktion der drei Serum Biomarker des Se-Status. Drei Biomarker des Se-Status wurden in Serumproben von AITD-Patienten ($n = 284$) bestimmt. Positive Korrelationen wurden bei (A) Serum Se mit SELENOP ($r = 0,342$, $p < 0,0001$), (B) Serum Se mit GPX3-Aktivität ($r = 0,171$, $p = 0,0046$) und (C) Serum SELENOP mit GPX3-Aktivität ($r = 0,545$, $p < 0,0001$) beobachtet. Die Probe mit dem höchsten SELENOP-aAk zeigte außergewöhnlich hohe Serum Se- und SELENOP-Spiegel in Kombination mit relativ niedriger GPX3-Aktivität (als rote Punkte angezeigt). (Modifiziert nach Figure 2 A-C aus Sun Q. et al., 2021)

Um zu testen, ob SELENOP-aAk die Se-Aufnahme in renale Zielzellen beeinflussen können, wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK293) mit einem Selenoprotein-Expressionsreporter transfiziert, der eine Luciferase in Kombination mit SECIS Element kodiert von GPX4 enthielt. Das Reportersystem zeigte eine Se-dosisabhängige Induktion der Luciferase-Aktivität bei Zugabe von anorganischem Selenit (f.c. 1, 5 oder 10 nM) oder selen-haltigen Humanserum (0,05%(v/v) oder 0,5%(v/v)) (**Abbildung 7A**). Eine signifikante Abnahme des Luciferase-Reportersignals wurde nach Zugabe eines SELENOP-spezifischen Antikörpers (0,8 ng/mL) zum Kulturmedium mit 0,5 %(v/v) Humanserum als Se-Quelle beobachtet (**Abbildung 7A**). Dieses Ergebnis stimmt wieder mit der Hypothese überein, dass SELENOP-aAk die SELENOP-Aufnahme von den Zielzellen beeinträchtigt. Um die Eigenschaften von natürlichem SELENOP-aAk weiter

zu verifizieren, wurden Immunglobuline aus positiven und negativen Serumproben durch Protein-A-vermittelte Immunpräzipitation isoliert und auf den Se- und SELENOP-Gehalt analysiert. Die Isolate aus SELENOP-aAk-positiven Proben enthielten messbare Mengen an SELENOP (**Abbildung 7B**) und Se (**Abbildung 7C**), während in den Isolaten aus SELENOP-aAk-negativen Proben kein assoziiertes Se oder SELENOP messbar war. Auch dieses Ergebnis unterstreicht, dass die identifizierten SELENOP-aAk SELENOP binden und darüber die Interaktion mit den SELENOP-Rezeptoren stören könnten.

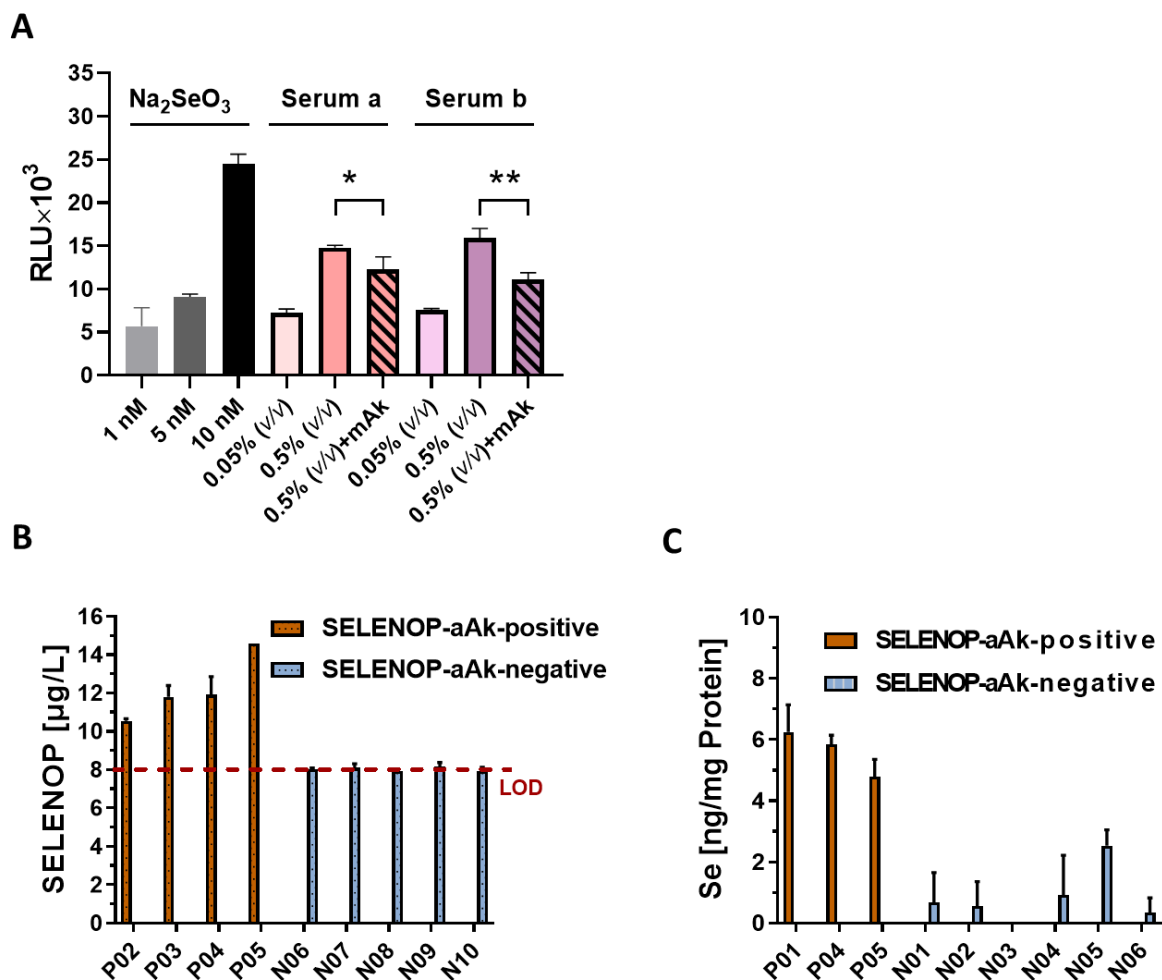


Abbildung 7 Einfluss der SELENOP-aAk auf den Se-Status. (A) Ein Se-dosisabhängiges Luciferase-Signal wurde im GPX4-SECIS-Luciferase-HEK293-Zellsystem mit zugesetztem Selenit oder Humanserum als Se-Quelle beobachtet. Das Reportersignal wurde durch Zugabe eines SELENOP-spezifischen Antikörpers ($n = 3$) signifikant unterdrückt. (B) Die Immunglobuline aus 5 SELENOP-aAk-positiven (P01–P05) und 10 SELENOP-aAk-negativen Proben (N01–N10) wurden mit Protein A isoliert. Messbare (B) SELENOP- oder (C) Se-Konzentrationen wurden nur in den Isolaten von SELENOP-aAk-positiven Proben nachgewiesen, nicht jedoch in denen von SELENOP-aAb-negativen Proben. (Modifiziert nach Figure 2 D-F aus Sun Q. et al., 2021)

3.4.2. Vergleich der drei komplementären Biomarker des Se-Status in Bezug auf die SELENOP-Autoimmunität

Bei der Klassifizierung der Patientenproben als SELENOP-aAk-positiv oder -negativ mit Schwellenwert von BI = 5,0 zeigten die positiven Proben ein höheres Gesamtserum-Se als die negativen Proben (Median: 85,3 gegen 77,0 µg/L, $p = 0,033$), während die SELENOP-Konzentration und GPX3-Aktivitäten nicht unterschiedlich zwischen positiven und negativen Proben waren (**Abbildung 8A–C**). Gleichzeitig wurde eine positive Korrelation zwischen SELENOP-aAk mit Serum-Se ($r = 0,582$, $p = 0,018$) (**Abbildung 8D**) und mit SELENOP ($r = 0,730$, $p = 0,001$) (**Abbildung 8E**), aber nicht mit der GPX3-Aktivität (**Abbildung 8F**) beobachtet. Bei Verwendung eines höheren Schwellenwerts (BI = 10) wurden in der Gruppe der SELENOP-aAk-positiven Proben nicht nur relativ höhere Serum-Se Konzentrationen (85,3 gegen 77,1 µg/L, $p = 0,018$) sondern auch signifikant höhere SELENOP Konzentrationen (5,1 gegen 3,5 mg/L, $p = 0,001$) beobachtet (**Abbildung 8A,B**). Hier waren die GPX3-Aktivitäten nicht entsprechend erhöht (**Abbildung 8C**). Zwischen den SELENOP-aAk und Serum-Se ($r = 0,695$, $p = 0,038$) (**Abbildung 8G**) oder SELENOP ($r = 0,627$, $p = 0,035$) (**Abbildung 8H**) wurde ebenfalls eine positive Korrelation beobachtet. Die statistische Signifikanz wurde nur erreicht, wenn die sehr positive Probe mit in die Analyse aufgenommen wurde, nicht aber, wenn sie aus der Analyse weggelassen wurde. Vor allem korrelierte der SELENOP-aAk bei BI >10 negativ mit der GPX3-Aktivität ($r = -0,669$, $p = 0,049$) (**Abbildung 8I**).

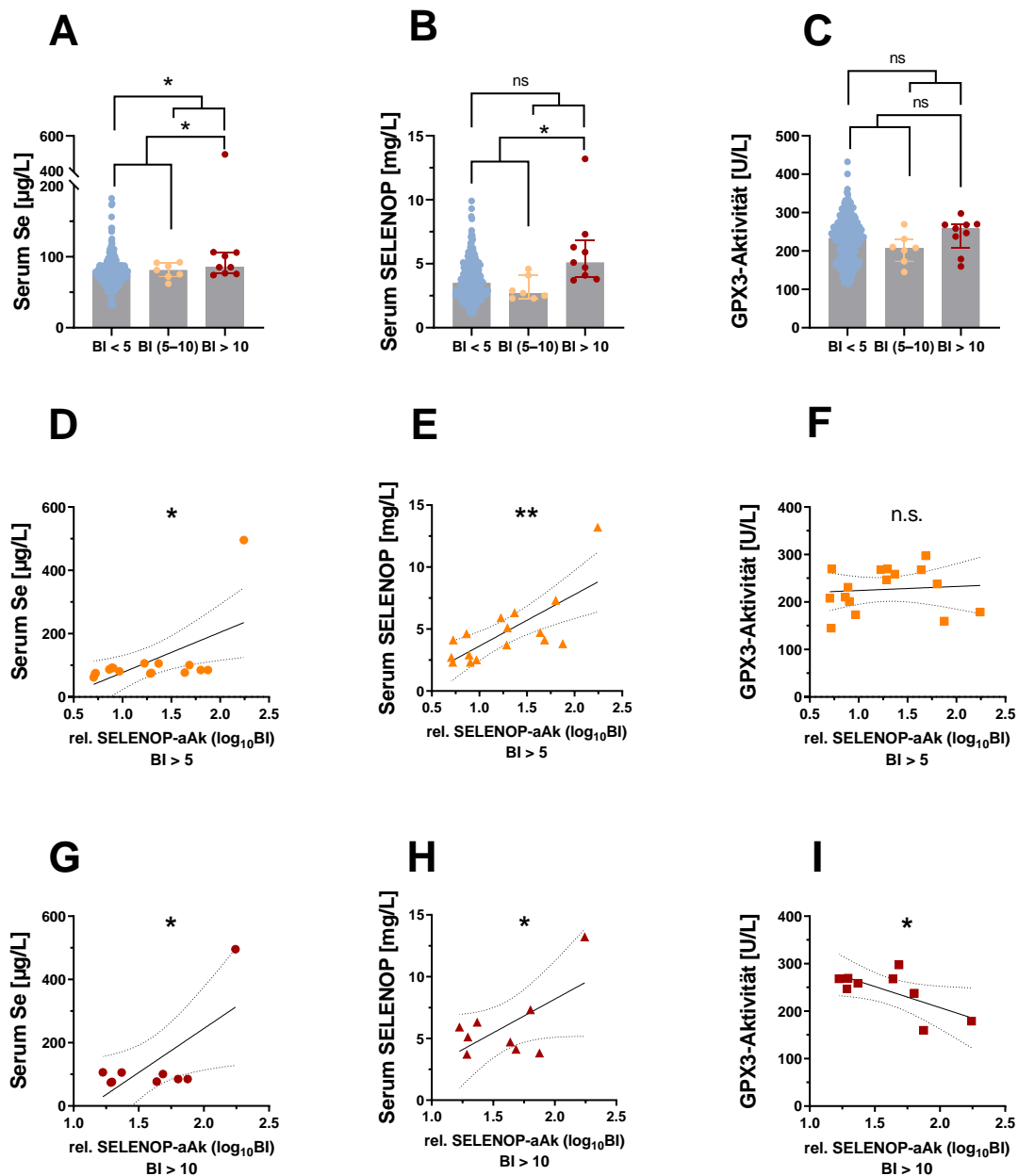


Abbildung 8 Vergleich von drei komplementären Biomarkern des Se-Status in Bezug auf die SELENOP-Autoimmunität. Die Patienten mit positivem SELENOP-aAk ($\text{BI} > 5$) zeigten relativ hohe (A) Serum-Se Konzentrationen, während (B) SELENOP Konzentrationen oder (C) GPX3-Aktivitäten im Vergleich zu SELENOP-aAk-negativen Patienten nicht unterschiedlich waren. SELENOP-aAk korrelierte positiv mit (D) Serum-Se und (E) SELENOP, aber nicht mit (F) GPX3-Aktivität. Bei Anwendung eines strengeren Grenzwerts für Positivität ($\text{BI} > 10$) zeigten Serumproben mit positivem SELENOP-aAk relativ hohes (A) Serum-Se und (B) SELENOP, während (C) GPX3-Aktivität nicht erhöht war. Zwischen SELENOP-aAk und (G) Serum-Se und (H) SELENOP wurde eine positive Korrelation beobachtet. (I) Die GPX3-Aktivität war negativ mit SELENOP-aAk korreliert. (Modifiziert nach Figure 3 aus Sun Q. et al., 2021)

4. Diskussion

4.1. Se-Status der Schilddrüsenpatienten

4.1.1. Querschnittsanalyse des Se-Status der Schilddrüsenpatienten

Schilddrüsenerkrankungen sind weit verbreitet, insbesondere bei erwachsenen Frauen. Etwa jeder dritte Erwachsene in Deutschland wird im Laufe des Lebens mindestens eine Schilddrüsenerkrankung entwickeln. Die autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen HT und GD gehören zu den häufigsten Schilddrüsenerkrankungen, was auch in unserer Querschnittsstudie reflektiert wird, und machen beide zusammen 56 % der Primärdiagnosen in unserer Kohorte aus. Ein Se-Mangel gehört zu den leicht korrigierbaren Risikofaktoren für AITD. Aus diesen Gründen haben wir eine relativ hohe Anzahl konsekutiver Schilddrüsenpatienten aus einer ambulanten Praxis in Berlin analysiert. Im Vergleich zu gesunden erwachsenen Probanden war die Serum Se-Konzentration niedriger bei Schilddrüsenpatienten, welche unter den empfohlenen Se-Werten lag, um die zirkulierenden Selenoproteine wie SELENOP und GPX3 voll zu exprimieren. Die vollständige Expression von GPX3 wird bei etwa 100 µg/L Vollblut-Se-Konzentration ⁶¹ und von SELENOP bei >90 µg/L Plasma-Se-Konzentration erreicht ⁶², was zusammen dem empfohlenen Se-Status entspricht ⁶³.

In unserer Studie war der durchschnittliche Se-Status sowohl bei den Patienten als auch bei den gesunden Probanden relativ niedrig, und etwa ein Drittel der Patienten wies weniger als 70 µg/L Se im Serum auf, somit lagen sie im Se-Mangel Bereich ⁶⁴. Zahlreiche epidemiologische Studien zeigten eine erhöhte Prävalenz von kardiovaskulären Erkrankungen, der Mortalität oder Krebsrisiken in den Bevölkerungen mit den niedrigsten Perzentilen des Se-Status ^{29, 65-69}. Ebenso gehört die Bevölkerung mit niedrigem Se-Status zu der Risikogruppe für Schilddrüsenerkrankungen und assoziiert mit erhöhter Schilddrüsengröße (Struma) ⁷⁰, multinodulärer Struma ⁷¹, Hypothyreose ⁷² sowie Hyperthyreose ⁷³. Limitierte Funktionalität der Selenoproteine scheint den Se-Mangel mit einem erhöhten Risiko von Schilddrüsenerkrankungen zu verbinden. Hierbei ist die GPX-Familie besonders für die antioxidative Abwehr in der Drüse und den Thyreozyten zuständig, die Deiodase-Familie kontrolliert die dynamische Aktivierung und Inaktivierung der Schilddrüsenhormone und die immunrelevanten Selenoproteine kontrollieren die Entzündungsreaktion und die Interaktionen zwischen den Immunzellen und Thyreozyten

Es wurde zuvor berichtet, dass Schilddrüsenhormone direkt die Biosynthese der zirkulierenden und intrazellulären Selenoproteine beeinflussen ⁷⁷, als auch unterschiedliche Se-Status bei Schilddrüsenpatienten beobachtet werden ⁷⁸⁻⁸⁰. Unsere Analyse zeigten jedoch, dass der Einfluss der verschiedenen Schilddrüsenerkrankungen auf die zirkulierenden Se- und SELENOP-Konzentrationen und die GPX3-Aktivität nicht dominant sind und regionale Se-Versorgungsunterschiede wichtigere Bestimmungsfaktor des Se-Status darstellen. Somit ist der relativ niedrige Se-Status sowohl von gesunden Probanden als auch von den Patienten zu erklären, was aber auch den schlechten Zuständen des Se-Status der europäischen Populationen reflektiert ²⁹. Hier wäre sicher eine verbesserte Selenversorgung sinnvoll.

4.1.2. Auswirkung der Se-Supplementation bei Hashimoto Thyreoiditis

In der dargestellten Interventionsstudie wurde die Auswirkung der Se-Supplementation bei neu diagnostizierter und zuvor unbehandelter Hashimoto-Thyreoiditis analysiert. Eine signifikante Erhöhung der Serum-Se- und SELENOP-Konzentration wurde wie erwartet nach der 6-monatigen Se-Supplementation bei den Patientinnen beobachtet, wobei die GPX3 Aktivität nicht signifikant erhöht war. Nach diesen Studienergebnissen war die Se-Versorgung in der polnischen Population, die untersucht wurde, sehr unterschiedlich. Sehr breite Bereiche der Serum Se- (MW± STAW: von $52,7 \pm 9,7 \mu\text{g/L}$ ⁵⁵ bis $100 \pm 13 \mu\text{g/L}$ ⁵⁶) und SELENOP-Konzentration (MW± STAW: von $2,4 \pm 0,8 \text{ mg/L}$ ⁵⁷ bis $5,08 \pm 1,14 \text{ mg/L}$ ⁵⁸) sowie der GPX3-Aktivität (von MW± STAW: $191 \pm 32 \text{ U/L}$ ⁵⁹ bis Median (IQ): $644,5 (332,8) \text{ U/L}$ ⁶⁰) wurden aus diesem Land berichtet. Unsere Daten, sowohl vor als auch am Ende der Intervention, lagen in diesen Bereichen. Vergleichbare Effekte einer Se-Supplementation auf die Erhöhung der Spiegel ausgewählter Marker des Se-Status bei HT-Patienten wurden auch in anderen Studien berichtet. Nach 3-monatiger Natriumselenit-Supplementierung mit einer Dosis von $200 \mu\text{g/Tag}$ wurde ein signifikanter Anstieg der Se-Konzentration im Plasma von Patienten mit HT von $68,7 \pm 11,9$ auf $86,1 \pm 9,5 \mu\text{g/L}$ ⁴⁷ bzw. von 75 ± 11 auf $125 \pm 71 \mu\text{g/L}$ ⁴⁹ berichtet. Ähnlich führte die Se-Supplementation mit gleicher Form und Dosis für 6 Monate zu einem signifikanten Anstieg der Serum-Se-Konzentration von $75,0 \pm 6,0$ auf $97,0 \pm 8,4 \mu\text{g/L}$ ⁴⁸ bei HT-Patienten, während eine 14-monatige Selenergänzung als Selenhefe in Kombination von $50 \mu\text{g/Tag}$ für 8 Monate und $100 \mu\text{g/Tag}$ für die nächsten 6 Monate bei euthyreoten Frauen mit HT sowohl die Serum-Se-Konzentration um 45% (von Ausgangskonzentration: $82,1 \pm 5,6 \mu\text{g/L}$) als auch die GPX3-Aktivität im Plasma von 309

± 8 U/L auf 374 ± 11 U/L) erhöhten⁸¹. Gleichzeitige signifikante Veränderungen zeigten der Serum Se-Status (Median (Min.-Max.): von 72,9 (65,3-79,4) $\mu\text{g/L}$ zu 96,5 (87,7-104,2) $\mu\text{g/L}$) und die SELENOP-Konzentration (Median (min.-max.): von 2,6 (2,1–3,1) mg/L zu 3,5 (3,1–4,0) mg/L) bei Patienten mit erhöhtem TPO-aAk Titer im euthyreoten Zustand nach 200 μg Natriumselenit pro Tag für 6 Monate⁸². Der beobachtete Anstieg der Konzentrationen von Se und SELENOP im Serum der Patienten in unserer Studie bestätigt eine erfolgreiche Supplementierung, beeinflusste jedoch nicht die gemessenen Parameter des Antioxidans-Status.

Der Einfluss einer Se-Supplementation auf den Krankheitsverlauf von HT wurde in früheren Studien hauptsächlich anhand der Spiegel der Antischilddrüsenantikörper TPO-aAk bewertet, was zu einer nicht schlüssigen Datenbasis führte⁷⁴. In dieser Studie wurde deswegen versucht, eine breitere Analyse inklusiv den Schilddrüsenfunktionsparametern und drei paralleler Biomarker für den Se-Status durchzuführen. Unsere Ergebnisse zeigten, dass eine 6-monatige Se-Supplementation in Form von 100 μg Natriumselenit pro Tag die TPO-aAk-Spiegel im Serum der Patienten mit neu diagnostizierter und zuvor un behandelter Hashimoto-Thyreoiditis mit Euthyreose oder subklinischer Hypothyreose senkte (**Tabelle 6**). Somit stimmt unser Ergebnis mit den einigen zuvor erwähnten Interventionsstudien überein^{47, 48, 83-86}, trotz einiger Unterschiede in der Methodik, wie z. B. der Dauer der Supplementierung, der Dosis und chemischen Form von Se, und dem Initialzustand oder der Behandlungshistorie der Patienten. Andererseits gab es auch Studien, in welchen kein signifikanter Unterschied bezüglich der TPO-aAk-Spiegel bei HT-Patienten nach der Se-Intervention beobachtet wurde^{49, 82, 87-89}. Bisher bleibt uns der Grund für diese widersprüchliche Studiendatenlage noch unklar.

Außer der Absenkung der TPO-aAk-Spiegel wurde in der Studie beobachtet, dass die durchschnittliche Konzentration der Schilddrüsenfunktionsmarker TSH, fT4 und T3, unabhängig von der Se-Intervention, im Normbereich lagen (**Tabelle 7**), was auch mit den meisten Interventionsstudien zu diesem Thema übereinstimmt, und ein Hinweis auf den potenziellen Schutzeffekt von Se-Supplementation bei der Begrenzung der weiteren Krankheitsprogression sein könnte.

4.2. Autoimmunität gegen den Selen-Transporter

4.2.1. Autoimmunität gegen SELENOP in Patienten und Probanden

Die Ergebnisse über die natürlich vorkommenden Autoantikörper gegen das Se-Transportprotein, SELENOP, beim gesunden Probanden zeigten, dass eine Autoimmunität gegen SELENOP bei Erwachsenen ein seltener Fall ist. Jedoch exprimierte eine beträchtliche Fraktion der Schilddrüsenpatienten SELENOP-aAk in unterschiedlichem Grad, insbesondere die Patientinnen mit HT. Die erhöhte Prävalenz der SELENOP-aAk bei HT kann entweder auf eine Prädisponierung der SELENOP-aAk für HT zurückzuführen sein, da ein niedriger Se-Status als Risikofaktor für eine autoimmune Schilddrüsenerkrankung identifiziert wurde^{74, 90, 91}, oder die Autoimmunität gegen SELENOP entwickelt sich als Folge der anhaltenden Inflammation und der assoziierten oxidativen Beschädigungen an Schilddrüsenproteinen bei dieser lymphozytären Thyreoiditis^{92, 93}. Denn gerade das entzündliche Geschehen mit den erhöhten Spiegeln reaktiver Sauerstoffspezies kann zur Generierung neuer Autoantigene führen. Somit lässt sich weder eine Prädisposition für HT durch SELENOP-aAk noch eine Folge von SELENOP-aAk im Rahmen der inflammatorischen Erkrankung bei HT ausschließen; vielmehr ist es wahrscheinlich, dass beide Prozesse zu der beobachteten erhöhten Prävalenz von SELENOP-aAk bei HT beigetragen haben⁹⁴. Außerdem wird humanes SELENOP natürlicherweise in verschiedenen Varianten synthetisiert, besonders im Se-Mangel, und das Protein weist mehrere hochreaktive Selenocysteinreste auf, die möglicherweise leicht modifiziert, oxidiert und somit eine Autoimmunreaktion auslösen könnten^{95, 96}. Die obengenannten hypothetischen Erklärungen für die erhöhte Prävalenz von SELENOP-aAk bei HT weisen auf eine diagnostische und pathophysiologische Relevanz der Autoimmunität hin, was noch in größeren Prospektivstudien getestet werden muss.

4.2.2. Autoantikörper gegen SELENOP als neue Modulatoren des Se-Status

Entgegen unserer ursprünglichen Vorstellung waren SELENOP-aAk nicht mit einem SELENOP-Mangel, sondern eher mit erhöhten Se- und SELENOP-Konzentrationen im Serum assoziiert, was auf eine stabilisierende Wirkung der Autoantikörper auf das zirkulierende SELENOP schließen lässt. Diese Beobachtung stimmt mit der beobachteten Hemmung der SELENOP-Aufnahme durch SELENOP-spezifische Antikörper in renalen HEK293-Zellen überein, und sind mit dem berichteten

Antagonismus von SELENOP-neutralisierenden Antikörpern zu der Se-Aufnahme als neue Kandidaten für die Typ-2-Diabetes-Therapie im Einklang^{97, 98}. Außerdem wurde diese Theorie neben Zellkulturversuch auch beim Menschen dadurch bestätigt, dass die relativ niedrige und nicht adäquate GPX3-Aktivität bei SELENOP-aAk-positiven Patienten trotz erhöhten Se- und SELENOP-Spiegeln im Serum und die negative Korrelation der GPX3-Aktivität mit den SELENOP-aAk-Konzentrationen trotz positiver Korrelation der Serum-Se- und SELENOP-Konzentration mit den SELENOP-aAk-Konzentrationen bei den AITD Patienten beobachtet wurden.

SELENOP versorgt die Niere mit Se über den Lipoproteinrezeptor, Megalin (LRP2), für die GPX3-Biosynthese^{23, 99}. Wenn die hypothetische antagonistische Eigenschaft der von SELENOP-aAk bei der Se-Aufnahme in die Zielzellen bestätigt würde, wäre dies von weitreichender medizinischer Relevanz. Für die Se-Versorgung ist auch das zentrale Nervensystem auf die rezeptorvermittelte SELENOP-Aufnahme angewiesen, und Se schützt die hochaktiven Interneurone vor dem durch Ferroptose induzierten Zelltod^{100, 101}. In einem Transgenmausmodell wurden schwere neurologische Symptome einschließlich epileptischer Anfälle beim Fehlen des SELENOP beobachtet^{24, 100, 102-104}. In einem Hundemodell führte Ähnliches zu einer SELENOP-abhängigen Hirnatrophie und zerebellärer Ataxie¹⁰⁵. Deswegen ist es sinnvoll in Zukunft zu untersuchen, ob SELENOP-aAk für neurologische Erkrankungen relevant sind, und ob SELENOP-aAk-positivem Schilddrüsenpatienten ein hohes Risiko für neurologische Folgesymptome, wie Epilepsie, Ataxie oder Symptome einer Hashimoto-Enzephalopathie haben.

Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, dass die Bewertung des Se-Status durch die bisher verwendeten Biomarker, die Serum-Se- und SELENOP-Konzentration zusammen mit der GPX3-Aktivität¹⁰⁶⁻¹¹⁰, beim Vorhandensein der SELENOP-aAk unzureichend ist. Insbesondere die schlechte Korrelation zwischen den Se- oder SELENOP-Konzentrationen und der GPX3-Aktivität bei einem SELENOP-aAk positiven Patienten sind irreführend und können auf das Vorhandensein von SELENOP-aAk hinweisen. Eine kombinierte Beurteilung mit den klassischen Se-Status-Biomarkern und einer SELENOP-aAk-Analyse kann besser den funktionalen Se-Status reflektieren als ein Biomarker allein, und wäre in der Lage, einen lokalen Se-Mangel von Probanden mit anscheinend ausreichender SELENOP-Expression zu identifizieren um frühzeitig diesen Mangel ausgleichen zu können.

5. Schlussfolgerungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Aspekte des Se-Status in Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen analysiert, und der Effekt einer Se-Supplementation bei Schilddrüsenpatienten untersucht. Parallel wurden die Auswirkungen einer Autoimmunität gegen das Transportprotein des Selens (SELENOP) in den Schilddrüsenerkrankungen getestet. Es wurde gezeigt, dass der Einfluss der verschiedenen Schilddrüsenerkrankungen auf den Se-Status im Vergleich zum Heimatland und der populationsweiten Selenversorgung nicht dominant ist. Analog zu anderen Studien zeigte sich ein potenzieller Schutzeffekt der Se-Supplementation auf die weitere Progression von Hashimoto Thyreoiditis. Außerdem liefert die vorliegende Arbeit deutliche Hinweise darauf, dass die Bewertung des Se-Status durch die bisher verwendeten Biomarker, die Serum-Se- und SELENOP-Konzentration zusammen mit der GPX3-Aktivität, beim Vorhandensein von Autoimmunität gegen SELENOP (SELENOP-aAk) unzureichend ist. Insbesondere bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen kann eine schlechte Korrelation zwischen den Se- oder SELENOP-Konzentrationen und der GPX3-Aktivität auf das Vorhandensein von SELENOP-aAk hinweisen. Eine Beurteilung des funktionalen Selenstatus über die klassischen Se-Status-Biomarker in Kombination mit den SELENOP-aAk als neue Modulatoren des Selentransportes reflektiert den tatsächlichen Selenmetabolismus besser als ein einzelner Parameter. Diese Erkenntnis dürfte von besonderer Relevanz bei entzündlichen Erkrankungen sein, und kann daher diagnostisch wertvolle Informationen zum potentiellen Bedarf einer Supplementation mit Selen liefern, um die autoimmunbedingte Störung des Selentransportes durch SELENOP-aAk auszugleichen.

Literaturverzeichnis

1. Schwarz, K., A hitherto unrecognized factor against dietary necrotic liver degeneration in American yeast (factor3). *Proc Soc Exp Biol Med* **1951**, 78 (3), 852-6.
2. Schwarz, K.; Foltz, C. M., Factor 3 activity of selenium compounds. *J Biol Chem* **1958**, 233 (1), 245-51.
3. Brown, K. M.; Arthur, J. R., Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr* **2001**, 4 (2B), 593-9.
4. Flohe, L., The labour pains of biochemical selenology: the history of selenoprotein biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **2009**, 1790 (11), 1389-403.
5. Johansson, L.; Gafvelin, G.; Arner, E. S., Selenocysteine in proteins-properties and biotechnological use. *Biochim Biophys Acta* **2005**, 1726 (1), 1-13.
6. Bock, A.; Forchhammer, K.; Heider, J.; Leinfelder, W.; Sawers, G.; Veprek, B.; Zinoni, F., Selenocysteine: the 21st amino acid. *Mol Microbiol* **1991**, 5 (3), 515-20.
7. Kryukov, G. V.; Castellano, S.; Novoselov, S. V.; Lobanov, A. V.; Zehtab, O.; Guigo, R.; Gladyshev, V. N., Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* **2003**, 300 (5624), 1439-43.
8. Burk, R. F.; Hill, K. E., Regulation of Selenium Metabolism and Transport. *Annu Rev Nutr* **2015**, 35, 109-34.
9. Kohrle, J.; Jakob, F.; Contempre, B.; Dumont, J. E., Selenium, the thyroid, and the endocrine system. *Endocr Rev* **2005**, 26 (7), 944-84.
10. Piehl, S.; Heberer, T.; Balizs, G.; Scanlan, T. S.; Smits, R.; Kokscha, B.; Kohrle, J., Thyronamines are isozyme-specific substrates of deiodinases. *Endocrinology* **2008**, 149 (6), 3037-45.
11. Hill, K. E.; Chittum, H. S.; Lyons, P. R.; Boeglin, M. E.; Burk, R. F., Effect of selenium on selenoprotein P expression in cultured liver cells. *Biochim Biophys Acta* **1996**, 1313 (1), 29-34.
12. Liu, H.; Yu, F.; Shao, W.; Ding, D.; Yu, Z.; Chen, F.; Geng, D.; Tan, X.; Lammi, M. J.; Guo, X., Associations Between Selenium Content in Hair and Kashin-Beck Disease/Keshan Disease in Children in Northwestern China: a Prospective Cohort Study. *Biol Trace Elem Res* **2018**, 184 (1), 16-23.
13. Oldfield, J. E., The two faces of selenium. *J Nutr* **1987**, 117 (12), 2002-8.
14. Ge, K.; Yang, G., The epidemiology of selenium deficiency in the etiological study of endemic diseases in China. *Am J Clin Nutr* **1993**, 57 (2 Suppl), 259S-263S.

15. MacFarquhar, J. K.; Broussard, D. L.; Melstrom, P.; Hutchinson, R.; Wolkin, A.; Martin, C.; Burk, R. F.; Dunn, J. R.; Green, A. L.; Hammond, R.; Schaffner, W.; Jones, T. F., Acute selenium toxicity associated with a dietary supplement. *Arch Intern Med* **2010**, *170* (3), 256-61.
16. Hill, K. E.; Lloyd, R. S.; Yang, J. G.; Read, R.; Burk, R. F., The cDNA for rat selenoprotein P contains 10 TGA codons in the open reading frame. *J Biol Chem* **1991**, *266* (16), 10050-3.
17. Saito, Y.; Hayashi, T.; Tanaka, A.; Watanabe, Y.; Suzuki, M.; Saito, E.; Takahashi, K., Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein p. *J Biol Chem* **1999**, *274* (5), 2866-71.
18. Burk, R. F.; Hill, K. E., Selenoprotein P. A selenium-rich extracellular glycoprotein. *J Nutr* **1994**, *124* (10), 1891-7.
19. Burk, R. F.; Hill, K. E., Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annu Rev Nutr* **2005**, *25*, 215-35.
20. Hollenbach, B.; Morgenthaler, N. G.; Struck, J.; Alonso, C.; Bergmann, A.; Kohrle, J.; Schomburg, L., New assay for the measurement of selenoprotein P as a sepsis biomarker from serum. *J Trace Elem Med Biol* **2008**, *22* (1), 24-32.
21. Schomburg, L.; Schweizer, U.; Holtmann, B.; Flohe, L.; Sendtner, M.; Kohrle, J., Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *Biochem J* **2003**, *370* (Pt 2), 397-402.
22. Valentine, W. M.; Abel, T. W.; Hill, K. E.; Austin, L. M.; Burk, R. F., Neurodegeneration in mice resulting from loss of functional selenoprotein P or its receptor apolipoprotein E receptor 2. *J Neuropathol Exp Neurol* **2008**, *67* (1), 68-77.
23. Olson, G. E.; Winfrey, V. P.; Hill, K. E.; Burk, R. F., Megalin mediates selenoprotein P uptake by kidney proximal tubule epithelial cells. *J Biol Chem* **2008**, *283* (11), 6854-60.
24. Burk, R. F.; Hill, K. E.; Olson, G. E.; Weeber, E. J.; Motley, A. K.; Winfrey, V. P.; Austin, L. M., Deletion of apolipoprotein E receptor-2 in mice lowers brain selenium and causes severe neurological dysfunction and death when a low-selenium diet is fed. *J Neurosci* **2007**, *27* (23), 6207-11.
25. Chittum, H. S.; Himeno, S.; Hill, K. E.; Burk, R. F., Multiple forms of selenoprotein P in rat plasma. *Arch Biochem Biophys* **1996**, *325* (1), 124-8.

26. Brenneisen, P.; Steinbrenner, H.; Sies, H., Selenium, oxidative stress, and health aspects. *Mol Aspects Med* **2005**, *26* (4-5), 256-67.
27. Renko, K.; Hofmann, P. J.; Stoedter, M.; Hollenbach, B.; Behrends, T.; Kohrle, J.; Schweizer, U.; Schomburg, L., Down-regulation of the hepatic selenoprotein biosynthesis machinery impairs selenium metabolism during the acute phase response in mice. *FASEB J* **2009**, *23* (6), 1758-65.
28. Moghaddam, A.; Heller, R. A.; Sun, Q.; Seelig, J.; Cherkezov, A.; Seibert, L.; Hackler, J.; Seemann, P.; Diegmann, J.; Pilz, M.; Bachmann, M.; Minich, W. B.; Schomburg, L., Selenium Deficiency Is Associated with Mortality Risk from COVID-19. *Nutrients* **2020**, *12* (7).
29. Hughes, D. J.; Fedirko, V.; Jenab, M.; Schomburg, L.; Meplan, C.; Freisling, H.; Bueno-de-Mesquita, H. B.; Hybsier, S.; Becker, N. P.; Czuban, M.; Tjonneland, A.; Outzen, M.; Boutron-Ruault, M. C.; Racine, A.; Bastide, N.; Kuhn, T.; Kaaks, R.; Trichopoulos, D.; Trichopoulou, A.; Lagiou, P.; Panico, S.; Peeters, P. H.; Weiderpass, E.; Skeie, G.; Dagrund, E.; Chirlaque, M. D.; Sanchez, M. J.; Ardanaz, E.; Ljuslinder, I.; Wennberg, M.; Bradbury, K. E.; Vineis, P.; Naccarati, A.; Palli, D.; Boeing, H.; Overvad, K.; Dorronsoro, M.; Jakszyn, P.; Cross, A. J.; Quiros, J. R.; Stepien, M.; Kong, S. Y.; Duarte-Salles, T.; Riboli, E.; Hesketh, J. E., Selenium status is associated with colorectal cancer risk in the European prospective investigation of cancer and nutrition cohort. *Int J Cancer* **2015**, *136* (5), 1149-61.
30. Martitz, J.; Hofmann, P. J.; Johannes, J.; Kohrle, J.; Schomburg, L.; Renko, K., Factors impacting the aminoglycoside-induced UGA stop codon readthrough in selenoprotein translation. *J Trace Elem Med Biol* **2016**, *37*, 104-110.
31. Duntas, L. H.; Benvenga, S., Selenium: an element for life. *Endocrine* **2015**, *48* (3), 756-75.
32. Goyens, P.; Golstein, J.; Nsombola, B.; Vis, H.; Dumont, J. E., Selenium deficiency as a possible factor in the pathogenesis of myxoedematous endemic cretinism. *Acta Endocrinol (Copenh)* **1987**, *114* (4), 497-502.
33. Rayman, M. P., Selenium and human health. *Lancet* **2012**, *379* (9822), 1256-68.
34. Negro, R., Selenium and thyroid autoimmunity. *Biologics* **2008**, *2* (2), 265-73.
35. Contempre, B.; Dumont, J. E.; Deneff, J. F.; Many, M. C., Effects of selenium deficiency on thyroid necrosis, fibrosis and proliferation: a possible role in myxoedematous cretinism. *Eur J Endocrinol* **1995**, *133* (1), 99-109.

36. Simmonds, M. J.; Gough, S. C., Unravelling the genetic complexity of autoimmune thyroid disease: HLA, CTLA-4 and beyond. *Clin Exp Immunol* **2004**, *136* (1), 1-10.
37. Dayan, C. M.; Daniels, G. H., Chronic autoimmune thyroiditis. *N Engl J Med* **1996**, *335* (2), 99-107.
38. Tomer, Y.; Davies, T. F., Searching for the autoimmune thyroid disease susceptibility genes: from gene mapping to gene function. *Endocr Rev* **2003**, *24* (5), 694-717.
39. Anaya, J. M.; Castiblanco, J.; Rojas-Villarraga, A.; Pineda-Tamayo, R.; Levy, R. A.; Gomez-Puerta, J.; Dias, C.; Mantilla, R. D.; Gallo, J. E.; Cervera, R.; Shoenfeld, Y.; Arcos-Burgos, M., The multiple autoimmune syndromes. A clue for the autoimmune tautology. *Clin Rev Allergy Immunol* **2012**, *43* (3), 256-64.
40. Stathatos, N.; Daniels, G. H., Autoimmune thyroid disease. *Curr Opin Rheumatol* **2012**, *24* (1), 70-5.
41. Banga, J. P.; Schott, M., Autoimmune Thyroid Diseases. *Horm Metab Res* **2018**, *50* (12), 837-839.
42. George, A.; Diana, T.; Langericht, J.; Kahaly, G. J., Stimulatory Thyrotropin Receptor Antibodies Are a Biomarker for Graves' Orbitopathy. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2020**, *11*, 629925.
43. Sinclair, D., Analytical aspects of thyroid antibodies estimation. *Autoimmunity* **2008**, *41* (1), 46-54.
44. Soy, M.; Guldiken, S.; Arikan, E.; Altun, B. U.; Tugrul, A., Frequency of rheumatic diseases in patients with autoimmune thyroid disease. *Rheumatol Int* **2007**, *27* (6), 575-7.
45. Cardenas Roldan, J.; Amaya-Amaya, J.; Castellanos-de la Hoz, J.; Giraldo-Villamil, J.; Montoya-Ortiz, G.; Cruz-Tapias, P.; Rojas-Villarraga, A.; Mantilla, R. D.; Anaya, J. M., Autoimmune thyroid disease in rheumatoid arthritis: a global perspective. *Arthritis* **2012**, *2012*, 864907.
46. Rojas-Villarraga, A.; Amaya-Amaya, J.; Rodriguez-Rodriguez, A.; Mantilla, R. D.; Anaya, J. M., Introducing polyautoimmunity: secondary autoimmune diseases no longer exist. *Autoimmune Dis* **2012**, *2012*, 254319.
47. Gartner, R.; Gasnier, B. C.; Dietrich, J. W.; Krebs, B.; Angstwurm, M. W., Selenium supplementation in patients with autoimmune thyroiditis decreases thyroid peroxidase antibodies concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* **2002**, *87* (4), 1687-91.

48. Duntas, L. H.; Mantzou, E.; Koutras, D. A., Effects of a six month treatment with selenomethionine in patients with autoimmune thyroiditis. *Eur J Endocrinol* **2003**, *148* (4), 389-93.
49. Karanikas, G.; Schuetz, M.; Kontur, S.; Duan, H.; Kommata, S.; Schoen, R.; Antoni, A.; Kletter, K.; Dudczak, R.; Willheim, M., No immunological benefit of selenium in consecutive patients with autoimmune thyroiditis. *Thyroid* **2008**, *18* (1), 7-12.
50. Flohe, L.; Gunzler, W. A., Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* **1984**, *105*, 114-21.
51. Sun, Q.; Mehl, S.; Renko, K.; Seemann, P.; Gorlich, C. L.; Hackler, J.; Minich, W. B.; Kahaly, G. J.; Schomburg, L., Natural Autoimmunity to Selenoprotein P Impairs Selenium Transport in Hashimoto's Thyroiditis. *Int J Mol Sci* **2021**, *22* (23).
52. Mehl, S.; Sun, Q.; Gorlich, C. L.; Hackler, J.; Kopp, J. F.; Renko, K.; Mittag, J.; Schwerdtle, T.; Schomburg, L., Cross-sectional analysis of trace element status in thyroid disease. *J Trace Elem Med Biol* **2020**, *58*, 126430.
53. Kryczyk-Koziol, J.; Zagrodzki, P.; Prochownik, E.; Blazewska-Gruszczyk, A.; Slowiaczek, M.; Sun, Q.; Schomburg, L.; Ochab, E.; Bartyzel, M., Positive effects of selenium supplementation in women with newly diagnosed Hashimoto's thyroiditis in an area with low selenium status. *Int J Clin Pract* **2021**, *75* (9), e14484.
54. McLeod, D. S.; Cooper, D. S., The incidence and prevalence of thyroid autoimmunity. *Endocrine* **2012**, *42* (2), 252-65.
55. Zachara, B. A.; Gromadzinska, J.; Palus, J.; Zbrog, Z.; Swiech, R.; Twardowska, E.; Wasowicz, W., The effect of selenium supplementation in the prevention of DNA damage in white blood cells of hemodialyzed patients: a pilot study. *Biol Trace Elem Res* **2011**, *142* (3), 274-83.
56. Prystupa, A.; Kicinski, P.; Luchowska-Kocot, D.; Blazewicz, A.; Niedzialek, J.; Mizerski, G.; Jojczuk, M.; Ochal, A.; Sak, J. J.; Zaluska, W., Association between Serum Selenium Concentrations and Levels of Proinflammatory and Profibrotic Cytokines-Interleukin-6 and Growth Differentiation Factor-15, in Patients with Alcoholic Liver Cirrhosis. *Int J Environ Res Public Health* **2017**, *14* (4).
57. Ambroziak, U.; Hybsier, S.; Shahnazaryan, U.; Krasnodebska-Kiljanska, M.; Rijntjes, E.; Bartoszewicz, Z.; Bednarczuk, T.; Schomburg, L., Severe selenium deficits in pregnant women irrespective of autoimmune thyroid disease in an area with marginal selenium intake. *J Trace Elem Med Biol* **2017**, *44*, 186-191.

58. Plonka-Poltorak, E.; Zagrodzki, P.; Nicol, F.; Kryczyk, J.; Barton, H.; Westermarck, T.; Kaipainen, P.; Ounjaijean, S.; Kaski, M.; Atroshi, F., Antioxidant agents and physiological responses in adult epileptic patients treated with lamotrigine. *Pharmacol Rep* **2013**, *65* (1), 99-106.
59. Jablonska, E.; Gromadzinska, J.; Peplonska, B.; Fendler, W.; Reszka, E.; Krol, M. B.; Wieczorek, E.; Bukowska, A.; Gresner, P.; Galicki, M.; Zambrano Quispe, O.; Morawiec, Z.; Wasowicz, W., Lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity relationship in breast cancer depends on functional polymorphism of GPX1. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 657.
60. Gawlik, K.; Naskalski, J. W.; Fedak, D.; Pawlica-Gosiewska, D.; Grudzien, U.; Dumnicka, P.; Malecki, M. T.; Solnica, B., Markers of Antioxidant Defense in Patients with Type 2 Diabetes. *Oxid Med Cell Longev* **2016**, *2016*, 2352361.
61. Thomson, C. D.; Rea, H. M.; Doesburg, V. M.; Robinson, M. F., Selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in whole blood of New Zealand residents. *Br J Nutr* **1977**, *37* (3), 457-60.
62. Xia, Y.; Hill, K. E.; Byrne, D. W.; Xu, J.; Burk, R. F., Effectiveness of selenium supplements in a low-selenium area of China. *Am J Clin Nutr* **2005**, *81* (4), 829-34.
63. Kipp, A. P.; Strohm, D.; Brigelius-Flohe, R.; Schomburg, L.; Bechthold, A.; Leschik-Bonnet, E.; Heseker, H.; German Nutrition, S., Revised reference values for selenium intake. *J Trace Elem Med Biol* **2015**, *32*, 195-9.
64. Thomson, C. D., Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. *Eur J Clin Nutr* **2004**, *58* (3), 391-402.
65. Bley, J.; Navas-Acien, A.; Guallar, E., Serum selenium levels and all-cause, cancer, and cardiovascular mortality among US adults. *Arch Intern Med* **2008**, *168* (4), 404-10.
66. Goyal, A.; Terry, M. B.; Siegel, A. B., Serum antioxidant nutrients, vitamin A, and mortality in U.S. Adults. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2013**, *22* (12), 2202-11.
67. Wei, W. Q.; Abnet, C. C.; Qiao, Y. L.; Dawsey, S. M.; Dong, Z. W.; Sun, X. D.; Fan, J. H.; Gunter, E. W.; Taylor, P. R.; Mark, S. D., Prospective study of serum selenium concentrations and esophageal and gastric cardia cancer, heart disease, stroke, and total death. *Am J Clin Nutr* **2004**, *79* (1), 80-5.
68. Singh, P.; Kapil, U.; Shukla, N. K.; Deo, S.; Dwivedi, S. N., Association between breast cancer and vitamin C, vitamin E and selenium levels: results of a case-control study in India. *Asian Pac J Cancer Prev* **2005**, *6* (2), 177-80.

69. Steevens, J.; van den Brandt, P. A.; Goldbohm, R. A.; Schouten, L. J., Selenium status and the risk of esophageal and gastric cancer subtypes: the Netherlands cohort study. *Gastroenterology* **2010**, *138* (5), 1704-13.
70. Derumeaux, H.; Valeix, P.; Castetbon, K.; Bensimon, M.; Boutron-Ruault, M. C.; Arnaud, J.; Hercberg, S., Association of selenium with thyroid volume and echostructure in 35- to 60-year-old French adults. *Eur J Endocrinol* **2003**, *148* (3), 309-15.
71. Rasmussen, L. B.; Schomburg, L.; Kohrle, J.; Pedersen, I. B.; Hollenbach, B.; Hog, A.; Ovesen, L.; Perrild, H.; Laurberg, P., Selenium status, thyroid volume, and multiple nodule formation in an area with mild iodine deficiency. *Eur J Endocrinol* **2011**, *164* (4), 585-90.
72. Wu, Q.; Rayman, M. P.; Lv, H.; Schomburg, L.; Cui, B.; Gao, C.; Chen, P.; Zhuang, G.; Zhang, Z.; Peng, X.; Li, H.; Zhao, Y.; He, X.; Zeng, G.; Qin, F.; Hou, P.; Shi, B., Low Population Selenium Status Is Associated With Increased Prevalence of Thyroid Disease. *J Clin Endocrinol Metab* **2015**, *100* (11), 4037-47.
73. Wang, Y.; Zhao, F.; Rijntjes, E.; Wu, L.; Wu, Q.; Sui, J.; Liu, Y.; Zhang, M.; He, M.; Chen, P.; Hu, S.; Hou, P.; Schomburg, L.; Shi, B., Role of Selenium Intake for Risk and Development of Hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* **2019**, *104* (2), 568-580.
74. Schomburg, L., Selenium, selenoproteins and the thyroid gland: interactions in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* **2011**, *8* (3), 160-71.
75. Duntas, L. H., Selenium and inflammation: underlying anti-inflammatory mechanisms. *Horm Metab Res* **2009**, *41* (6), 443-7.
76. Kohrle, J.; Gartner, R., Selenium and thyroid. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **2009**, *23* (6), 815-27.
77. Mittag, J.; Behrends, T.; Hoefig, C. S.; Vennstrom, B.; Schomburg, L., Thyroid hormones regulate selenoprotein expression and selenium status in mice. *PLoS One* **2010**, *5* (9), e12931.
78. Bulow Pedersen, I.; Knudsen, N.; Carle, A.; Schomburg, L.; Kohrle, J.; Jorgensen, T.; Rasmussen, L. B.; Ovesen, L.; Laurberg, P., Serum selenium is low in newly diagnosed Graves' disease: a population-based study. *Clin Endocrinol (Oxf)* **2013**, *79* (4), 584-90.
79. Wertenbruch, T.; Willenberg, H. S.; Sagert, C.; Nguyen, T. B.; Bahlo, M.; Feldkamp, J.; Groeger, C.; Hermsen, D.; Scherbaum, W. A.; Schott, M., Serum selenium

- levels in patients with remission and relapse of graves' disease. *Med Chem* **2007**, 3 (3), 281-4.
80. Khong, J. J.; Goldstein, R. F.; Sanders, K. M.; Schneider, H.; Pope, J.; Burdon, K. P.; Craig, J. E.; Ebeling, P. R., Serum selenium status in Graves' disease with and without orbitopathy: a case-control study. *Clin Endocrinol (Oxf)* **2014**, 80 (6), 905-10.
81. Zagrodzki, P.; Ratajczak, R., Selenium supplementation in autoimmune thyroiditis female patient--effects on thyroid and ovarian functions (case study). *Biol Trace Elem Res* **2008**, 126 (1-3), 76-82.
82. Eskes, S. A.; Endert, E.; Fliers, E.; Birnie, E.; Hollenbach, B.; Schomburg, L.; Kohrle, J.; Wiersinga, W. M., Selenite supplementation in euthyroid subjects with thyroid peroxidase antibodies. *Clin Endocrinol (Oxf)* **2014**, 80 (3), 444-51.
83. Turker, O.; Kumanlioglu, K.; Karapolat, I.; Dogan, I., Selenium treatment in autoimmune thyroiditis: 9-month follow-up with variable doses. *J Endocrinol* **2006**, 190 (1), 151-6.
84. Mazokopakis, E. E.; Papadakis, J. A.; Papadomanolaki, M. G.; Batistakis, A. G.; Giannakopoulos, T. G.; Protopapadakis, E. E.; Ganotakis, E. S., Effects of 12 months treatment with L-selenomethionine on serum anti-TPO Levels in Patients with Hashimoto's thyroiditis. *Thyroid* **2007**, 17 (7), 609-12.
85. Nacamulli, D.; Mian, C.; Petricca, D.; Lazzarotto, F.; Barollo, S.; Pozza, D.; Masiero, S.; Faggian, D.; Plebani, M.; Girelli, M. E.; Mantero, F.; Betterle, C., Influence of physiological dietary selenium supplementation on the natural course of autoimmune thyroiditis. *Clin Endocrinol (Oxf)* **2010**, 73 (4), 535-9.
86. Krysiak, R.; Okopien, B., The effect of levothyroxine and selenomethionine on lymphocyte and monocyte cytokine release in women with Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* **2011**, 96 (7), 2206-15.
87. Anastasilakis, A. D.; Toulis, K. A.; Nisianakis, P.; Goulis, D. G.; Kampas, L.; Valeri, R. M.; Oikonomou, D.; Tzellos, T. G.; Delaroudis, S., Selenomethionine treatment in patients with autoimmune thyroiditis: a prospective, quasi-randomised trial. *Int J Clin Pract* **2012**, 66 (4), 378-83.
88. Pilli, T.; Cantara, S.; Schomburg, L.; Cenci, V.; Cardinale, S.; Heid, E. C.; Kuhn, E. C.; Cevenini, G.; Sestini, F.; Fioravanti, C.; D'Hauw, G.; Pacini, F., IFN γ -Inducible Chemokines Decrease upon Selenomethionine Supplementation in Women with Euthyroid Autoimmune Thyroiditis: Comparison between Two Doses of Selenomethionine (80 or 160 μ g) versus Placebo. *Eur Thyroid J* **2015**, 4 (4), 226-33.

89. Esposito, D.; Rotondi, M.; Accardo, G.; Vallone, G.; Conzo, G.; Docimo, G.; Selvaggi, F.; Cappelli, C.; Chiovato, L.; Giugliano, D.; Pasquali, D., Influence of short-term selenium supplementation on the natural course of Hashimoto's thyroiditis: clinical results of a blinded placebo-controlled randomized prospective trial. *J Endocrinol Invest* **2017**, *40* (1), 83-89.
90. Duntas, L. H., The role of selenium in thyroid autoimmunity and cancer. *Thyroid* **2006**, *16* (5), 455-60.
91. Winther, K. H.; Rayman, M. P.; Bonnema, S. J.; Hegedus, L., Selenium in thyroid disorders - essential knowledge for clinicians. *Nat Rev Endocrinol* **2020**, *16* (3), 165-176.
92. Ralli, M.; Angeletti, D.; Fiore, M.; D'Aguanno, V.; Lambiase, A.; Artico, M.; de Vincentiis, M.; Greco, A., Hashimoto's thyroiditis: An update on pathogenic mechanisms, diagnostic protocols, therapeutic strategies, and potential malignant transformation. *Autoimmun Rev* **2020**, *19* (10), 102649.
93. Burek, C. L.; Rose, N. R., Autoimmune thyroiditis and ROS. *Autoimmun Rev* **2008**, *7* (7), 530-7.
94. Schomburg, L., Selenium Deficiency Due to Diet, Pregnancy, Severe Illness, or COVID-19-A Preventable Trigger for Autoimmune Disease. *Int J Mol Sci* **2021**, *22* (16).
95. Arner, E. S., Selenoproteins-What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? *Exp Cell Res* **2010**, *316* (8), 1296-303.
96. Ste Marie, E. J.; Wehrle, R. J.; Haupt, D. J.; Wood, N. B.; van der Vliet, A.; Previs, M. J.; Masterson, D. S.; Hondal, R. J., Can Selenoenzymes Resist Electrophilic Modification? Evidence from Thioredoxin Reductase and a Mutant Containing alpha-Methylselenocysteine. *Biochemistry* **2020**, *59* (36), 3300-3315.
97. Mita, Y.; Nakayama, K.; Inari, S.; Nishito, Y.; Yoshioka, Y.; Sakai, N.; Sotani, K.; Nagamura, T.; Kuzuhara, Y.; Inagaki, K.; Iwasaki, M.; Misu, H.; Ikegawa, M.; Takamura, T.; Noguchi, N.; Saito, Y., Selenoprotein P-neutralizing antibodies improve insulin secretion and glucose sensitivity in type 2 diabetes mouse models. *Nat Commun* **2017**, *8* (1), 1658.
98. Takamura, T., Hepatokine Selenoprotein P-Mediated Reductive Stress Causes Resistance to Intracellular Signal Transduction. *Antioxid Redox Signal* **2020**, *33* (7), 517-524.
99. Renko, K.; Werner, M.; Renner-Muller, I.; Cooper, T. G.; Yeung, C. H.; Hollenbach, B.; Scharpf, M.; Kohrle, J.; Schomburg, L.; Schweizer, U., Hepatic

- selenoprotein P (SePP) expression restores selenium transport and prevents infertility and motor-incoordination in Sepp-knockout mice. *Biochem J* **2008**, *409* (3), 741-9.
100. Wirth, E. K.; Conrad, M.; Winterer, J.; Wozny, C.; Carlson, B. A.; Roth, S.; Schmitz, D.; Bornkamm, G. W.; Coppola, V.; Tessarollo, L.; Schomburg, L.; Kohrle, J.; Hatfield, D. L.; Schweizer, U., Neuronal selenoprotein expression is required for interneuron development and prevents seizures and neurodegeneration. *FASEB J* **2010**, *24* (3), 844-52.
101. Ingold, I.; Berndt, C.; Schmitt, S.; Doll, S.; Poschmann, G.; Buday, K.; Roveri, A.; Peng, X.; Porto Freitas, F.; Seibt, T.; Mehr, L.; Aichler, M.; Walch, A.; Lamp, D.; Jastroch, M.; Miyamoto, S.; Wurst, W.; Ursini, F.; Arner, E. S. J.; Fradejas-Villar, N.; Schweizer, U.; Zischka, H.; Friedmann Angeli, J. P.; Conrad, M., Selenium Utilization by GPX4 Is Required to Prevent Hydroperoxide-Induced Ferroptosis. *Cell* **2018**, *172* (3), 409-422 e21.
102. Seeher, S.; Carlson, B. A.; Miniard, A. C.; Wirth, E. K.; Mahdi, Y.; Hatfield, D. L.; Driscoll, D. M.; Schweizer, U., Impaired selenoprotein expression in brain triggers striatal neuronal loss leading to co-ordination defects in mice. *Biochem J* **2014**, *462* (1), 67-75.
103. Byrns, C. N.; Pitts, M. W.; Gilman, C. A.; Hashimoto, A. C.; Berry, M. J., Mice lacking selenoprotein P and selenocysteine lyase exhibit severe neurological dysfunction, neurodegeneration, and audiogenic seizures. *J Biol Chem* **2014**, *289* (14), 9662-74.
104. Burk, R. F.; Hill, K. E.; Motley, A. K.; Winfrey, V. P.; Kurokawa, S.; Mitchell, S. L.; Zhang, W., Selenoprotein P and apolipoprotein E receptor-2 interact at the blood-brain barrier and also within the brain to maintain an essential selenium pool that protects against neurodegeneration. *FASEB J* **2014**, *28* (8), 3579-88.
105. Christen, M.; Hogler, S.; Kleiter, M.; Leschnik, M.; Weber, C.; Thaller, D.; Jagannathan, V.; Leeb, T., Deletion of the SELENOP gene leads to CNS atrophy with cerebellar ataxia in dogs. *PLoS Genet* **2021**, *17* (8), e1009716.
106. Hurst, R.; Collings, R.; Harvey, L. J.; King, M.; Hooper, L.; Bouwman, J.; Gurinovic, M.; Fairweather-Tait, S. J., EURRECA-Estimating selenium requirements for deriving dietary reference values. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2013**, *53* (10), 1077-96.
107. Ashton, K.; Hooper, L.; Harvey, L. J.; Hurst, R.; Casgrain, A.; Fairweather-Tait, S. J., Methods of assessment of selenium status in humans: a systematic review. *Am J Clin Nutr* **2009**, *89* (6), 2025S-2039S.
108. Combs, G. F., Jr., Biomarkers of selenium status. *Nutrients* **2015**, *7* (4), 2209-36.

109. Brodin, O.; Hackler, J.; Misra, S.; Wendt, S.; Sun, Q.; Laaf, E.; Stoppe, C.; Bjornstedt, M.; Schomburg, L., Selenoprotein P as Biomarker of Selenium Status in Clinical Trials with Therapeutic Dosages of Selenite. *Nutrients* **2020**, *12* (4).
110. Demircan, K.; Bengtsson, Y.; Sun, Q.; Brange, A.; Vallon-Christersson, J.; Rijntjes, E.; Malmberg, M.; Saal, L. H.; Ryden, L.; Borg, A.; Manjer, J.; Schomburg, L., Serum selenium, selenoprotein P and glutathione peroxidase 3 as predictors of mortality and recurrence following breast cancer diagnosis: A multicentre cohort study. *Redox Biol* **2021**, *47*, 102145.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Qian Sun, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Autoantikörper gegen Selenoprotein P als neue Modulator von Autoimmunschilddrüsenerkrankung / Autoantibody to Selenoprotein P as new modulator of Autoimmune Thyroid Diseases 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/innen 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.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

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

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Qian Sun hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: [Sun Q, Mehl S, Renko K, Seemann P, Görlich CL, Hackler J, Minich WB, Kahaly GJ, Schomburg L], [Natural Autoimmunity to Selenoprotein P Impairs Selenium Transport in Hashimoto's Thyroiditis], [Int J Mol Sci.], [2021]

Beitrag im Einzelnen:

- Entwicklung der Arbeitshypothese in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Schomburg
- Laborchemische Analysen der Serumproben und Auswertungen (Inklusiv: Quantifikation von Se, SELENOP, GPX3 Aktivität und SELENOP-aAk in den Serumproben; Exklusiv: Versuch mit GPX4-SECSIS exprimierenden HEK293-Zellen (Figure 2D), was zusammen mit Julian Hackler erfolgte)
- Statistische Auswertung den gemessenen laborchemischen Parameter und klinischen Parametern von den Patienten
- Literaturrecherche für verfassen der Publikation
- Alle Abbildungen und Tabellen wurden von mir erstellt
- Selbständige Verfassung großer Teile der Publikationsschrift (Exklusiv: Introduction und Discussion mit Prof. Dr. Schomburg zusammen erfolgte)
- Begleitung des gesamten Publikations-Prozesses und Einarbeitung der vorgeschlagenen Kritikpunkte und Korrekturen während der Revision

Publikation 2: [Mehl S, Sun Q, Görlich CL, Hackler J, Kopp JF, Renko K, Mittag J, Schwerdtle T, Schomburg L], [Cross-sectional analysis of trace element status in thyroid disease], [J Trace Elem Med Biol.], [2020]

Beitrag im Einzelnen:

- Laborchemische Analysen und Auswertungen den Biomarker den Spurenelementen in den Serumproben (Inklusiv: Se, Zn, Cu, SELENOP und GPX3 Aktivität; Exklusiv: TSH, fT3, fT4 und Jod).
- Statistische Auswertung den laborchemischen Parameter und klinischen Parametern von den Patienten
- Alle Abbildungen und Tabellen wurden von mir erstellt.

Publikation 3: [Kryczyk-Koziół J, Zagrodzki P, Prochownik E, Błażewska-Gruszczuk A, Słowiaczek M, Sun Q, Schomburg L, Ochab E, Bartyzel M.], [Positive effects of selenium supplementation in women with newly diagnosed Hashimoto's thyroiditis in an area with low selenium status], [Int J Clin Pract], [2021]

Beitrag im Einzelnen:

- Laborchemische Analysen der Serum Selen Konzentration
- Bestimmung der GPX3 Enzymaktivitäten
- Diskussion der Messdaten bezüglich der Biomarker des Se-Status.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Auszug aus der Journal Summary List (Publikation 1)

Sun Q, Mehl S, Renko K, Seemann P, Görlich CL, Hackler J, Minich WB, Kahaly GJ, Schomburg L.

Natural Autoimmunity to Selenoprotein P Impairs Selenium Transport in Hashimoto's Thyroiditis.

Int J Mol Sci. 2021 Dec 3;22(23):13088. doi: 10.3390/ijms222313088.

Journal Impact Factor: 5.924 (2020)

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2020** Selected Editions: SCIE, SSCI
 Selected Categories: **"BIOCHEMISTRY and MOLECULAR BIOLOGY"** Selected
 Category Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 297 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE MEDICINE	114,401	53.440	0.184050
2	CELL	320,407	41.582	0.526960
3	Molecular Cancer	24,931	27.401	0.030030
4	Annual Review of Biochemistry	24,394	23.643	0.021450
5	Signal Transduction and Targeted Therapy	3,848	18.187	0.005730
6	MOLECULAR CELL	86,299	17.970	0.161840
7	TRENDS IN MICROBIOLOGY	17,553	17.079	0.022820
8	NUCLEIC ACIDS RESEARCH	248,139	16.971	0.387070
9	MOLECULAR BIOLOGY AND EVOLUTION	61,557	16.240	0.082270
10	PROGRESS IN LIPID RESEARCH	7,328	16.195	0.004530
11	MOLECULAR PSYCHIATRY	28,622	15.992	0.046220
12	CELL DEATH AND DIFFERENTIATION	27,701	15.828	0.028730
13	NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY	32,038	15.369	0.051210
14	Nature Chemical Biology	27,428	15.040	0.047880
15	MOLECULAR ASPECTS OF MEDICINE	8,136	14.235	0.006640
16	TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES	22,003	13.807	0.025760
17	NATURAL PRODUCT REPORTS	13,293	13.423	0.011160
18	Molecular Plant	15,778	13.164	0.026860
19	Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry	752	12.200	0.000200
20	TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE	13,213	11.951	0.014720

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
21	Redox Biology	15,982	11.799	0.024930
22	EMBO JOURNAL	76,189	11.598	0.055000
23	MATRIX BIOLOGY	8,972	11.583	0.011010
24	Molecular Systems Biology	10,149	11.429	0.016300
25	PLANT CELL	64,794	11.277	0.036260
26	CURRENT BIOLOGY	78,289	10.834	0.116100
27	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA- REVIEWS ON CANCER	7,025	10.680	0.007000
28	Cell Systems	5,813	10.304	0.035330
29	ONCOGENE	77,576	9.867	0.059180
30	CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES	34,003	9.261	0.033790
31	GENOME RESEARCH	47,141	9.043	0.064690
32	CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY	12,240	8.822	0.014190
33	EMBO REPORTS	19,502	8.807	0.027490
34	EXPERIMENTAL AND MOLECULAR MEDICINE	8,780	8.718	0.013260
35	ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING	26,971	8.401	0.016700
36	CRITICAL REVIEWS IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY	4,576	8.250	0.005370
37	Science Signaling	15,954	8.192	0.023910
38	Cell Chemical Biology	5,236	8.116	0.018050
39	PLOS BIOLOGY	39,598	8.029	0.059920
40	Essays in Biochemistry	3,629	8.000	0.006450
41	BIOINORGANIC CHEMISTRY AND APPLICATIONS	1,406	7.778	0.000890

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
42	Acta Crystallographica Section D-Structural Biology	23,670	7.652	0.020190
43	CYTOKINE & GROWTH FACTOR REVIEWS	7,650	7.638	0.005850
44	FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE	52,714	7.376	0.034180
45	Computational and Structural Biotechnology Journal	3,620	7.271	0.006770
46	AMYLOID-JOURNAL OF PROTEIN FOLDING DISORDERS	2,202	7.141	0.003280
47	Cell and Bioscience	3,184	7.133	0.004320
48	Genes & Diseases	1,850	7.103	0.003170
49	Molecular Ecology Resources	13,390	7.090	0.016690
50	Journal of Integrative Plant Biology	6,749	7.061	0.006430
51	BIOMACROMOLECULES	45,724	6.988	0.026020
52	INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES	79,246	6.953	0.073720
53	AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY	15,280	6.914	0.015050
54	International Review of Cell and Molecular Biology	3,057	6.813	0.004320
55	CURRENT OPINION IN STRUCTURAL BIOLOGY	12,448	6.809	0.018970
56	PROTEIN SCIENCE	16,581	6.725	0.021220
57	International Journal of Biological Sciences	10,778	6.580	0.010540
58	Open Biology	4,059	6.411	0.010280
59	MOLECULAR MEDICINE	6,239	6.354	0.004460
60	Antioxidants	9,076	6.312	0.009480
61	JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B-BIOLOGY	17,015	6.252	0.012740

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
62	MOLECULAR ECOLOGY	44,625	6.185	0.040470
63	HUMAN MOLECULAR GENETICS	47,192	6.150	0.047520
64	BIOFACTORS	5,004	6.113	0.002810
65	Biomedicines	2,391	6.081	0.003650
66	JOURNAL OF NUTRITIONAL BIOCHEMISTRY	14,446	6.048	0.010580
67	INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES	139,463	5.923	0.195430
68	JOURNAL OF LIPID RESEARCH	28,376	5.922	0.019290
69	CELLULAR & MOLECULAR BIOLOGY LETTERS	2,216	5.787	0.002190
70	EXPERT REVIEWS IN MOLECULAR MEDICINE	2,042	5.600	0.000790
71	Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology	865	5.545	0.000390
72	FEBS Journal	23,493	5.542	0.022540
73	Nucleic Acid Therapeutics	1,392	5.486	0.003070
74	JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY	65,163	5.469	0.038400
75	BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS	14,862	5.407	0.014350
76	Food & Function	19,700	5.396	0.021550
77	BIOELECTROCHEMISTRY	6,107	5.373	0.004870
78	JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY	40,281	5.372	0.019170
79	BIOORGANIC CHEMISTRY	10,576	5.275	0.010220
80	GENE THERAPY	8,112	5.250	0.004130
81	Frontiers in Molecular Biosciences	3,140	5.246	0.007660
82	CHROMOSOME RESEARCH	2,752	5.239	0.002250
83	CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS	16,208	5.192	0.011950

Druckexemplar der Publikation 1

Sun Q, Mehl S, Renko K, Seemann P, Görlich CL, Hackler J, Minich WB, Kahaly GJ, Schomburg L.

Natural Autoimmunity to Selenoprotein P Impairs Selenium Transport in Hashimoto's Thyroiditis.

Int J Mol Sci. 2021 Dec 3;22(23):13088. doi: 10.3390/ijms222313088.

Journal Impact Factor: 5.924 (2020)



Article

Natural Autoimmunity to Selenoprotein P Impairs Selenium Transport in Hashimoto's Thyroiditis

Qian Sun ^{1,2} , Sebastian Mehl ^{1,2}, Kostja Renko ^{1,2,3} , Petra Seemann ^{1,2,4} , Christian L. Görlich ^{1,2}, Julian Hackler ^{1,2}, Waldemar B. Minich ^{1,2}, George J. Kahaly ^{5,*} and Lutz Schomburg ^{1,2,*}

¹ Institute for Experimental Endocrinology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, 13353 Berlin, Germany; qian.sun@charite.de (Q.S.); sebastian.mehl@mac.com (S.M.); Kostja.Renko@bfr.bund.de (K.R.); seemann@selenomed.com (P.S.); christian.goerlich@charite.de (C.L.G.); Julian.hackler@charite.de (J.H.); Waldemar.minich@charite.de (W.B.M.)

² Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin Institute of Health, 13353 Berlin, Germany

³ German Federal Institute for Risk Assessment, Department Experimental Toxicology and ZEBET, 12277 Berlin, Germany

⁴ selenOmed GmbH, 10965 Berlin, Germany

⁵ Johannes Gutenberg University Medical Center, Department of Medicine I, 55101 Mainz, Germany

* Correspondence: george.kahaly@unimedizin-mainz.de (G.J.K.); lutz.schomburg@charite.de (L.S.)



Citation: Sun, Q.; Mehl, S.; Renko, K.; Seemann, P.; Görlich, C.L.; Hackler, J.; Minich, W.B.; Kahaly, G.J.; Schomburg, L. Natural Autoimmunity to Selenoprotein P Impairs Selenium Transport in Hashimoto's Thyroiditis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13088. <https://doi.org/10.3390/ijms222313088>

Academic Editor: Alberto Spisni

Received: 27 October 2021

Accepted: 30 November 2021

Published: 3 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The essential trace element selenium (Se) is needed for the biosynthesis of selenocysteine-containing selenoproteins, including the secreted enzyme glutathione peroxidase 3 (GPX3) and the Se-transporter selenoprotein P (SELENOP). Both are found in blood and thyroid colloid, where they serve protective functions. Serum SELENOP derives mainly from hepatocytes, whereas the kidney contributes most serum GPX3. Studies using transgenic mice indicated that renal GPX3 biosynthesis depends on Se supply by hepatic SELENOP, which is produced in protein variants with varying Se contents. Low Se status is an established risk factor for autoimmune thyroid disease, and thyroid autoimmunity generates novel autoantigens. We hypothesized that natural autoantibodies to SELENOP are prevalent in thyroid patients, impair Se transport, and negatively affect GPX3 biosynthesis. Using a newly established quantitative immunoassay, SELENOP autoantibodies were particularly prevalent in Hashimoto's thyroiditis as compared with healthy control subjects (6.6% versus 0.3%). Serum samples rich in SELENOP autoantibodies displayed relatively high total Se and SELENOP concentrations in comparison with autoantibody-negative samples ([Se]; 85.3 vs. 77.1 µg/L, $p = 0.0178$, and [SELENOP]; 5.1 vs. 3.5 mg/L, $p = 0.001$), while GPX3 activity was low and correlated inversely to SELENOP autoantibody concentrations. In renal cells in culture, antibodies to SELENOP inhibited Se uptake. Our results indicate an impairment of SELENOP-dependent Se transport by natural SELENOP autoantibodies, suggesting that the characterization of health risk from Se deficiency may need to include autoimmunity to SELENOP as additional biomarker of Se status.

Keywords: antioxidative defense; autoantibody; glutathione peroxidase; Hashimoto's thyroiditis; trace element

1. Introduction

Autoimmune thyroid disease (AITD) is characterized by an inappropriate interaction of immune cells with thyroid proteins. An activated immune system, inflammation, and lymphocytic infiltration into the thyroid gland, accompanied with autoantibodies (aAb) to thyroid antigens, are hallmarks of AITD [1]. Natural aAb levels are commonly determined in AITD as diagnostic markers, which support the diagnosis, correlate to disease severity, and enable the monitoring of treatment success. In Graves' disease, natural aAb to the TSH-receptor (TSHR-aAb) are causative for the clinical phenotype, as they bind as endocrine active agonists to the TSH-receptor and stimulate hyperthyroidism and

thyroid eye disease [2]. In comparison, natural aAb to another thyroid autoantigen, namely the thyroperoxidase (TPO-aAb), are detectable in both Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis, where they are associated with cell-mediated cytotoxicity [3]. The TPO-aAb are not directly causing the disease but rather reflect disease activity and disease risk in asymptomatic healthy subjects [4]. Accordingly, TPO-aAb-positive healthy women who become pregnant are, for example, at relatively high risk for the development of postpartum thyroiditis, potentially due to the declining selenium (Se) status during pregnancy [5,6]. The presence of natural aAb in a healthy person without obvious clinical symptoms is neither necessarily an indication of disease nor of immediate diagnostic value but may indicate an increased risk of disease.

In general, the pathogenesis of AITD is a multifaceted process, where the essential production of hydrogen peroxide needed for thyroid hormone biosynthesis may contribute to tissue inflammation, gland destruction, and the generation of novel autoantigens [7,8]. Accordingly, anti-inflammatory and antioxidative measures are considered in prevention and treatment of AITD [9,10]. Observational studies have indicated an inverse relationship between the intake of the essential trace element Se with thyroid volume [11], the development of thyroid nodules [12] and thyroid disease [13]. Dietary uptake of Se is needed for the formation of the 21st proteinogenic amino acid selenocysteine [14], and supports the biosynthesis of health-relevant, redox-active selenoproteins, including the secreted plasma proteins extracellular glutathione peroxidase (GPX3) and selenoprotein P (SELENOP) [15–17]. These two selenoproteins are found both in the circulation and in thyroid follicles [18]. While GPX3 is capable of peroxide degradation, SELENOP serves mainly as transporter for the systemic distribution of Se [19,20]. Importantly, renal GPX3 biosynthesis is supported by SELENOP from hepatocytes [21,22].

SELENOP is a most exceptional protein that varies naturally in its primary sequence [23,24]. Translational errors occur during decoding of the ten UGA triplets within the open reading frame [25], and cysteine can replace selenocysteine during biosynthesis [26]. Under antibiotic treatment, Se-free selenoproteins can be synthesized [27]; additionally, tryptophan or arginine may become inserted at UGA codons [28]. Consequently, the average content of Se per SELENOP molecule has been determined at 5.4 ± 0.5 Se/SELENOP in human [29], 7.5 Se/Selenop in rat, and 5 Se/Selenop in mouse [30]. Due to this flexibility in the decoding of UGA, the primary sequence of newly synthesized SELENOP varies. Circulating SELENOP may thus constitute a mixture of slightly different protein variants. For this reason, we hypothesized that autoantibodies to SELENOP (SELENOP-aAb) may develop naturally, particularly in patients with AITD and thyroid inflammation. In order to test this hypothesis, we analyzed control subjects and patients with different thyroid diseases for SELENOP-aAb and correlated the results to biomarkers of Se status.

2. Results

An immunoluminometric assay for the detection and quantification of SELENOP-aAb was established by generating a fusion protein encoding-secreted alkaline phosphatase (SEAP) in frame with full length human SELENOP, where UGA codons had been replaced by cysteine codons. Assay functionality was verified with a SELENOP-specific antibody and showed the expected concentration-dependent signal intensity with dilution (Figure 1A). This result was replicated in dilution experiments with serum samples from patients identified as positive (P01–P05), whereas samples categorized as negative for SELENOP-aAb (N01–N03) showed background signals only (Figure 1B). Unlabeled recombinant SELENOP (1 mg/mL) applied to BSA-free (control 1), or BSA-containing reaction buffer (control 2), was capable of suppressing SELENOP-aAb signals from positive samples, highlighting the specificity of the detection method (Figure 1C).

In order to test for natural SELENOP-aAb in human subjects, serum samples from 2 cohorts of thyroid patients ($n = 423$), along with a collection of healthy controls ($n = 400$), were compared. The results showed a skewed distribution of signals (Figure 1D), and relative binding indices (BI) were calculated by dividing the individual SELENOP-aAb

Se-dependent luciferase in combination with the selenocysteine insertion sequence (SECIS) element of GPX4. The reporter system showed Se-dependent induction of luciferase activity in response to inorganic selenite (1.0, 5.0 or 10 nM, f.c.), and in response to human serum (0.05% or 0.5%, v/v) as a natural Se source, as expected under regular Se-deficient culture conditions with 10% FBS as sole Se source. A significant decline in the luciferase reporter signal was observed upon adding an antibody to SELENOP (0.8 ng/mL), into the culture medium (Figure 2D). This result is compatible with the notion of SELENOP-aAb disturbing SELENOP uptake into target cells. To further verify the characteristics of natural SELENOP-aAb, immunoglobulins were isolated from positive and negative serum samples by protein A-mediated immunoprecipitation and analyzed for directly associated Se and SELENOP content. The isolates from SELENOP-aAb-positive samples contained measurable amounts of Se (Figure 2E) and/or SELENOP (Figure 2F), whereas isolates from controls were devoid of associated Se or SELENOP.

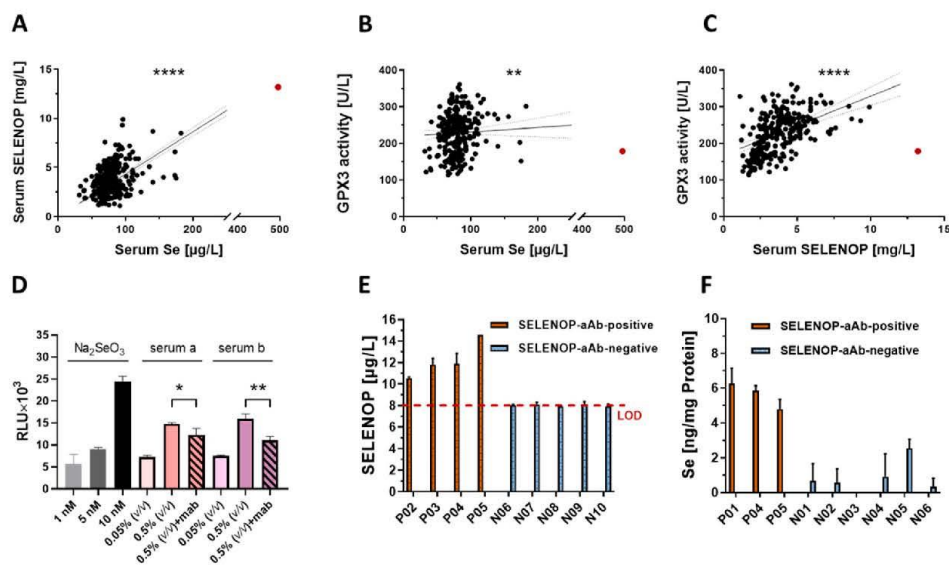


Figure 2. Selenium (Se) status assessment and potential role of natural SELENOP-aAb. Three biomarkers of Se status were determined in serum samples from AITD patients ($n = 284$). Positive correlations were observed for (A) total Se with SELENOP ($r = 0.342$, $p < 0.0001$), (B) total Se with GPX3 activity ($r = 0.171$, $p = 0.0046$), and (C) SELENOP with GPX3 activity ($r = 0.545$, $p < 0.0001$). The sample with highest SELENOP-aAb displayed exceptionally high Se and SELENOP levels in combination with moderate GPX3 activity (indicated as red dots). (D) HEK293 cells expressing a Se-dependent luciferase showed increased reporter activity (RLU) in response to selenite or human serum added to the culture medium. The signal was significantly suppressed by the addition of a SELENOP-specific antibody ($n = 3$). (E) The immunoglobulins from 5 SELENOP-aAb-positive (P01–P05) and 10 SELENOP-aAb-negative samples (N01–N10) were precipitated by protein A. Measurable (E) SELENOP or (F) Se concentrations were detected in the isolates from SELENOP-aAb-positive samples only, but not in those from SELENOP-aAb-negative samples. Correlations were analyzed by Spearman's correlation test. Two-tailed t -test was used for comparisons between two groups, p -values < 0.05 were considered statistically significant; * indicates $p < 0.05$; ** indicates $p < 0.01$; **** indicates $p < 0.0001$.

When classifying patients as SELENOP-aAb-positive or -negative, by choosing BI > 5.0 as threshold, the positive samples displayed elevated total serum Se (median: 85.3 vs. 77.0 $\mu\text{g/L}$, $p = 0.033$), whereas SELENOP concentration or GPX3 activity was not different (Figure 3A–C). A positive correlation was observed between SELENOP-aAb with Se ($r = 0.582$, $p = 0.018$) (Figure 3D) and with SELENOP ($r = 0.730$, $p = 0.001$) (Figure 3E), but not with GPX3 activity (Figure 3F). When using a higher threshold, i.e., BI > 10 as

cut-off, relatively high Se (85.3 vs. 77.1 $\mu\text{g/L}$, $p = 0.0178$) and SELENOP (5.1 vs. 3.5 mg/L , $p = 0.001$) concentrations were observed in the group of SELENOP-aAb-positive samples (Figure 3A,B), whereas GPX3 activity was not elevated (Figure 3C). Positive correlation was observed between SELENOP-aAb and Se ($r = 0.695$, $p = 0.038$) (Figure 3G) or SELENOP ($r = 0.627$, $p = 0.035$) (Figure 3H), reaching statistical significance when the very positive sample highlighted in Figure 2A–C is included, but not when omitted from the analysis. Notably, the SELENOP-aAb correlated inversely to GPX3 activity ($r = -0.669$, $p = 0.049$) (Figure 3I).

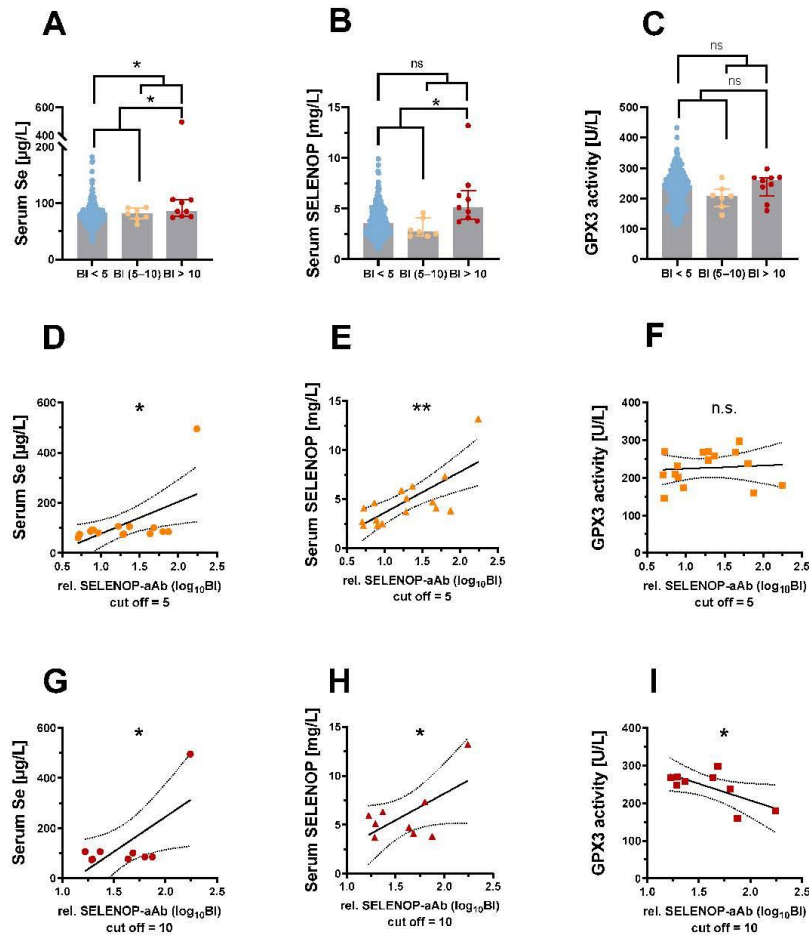


Figure 3. Comparison of three complementary biomarkers of Se-status in relation to SELENOP autoimmunity. The patients with positive SELENOP-aAb (BI > 5) displayed relatively high (A) total Se, while (B) SELENOP or (C) GPX3 activity were not different in comparison to SELENOP-aAb-negative patients. SELENOP-aAb correlated positively to (D) serum Se and (E) SELENOP, but not to (F) GPX3 activity. When applying a more stringent cut-off for positivity (BI > 10), serum samples with positive SELENOP-aAb displayed relatively high (A) total Se and (B) SELENOP, whereas (C) GPX3 activity was not elevated. Positive correlation was observed between SELENOP-aAb and (G) serum Se and (H) SELENOP. (I) GPX3 activity was inversely correlated to SELENOP-aAb. Comparisons between two groups were conducted by Mann–Whitney test. Correlations were tested by Pearson’s correlation analysis with two-tailed p -values. p -values < 0.05 were considered statistically significant; n.s. indicates $p \geq 0.05$; * indicates $p < 0.05$, and ** indicates $p < 0.01$.

3. Discussion

This study describes naturally occurring autoantibodies to the Se transport protein SELENOP in human subjects and suggests a potential physiological relevance. Our data indicate that autoimmunity to SELENOP is a rare finding in healthy adult subjects. However, a considerable fraction of thyroid patients express SELENOP-aAb to varying degrees, with some patients being highly positive for SELENOP-aAb. The elevated prevalence in Hashimoto's thyroiditis may either result from SELENOP-aAb predisposing them to the diseases—as low Se has been identified as risk factor for autoimmune thyroid disease [31–33]—or the autoimmunity develops as a consequence of the ongoing inflammation and associated oxidative damage to thyroid proteins, i.e., resulting from the lymphocytic thyroiditis and generation of novel autoantigens as side effect of disease [8,34]. Alternatively, both the predisposition to and consequences of the inflammatory disease may have contributed to the elevated prevalence of SELENOP-aAb observed in the patients [6]. From an etiological perspective, human SELENOP is naturally synthesized in different variants, some of which are potentially prone to becoming easily modified and eliciting an autoimmune response, as the protein carries several highly reactive selenocysteine residues [35,36]. Both notions may offer an explanation for the increased prevalence of SELENOP-aAb in AITD and indicate a diagnostic or even pathophysiological relevance, as just recently documented for the central role of Se status and GPX-dependent protection from neutrophil ferroptosis in systemic autoimmunity [37]. This hypothesis needs to be elucidated in larger studies and ideally with samples from a longitudinal, prospective trial.

Against our expectation, SELENOP-aAb were not associated with SELENOP deficiency, but rather with elevated Se and SELENOP serum concentrations, suggesting some stabilizing effect of the autoantibodies on circulating SELENOP. This interpretation is consistent with the observed inhibition of SELENOP uptake into renal HEK293 target cells by antibodies to SELENOP, nicely echoing published results on SELENOP-neutralizing antibodies antagonizing Se uptake as novel candidates for type 2 diabetes therapy [38,39]. Importantly, this theory is substantiated in human subjects by the relatively low and inadequate GPX3 activity in SELENOP-aAb-positive patients, and the inverse association of GPX3 activity with SELENOP-aAb concentrations, despite an increased Se status as reflected in elevated total Se and SELENOP levels. Transgenic mouse models have shown that hepatic SELENOP biosynthesis is supplying the kidney with Se for GPX3 biosynthesis via specific uptake through the lipoprotein receptor megalin [22,40]. In the case that the antagonistic nature of SELENOP-aAb, impairing Se supply to target cells, becomes substantiated by future research, it would be of far-reaching medical relevance, as also the central nervous system relies on receptor-mediated SELENOP uptake for Se supply and protection of highly active interneurons from death by ferroptosis [41,42]. In the absence of regular and efficient SELENOP supply and uptake, severe neurological symptoms, including epileptic seizures, were observed in transgenic mice [41,43–46], and also recently in a dog model of impaired SELENOP expression, leading to brain atrophy and cerebellar ataxia [47]. It remains to be tested whether SELENOP-aAb are relevant for neurological disease, and whether SELENOP-aAb-positive thyroid patients are at particular risk for neurological sequelae, e.g., seizures, tremors, ataxia, or symptoms of Hashimoto encephalopathy.

Correcting a Se deficit, whatever the cause, needs an adequate supply, as excessive Se intake can be toxic [48]. Some observational studies and systematic analyses have reported an association between elevated Se concentrations and type 2 diabetes [49]. Other systematic reviews, focusing on sufficiently large and well-controlled supplementation studies, show that there is no evidence that Se supplementation increases the risk of type 2 diabetes [50]. The documented association between increased serum Se concentrations and type 2 diabetes could be a consequence of insulin resistance leading to increased hepatic biosynthesis of SELENOP due to abrogation of insulin-mediated SELENOP suppression, i.e., a question of reverse causality, potentially a function of protecting the cardiovascular system [51]. This notion is supported by recent findings of a positive association between increased Se concentrations and protection from all-cause mortality and heart dis-

ease mortality in diabetic patients, as determined in NHANES III [52]. The extent to which SELENOP-aAb may alter the protective interaction of Se and SELENOP on the vasculature is unknown, and the question of whether functional Se deficiency by low Se supply, in combination with SELENOP-aAb causes hypoglycemia needs to be investigated [53].

Our findings suggest that Se status assessment by the biomarkers used until now, i.e., total Se and SELENOP concentrations along with GPX3 activity [54–58], may be insufficient when SELENOP-aAb are present. In particular, the poor correlation between Se or SELENOP concentrations and GPX3 activity in a given subject may indicate the presence of SELENOP-aAb impairing SELENOP uptake and GPX3 biosynthesis by kidney, as impressively documented in the positive subject with highest SELENOP-aAb (red dots in Figure 2). This interrelation may also be of relevance for preventive or adjuvant Se therapy [33,59–62], as positive effects may be observed, particularly in the presence of SELENOP-aAb. This hypothesis is based on the findings in transgenic mice, where SELENOP deficiency and resulting symptoms can be successfully compensated for by supplemental selenite or other selenocompounds [45,63–65]. A score combining classical Se status biomarkers with the presence of SELENOP-aAb may be superior in judging the functional Se status and requirements for Se supplementation than a single biomarker alone. Such a scoring system would be capable of identifying Se deficiency also in cohorts of well-supplied subjects with apparently sufficient SELENOP expression, and might indicate subjects with specific requirements to overcome SELENOP-aAb-mediated inhibition of SELENOP-dependent Se supply (Figure 4). Prospective studies of sufficient size and length are needed next to test the clinical relevance of SELENOP-aAb for AITD risk, and for stratifying the results from Se supplementation studies.

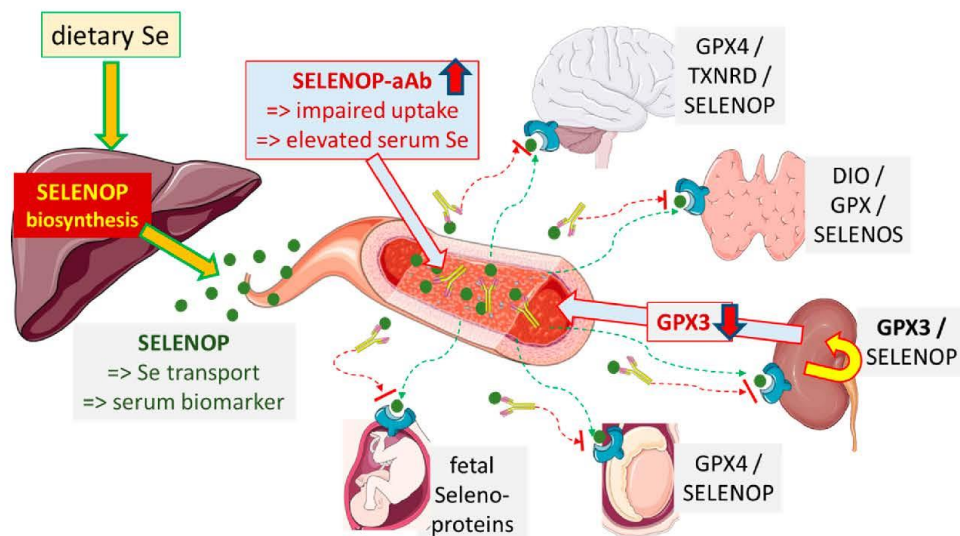


Figure 4. Potential pathophysiological relevance of SELENOP-aAb. Dietary sources of Se are mainly converted in hepatocytes into SELENOP for secretion and systemic supply of target tissues. Thereby, SELENOP constitutes both the major serum Se transporter and a reliable biomarker of Se status. Patients with elevated SELENOP-aAb display increased serum Se and SELENOP concentrations, indicative of SELENOP stabilization or impaired receptor-mediated SELENOP uptake and clearance. Thereby, target tissues may become insufficiently supplied for full biosynthesis of the essential tissue-relevant selenoproteins (examples are indicated). The biosynthesis of circulating GPX3 by kidney cells is known to directly depend on hepatic SELENOP. Accordingly, serum GPX3 activity correlated inversely to SELENOP-aAb in thyroid patients, consistent with target cell Se deficiency. Extrapolating these results, SELENOP-aAb may increase the risk of neurological symptoms, thyroid disease, subfertility, pregnancy problems, and other Se-dependent diseases.

4. Materials and Methods

4.1. Human Samples

Blood samples ($n = 423$) from patients with different thyroid diseases were collected and serum was prepared, aliquoted, and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. The study had been approved by the Ethical committee of the Charité-University Medical School, Berlin (#EA2/173/17). Recruitment of the patients proceeded in consecutive manner and diagnostic criteria for thyroid disease were applied as described in [66]. A cohort of serum samples from subjects with a self-reported status as healthy (controls, $n = 400$) was obtained from a commercial supplier (InVent Diagnostica GmbH, Hennigsdorf, Germany) and served as control (Table 1). All samples included were derived after obtaining written informed consent from the subjects enrolled into the analyses, and the study was conducted in accordance with the declaration of Helsinki on ethical principles for medical research involving human subjects.

Table 1. Characterization of the study cohort.

Healthy Controls	$n = 400$
sex, female/male [n/n]	200/200
age, median (95% CI) [y]	31 (29–32)
Thyroid Patients	$n = 423$
sex, female/male [n/n]	362/61
age, median (95% CI) [y]	49 (47–51)
GOI, n (%)	61 (14.4%)
TCa, n (%)	17 (4.0%)
Hypo, n (%)	61 (14.4%)
GD, n (%)	73 (17.3%)
HT, n (%)	211 (49.9%)

GOI—goitre; TCa—thyroid carcinoma; Hypo—hypothyroidism; GD—Graves' disease; HT—Hashimoto's thyroiditis.

4.2. Generation of Recombinant SEAP-SELENOP Reporter Proteins

The cDNA of secreted alkaline phosphatase (SEAP) was amplified by PCR and inserted into plasmid pIRESneo (Clontech, Palo Alto, CA, USA) giving rise to pIRESneo-SEAP. A cDNA of a UGA-free human SELENOP reading frame was synthesized, whereby UGA codons were replaced by cysteine codons by a commercial supplier (Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Germany). The fragment was amplified by PCR and ligated into pIRESneo-SEAP, amplified in *E. coli* and sequence verified. Recombinant protein was produced via stable expression of pIRESneo-SEAP-SELENOP in HEK 293 cells. Cell culture supernatants containing the secreted recombinant protein were collected and used as reporter in the SELENOP-aAb detection assay.

4.3. Immunoluminometric Assay for Detection of SELENOP-aAb

The immunoluminometric assay is based on the binding of aAb to recombinant SEAP-SELENOP, followed by precipitation of the antibody-antigen-reporter complex by protein A. To this end, diluted supernatants of HEK293 cells expressing SEAP-SELENOP was incubated with 5 μL serum sample at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ overnight. On the second day, the same volume (40 μL) of a protein A slurry (ASKA Biotech GmbH, Berlin, Germany) was added and incubated for 1 h at RT. Complexes formed were washed 6 times with washing buffer (50 mM Tris HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 10% glycerol, and 0.5% Triton X-100), removing unbound SEAP-SELENOP and other serum proteins. Finally, reporter activity was detected as luminescence signal by a luminometer (Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad, Germany). Binding index (BI) was calculated for each sample by dividing the relative light units (RLU), obtained with the average RLU from the lowest 50% of signals in the same assay plate, which was set as BI = 1.0. This mathematical method for background signal definition was based on the assumption that SELENOP-aAb were present in less than 50% of the samples tested. During the analyses, the inter- and intra-assay CV was determined

to be below 20% based on the analysis of selected positive and negative serum samples included into each assay run.

4.4. Isolation of Immunoglobulins (IgG) from Serum Sample

Total IgGs were isolated from five positive and ten negative serum samples by precipitation with Protein A slurry (ASKA Biotech GmbH, Berlin, Germany). To this end, serum samples were incubated with 2 volumes of protein A in PBS (50%) overnight at 4 °C. The supernatants were discarded, and the pellets were washed 6 times with PBS. Precipitated IgG were eluted with 3-fold volume of citric acid (25 mM, pH 2.0) and neutralized using 1-fold volume of HEPES (1 M, pH 8.0).

4.5. Quantification of GPX3 Activity and Total Se and SELENOP Concentrations

GPX3 activity in serum samples was determined by a coupled enzymatic test monitoring NADPH decline at 340 nm due to glutathione reductase activity catalyzing regeneration of consumed glutathione by GPX during H₂O₂ reduction [67]. Briefly, serum samples of 5 µL were applied to 96-well plates containing 200 µL of a test mixture, including 1 mM NaN₃, 3.4 mM reduced glutathione, 0.3 U/mL glutathione reductase, and 0.27 mg/mL NADPH. The reaction was started by 10 µL of 0.00375% H₂O₂. A constant serum sample was included into each assay run for quality control. The inter- and intra-assay CVs were determined to be below 15% during the analyses.

Se concentrations in serum samples or in the immunoglobulin-isolates were analyzed by total reflection X-ray fluorescence (TXRF) using a benchtop TXRF analyzer (S4 T-STAR, Bruker Nano GmbH, Berlin, Germany), as described previously [68,69]. Briefly, serum samples were diluted with a Ga-standard (1 mg/L, Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Germany), applied to polished quartz glass plates, and dried at 37 °C overnight. Isolated immunoglobulin complexes from SELENOP-aAb-positive and -negative serum samples were precipitated by adding 9 volumes of ice-cold ethanol (100%) overnight at −80 °C, and subsequent centrifugation for 30 min at 4 °C and 14,000× g. The pellets were dissolved at 80 °C for 2 h in 100 µL HNO₃ (61%), the Ga standard was added, and sample was applied to quartz plates and analyzed. A commercial serum standard (Seronorm, Sero AS, Billingstad, Norway) served as control in each analytical run. The determined concentrations of Se were within the specified range of the standard, and the inter-assay coefficient of variation (CV) was below 5% during the analyses.

SELENOP concentrations were determined by a validated commercial SELENOP-specific ELISA (selenOtest ELISA, selenOmed GmbH, Berlin, Germany), essentially as described in [29]. Briefly, 100 µL of each IgG-isolate or 1:33 diluted serum samples were applied to pre-coated 96-well plates. Standards and calibrators were included into each assay run for quality control. The inter-assay CV was determined to be below 10%.

4.6. Luciferase-Based Reporter Gene Assay for Selenoprotein Biosynthesis in Cell Culture

A Se-responsive reporter gene assay was established using stably transfected human embryonic kidney (HEK293) cells, expressing a luciferase reporter containing a fusion protein of Firefly (FLuc) and Renilla (RLuc) luciferase, interrupted by an in-frame UGA codon and a GPX4-derived selenocysteine-insertion sequence (SECIS) element, as described previously [70]. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM/F12; Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany), containing 10% (v/v) FCS. For reporter gene assay, 20,000 cells per well were cultivated in 96-well plates in DMEM/F12 containing 10% (v/v) FCS for 24 h and stimulated by different sources of Se (sodium selenite or human serum) in the absence or presence of an anti-SELENOP antibody (0.8 ng/mL f.c., #SM-MAB-7356, selenOmed GmbH, Berlin, Germany).

The two human sera used in this experiment were tested free of SELENOP-aAb. The Se concentrations of these serum samples used in the in vitro studies were (a) 100.6 µg/L and (b) 109.7 µg/L, corresponding to the final Se concentrations in the cell culture mediums (0.5% serum, v/v), of 6.4 nM and 6.9 nM, respectively. After 48 h of incubation, medium

was removed and cells were lysed in 40 μL passive Lysis puffer (PromoCell, Heidelberg, Germany) for 10 min at RT and stored at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ to support cell lysis until measurement. For the detection, 25 μL of cell lysates were transferred into white 96-well plates, and Renilla luciferase activity was measured 30 s after adding coelenterazine (100 $\mu\text{L}/\text{well}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS, Synchem UG, Altenburg, Germany) using a microplate reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

4.7. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using SPSS (version 25, SAS Institute, Cary, NC, USA) or GraphPad Prism v.9.1.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The results are represented as mean with SD, as median with interquartile range, or by displaying the individual values. Normal distribution of values was tested by the Shapiro–Wilk test. Comparisons between two groups were conducted by unpaired *t*-test, and non-normally distributed variables were compared with the Mann–Whitney test. Correlations were tested by Pearson’s correlation analysis and for non-normally distributed variables by Spearman’s correlation test. *p*-values < 0.05 were considered significant; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

5. Conclusions

The results indicated an impairment of SELENOP-dependent Se transport by natural SELENOP autoantibodies, and suggest that the characterization of health risk from Se deficiency may need to include autoimmunity to SELENOP as additional biomarker of Se status. Thereby, patients with “functional Se deficits” may be identified as those who may display a particular requirement for a sufficiently high Se intake and are likely to respond positively to adjuvant Se in clinical supplementation trials.

Author Contributions: Q.S. performed the measurements; S.M., C.L.G. and G.J.K. conducted the clinical sample collection; K.R. designed the reporter experiment; W.B.M. prepared the autoantigen and developed the aAb assay; J.H. and P.S. contributed to the experiments; L.S. designed the study; L.S. supervised and coordinated its execution; G.J.K. and L.S. wrote the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The research was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), research unit FOR-2558 “TraceAge” (Scho 849/6-2), and CRC/TR 296 “Local control of TH action” (LocoTact, P17).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Charité-University Medical School, Berlin (#EA2/173/17).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study by the study authors, or by the commercial supplier providing the control samples.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available upon reasonable request from the corresponding author.

Acknowledgments: Essential intellectual support was provided by the inspiring colleagues from the International Society for Selenium Research (ISSR). Figure 4 and the graphical abstract were drawn with graphic elements from Servier Medical Art (www.servier.com), provided under a Creative Commons 3.0 license.

Conflicts of Interest: L.S. and P.S. hold shares, and P.S. serves as CEO of selenOmed GmbH, a company involved in Se status assessment. L.S. is listed as inventor on a related patent application.

References

1. Weetman, A.P. An update on the pathogenesis of Hashimoto’s thyroiditis. *J. Endocrinol. Investig.* **2021**, *44*, 883–890. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. George, A.; Diana, T.; Langericht, J.; Kahaly, G.J. Stimulatory Thyrotropin Receptor Antibodies Are a Biomarker for Graves’ Orbitopathy. *Front. Endocrinol.* **2020**, *11*, 629925. [[CrossRef](#)]
3. Sinclair, D. Analytical aspects of thyroid antibodies estimation. *Autoimmunity* **2008**, *41*, 46–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Prummel, M.F.; Wiersinga, W.M. Thyroid peroxidase autoantibodies in euthyroid subjects. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *19*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Negro, R.; Greco, G.; Mangieri, T.; Pezzarossa, A.; Dazzi, D.; Hassan, H. The influence of selenium supplementation on postpartum thyroid status in pregnant women with thyroid peroxidase autoantibodies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2007**, *92*, 1263–1268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Schomburg, L. Selenium Deficiency Due to Diet, Pregnancy, Severe Illness, or COVID-19—A Preventable Trigger for Autoimmune Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Di Dalmazi, G.; Hirshberg, J.; Lyle, D.; Freij, J.B.; Caturegli, P. Reactive oxygen species in organ-specific autoimmunity. *Autoimmun. Highlights* **2016**, *7*, 11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Ralli, M.; Angeletti, D.; Fiore, M.; D’Aguanno, V.; Lambiase, A.; Artico, M.; de Vincentiis, M.; Greco, A. Hashimoto’s thyroiditis: An update on pathogenic mechanisms, diagnostic protocols, therapeutic strategies, and potential malignant transformation. *Autoimmun. Rev.* **2020**, *19*, 102649. [[CrossRef](#)]
9. Wichman, J.; Winther, K.H.; Bonnema, S.J.; Hegedus, L. Selenium Supplementation Significantly Reduces Thyroid Autoantibody Levels in Patients with Chronic Autoimmune Thyroiditis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Thyroid* **2016**, *26*, 1681–1692. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Filipowicz, D.; Majewska, K.; Kalantarova, A.; Szczepanek-Parulska, E.; Ruchala, M. The rationale for selenium supplementation in patients with autoimmune thyroiditis, according to the current state of knowledge. *Endokrynol. Pol.* **2021**, *72*, 153–162. [[CrossRef](#)]
11. Derumeaux, H.; Valeix, P.; Castetbon, K.; Bensimon, M.; Boutron-Ruault, M.C.; Arnaud, J.; Herberg, S. Association of selenium with thyroid volume and echostructure in 35- to 60-year-old French adults. *Eur. J. Endocrinol.* **2003**, *148*, 309–315. [[CrossRef](#)]
12. Rasmussen, L.B.; Schomburg, L.; Kohrle, J.; Pedersen, I.B.; Hollenbach, B.; Hog, A.; Ovesen, L.; Perrild, H.; Laurberg, P. Selenium status, thyroid volume, and multiple nodule formation in an area with mild iodine deficiency. *Eur. J. Endocrinol.* **2011**, *164*, 585–590. [[CrossRef](#)]
13. Wu, Q.; Rayman, M.P.; Lv, H.; Schomburg, L.; Cui, B.; Gao, C.; Chen, P.; Zhuang, G.; Zhang, Z.; Peng, X.; et al. Low Population Selenium Status Is Associated with Increased Prevalence of Thyroid Disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2015**, *100*, 4037–4047. [[CrossRef](#)]
14. Carlson, B.A.; Lee, B.J.; Tsuji, P.A.; Copeland, P.R.; Schweizer, U.; Gladyshev, V.N.; Hatfield, D.L. Selenocysteine tRNA([Ser]Sec), the Central Component of Selenoprotein Biosynthesis: Isolation, Identification, Modification, and Sequencing. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1661*, 43–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Hatfield, D.L.; Tsuji, P.A.; Carlson, B.A.; Gladyshev, V.N. Selenium and selenocysteine: Roles in cancer, health, and development. *Trends Biochem. Sci.* **2014**, *39*, 112–120. [[CrossRef](#)]
16. Gladyshev, V.N.; Amer, E.S.; Berry, M.J.; Brigelius-Flohe, R.; Bruford, E.A.; Burk, R.F.; Carlson, B.A.; Castellano, S.; Chavatte, L.; Conrad, M.; et al. Selenoprotein Gene Nomenclature. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 24036–24040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Steinbrenner, H.; Speckmann, B.; Klotz, L.O. Selenoproteins: Antioxidant selenoenzymes and beyond. *Arch. Biochem. Biophys.* **2016**, *595*, 113–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Schmutzler, C.; Mentrup, B.; Schomburg, L.; Hoang-Vu, C.; Herzog, V.; Kohrle, J. Selenoproteins of the thyroid gland: Expression, localization and possible function of glutathione peroxidase 3. *Biol. Chem.* **2007**, *388*, 1053–1059. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Saito, Y.; Sato, N.; Hirashima, M.; Takebe, G.; Nagasawa, S.; Takahashi, K. Domain structure of bi-functional selenoprotein P. *Biochem. J.* **2004**, *381*, 841–846. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Burk, R.F.; Hill, K.E. Regulation of Selenium Metabolism and Transport. *Annu. Rev. Nutr.* **2015**, *35*, 109–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Schweizer, U.; Streckfuss, F.; Pelt, P.; Carlson, B.A.; Hatfield, D.L.; Kohrle, J.; Schomburg, L. Hepatically derived selenoprotein P is a key factor for kidney but not for brain selenium supply. *Biochem. J.* **2005**, *386*, 221–226. [[CrossRef](#)]
22. Renko, K.; Werner, M.; Renner-Muller, I.; Cooper, T.G.; Yeung, C.H.; Hollenbach, B.; Scharpf, M.; Kohrle, J.; Schomburg, L.; Schweizer, U. Hepatic selenoprotein P (SePP) expression restores selenium transport and prevents infertility and motor- incoordination in Sepp-knockout mice. *Biochem. J.* **2008**, *409*, 741–749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Tanaka, M.; Saito, Y.; Misu, H.; Kato, S.; Kita, Y.; Takeshita, Y.; Kanamori, T.; Nagano, T.; Nakagen, M.; Urabe, T.; et al. Development of a Sol Particle Homogeneous Immunoassay for Measuring Full-Length Selenoprotein P in Human Serum. *J. Clin. Lab. Anal.* **2016**, *30*, 114–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Mariotti, M.; Shetty, S.; Baird, L.; Wu, S.; Loughran, G.; Copeland, P.R.; Atkins, J.F.; Howard, M.T. Multiple RNA structures affect translation initiation and UGA redefinition efficiency during synthesis of selenoprotein P. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 13004–13015. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Tobe, R.; Naranjo-Suarez, S.; Everley, R.A.; Carlson, B.A.; Turanov, A.A.; Tsuji, P.A.; Yoo, M.H.; Gygi, S.P.; Gladyshev, V.N.; Hatfield, D.L. High Error Rates in Selenocysteine Insertion in Mammalian Cells Treated with the Antibiotic Doxycycline, Chloramphenicol, or Geneticin. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 14709–14715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Turanov, A.A.; Everley, R.A.; Hybsier, S.; Renko, K.; Schomburg, L.; Gygi, S.P.; Hatfield, D.L.; Gladyshev, V.N. Regulation of Selenocysteine Content of Human Selenoprotein P by Dietary Selenium and Insertion of Cysteine in Place of Selenocysteine. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0140353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Handy, D.E.; Hang, G.Z.; Scolaro, J.; Metes, N.; Razaq, N.; Yang, Y.; Loscalzo, J. Aminoglycosides decrease glutathione peroxidase-1 activity by interfering with selenocysteine incorporation. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 3382–3388. [[CrossRef](#)]

28. Renko, K.; Martitz, J.; Hybsier, S.; Heynisch, B.; Voss, L.; Everley, R.A.; Gygi, S.P.; Stoedter, M.; Wisniewska, M.; Kohrle, J.; et al. Aminoglycoside-driven biosynthesis of selenium-deficient Selenoprotein P. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 4391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Hybsier, S.; Schulz, T.; Wu, Z.; Demuth, I.; Minich, W.B.; Renko, K.; Rijntjes, E.; Kohrle, J.; Strasburger, C.J.; Steinhagen-Thiessen, E.; et al. 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. [[CrossRef](#)]
30. Hill, K.E.; Zhou, J.D.; Austin, L.M.; Motley, A.K.; Ham, A.J.L.; Olson, G.E.; Atkins, J.F.; Gesteland, R.F.; Burk, R.F. The selenium-rich C-terminal domain of mouse selenoprotein P is necessary for the supply of selenium to brain and testis but not for the maintenance of whole body selenium. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 10972–10980. [[CrossRef](#)]
31. Duntas, L.H. The role of selenium in thyroid autoimmunity and cancer. *Thyroid* **2006**, *16*, 455–460. [[CrossRef](#)]
32. Schomburg, L. Selenium, selenoproteins and the thyroid gland: Interactions in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2011**, *8*, 160–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Winther, K.H.; Rayman, M.P.; Bonnema, S.J.; Hegedus, L. Selenium in thyroid disorders—Essential knowledge for clinicians. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2020**, *16*, 165–176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Burek, C.L.; Rose, N.R. Autoimmune thyroiditis and ROS. *Autoimmun. Rev.* **2008**, *7*, 530–537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Amer, E.S.J. Selenoproteins—What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? *Exp. Cell Res.* **2010**, *316*, 1296–1303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Ste Marie, E.J.; Wehrle, R.J.; Haupt, D.J.; Wood, N.B.; van der Vliet, A.; Previs, M.J.; Masterson, D.S.; Hondal, R.J. Can Selenoenzymes Resist Electrophilic Modification? Evidence from Thioredoxin Reductase and a Mutant Containing alpha-Methylselenocysteine. *Biochemistry* **2020**, *59*, 3300–3315. [[CrossRef](#)]
37. Li, P.; Jiang, M.; Li, K.; Li, H.; Zhou, Y.; Xiao, X.; Xu, Y.; Krishfield, S.; Lipsky, P.E.; Tsokos, G.C.; et al. Glutathione peroxidase 4-regulated neutrophil ferroptosis induces systemic autoimmunity. *Nat. Immunol.* **2021**, *22*, 1107–1117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Mita, Y.; Nakayama, K.; Inari, S.; Nishito, Y.; Yoshioka, Y.; Sakai, N.; Sotani, K.; Nagamura, T.; Kuzuhara, Y.; Inagaki, K.; et al. Selenoprotein P-neutralizing antibodies improve insulin secretion and glucose sensitivity in type 2 diabetes mouse models. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1658. [[CrossRef](#)]
39. Takamura, T. Hepatokine Selenoprotein P-Mediated Reductive Stress Causes Resistance to Intracellular Signal Transduction. *Antioxid. Redox Signal.* **2020**, *33*, 517–524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Olson, G.E.; Winfrey, V.P.; Hill, K.E.; Burk, R.F. Megalin mediates selenoprotein P uptake by kidney proximal tubule epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 6854–6860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Wirth, E.K.; Conrad, M.; Winterer, J.; Wozny, C.; Carlson, B.A.; Roth, S.; Schmitz, D.; Bornkamm, G.W.; Coppola, V.; Tessarollo, L.; et al. Neuronal selenoprotein expression is required for interneuron development and prevents seizures and neurodegeneration. *FASEB J.* **2010**, *24*, 844–852. [[CrossRef](#)]
42. Ingold, I.; Berndt, C.; Schmitt, S.; Doll, S.; Poschmann, G.; Buday, K.; Roveri, A.; Peng, X.X.; Freitas, F.P.; Seibt, T.; et al. Selenium Utilization by GPX4 Is Required to Prevent Hydroperoxide-Induced Ferroptosis. *Cell* **2018**, *172*, 409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Burk, R.F.; Hill, K.E.; Olson, G.E.; Weeber, E.J.; Motley, A.K.; Winfrey, V.P.; Austin, L.M. Deletion of apolipoprotein E receptor-2 in mice lowers brain selenium and causes severe neurological dysfunction and death when a low-selenium diet is fed. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 6207–6211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Seeher, S.; Carlson, B.A.; Miniard, A.C.; Wirth, E.K.; Mahdi, Y.; Hatfield, D.L.; Driscoll, D.M.; Schweizer, U. Impaired selenoprotein expression in brain triggers striatal neuronal loss leading to co-ordination defects in mice. *Biochem. J.* **2014**, *462*, 67–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Byrns, C.N.; Pitts, M.W.; Gilman, C.A.; Hashimoto, A.C.; Berry, M.J. Mice Lacking Selenoprotein P and Selenocysteine Lyase Exhibit Severe Neurological Dysfunction, Neurodegeneration, and Audiogenic Seizures. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 9662–9674. [[CrossRef](#)]
46. Burk, R.F.; Hill, K.E.; Motley, A.K.; Winfrey, V.P.; Kurokawa, S.; Mitchell, S.L.; Zhang, W. Selenoprotein P and apolipoprotein E receptor-2 interact at the blood-brain barrier and also within the brain to maintain an essential selenium pool that protects against neurodegeneration. *FASEB J.* **2014**, *28*, 3579–3588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Christen, M.; Hogler, S.; Kleiter, M.; Leschnik, M.; Weber, C.; Thaller, D.; Jagannathan, V.; Leeb, T. Deletion of the SELENOP gene leads to CNS atrophy with cerebellar ataxia in dogs. *PLoS Genet.* **2021**, *17*, e1009716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Raisbeck, M.F. Selenosis in Ruminants. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* **2020**, *36*, 775–789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Vinceti, M.; Filippini, T.; Wise, L.A.; Rothman, K.J. A systematic review and dose-response meta-analysis of exposure to environmental selenium and the risk of type 2 diabetes in nonexperimental studies. *Environ. Res.* **2021**, *197*, 111210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Kohler, L.N.; Foote, J.; Kelley, C.P.; Florea, A.; Shelly, C.; Chow, H.S.; Hsu, P.; Batai, K.; Ellis, N.; Saboda, K.; et al. Selenium and Type 2 Diabetes: Systematic Review. *Nutrients* **2018**, *10*, 1924. [[CrossRef](#)]
51. Schomburg, L. The other view: The trace element selenium as a micronutrient in thyroid disease, diabetes, and beyond. *Hormones* **2020**, *19*, 15–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Qiu, Z.; Geng, T.; Wan, Z.; Lu, Q.; Guo, J.; Liu, L.; Pan, A.; Liu, G. Serum selenium concentrations and risk of all-cause and heart disease mortality among individuals with type 2 diabetes. *Am. J. Clin. Nutr.* **2021**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Wang, Y.; Rijntjes, E.; Wu, Q.; Lv, H.; Gao, C.; Shi, B.; Schomburg, L. Selenium deficiency is linearly associated with hypoglycemia in healthy adults. *Redox Biol.* **2020**, *37*, 101709. [[CrossRef](#)]

54. Hurst, R.; Collings, R.; Harvey, L.J.; King, M.; Hooper, L.; Bouwman, J.; Gurinovic, M.; Fairweather-Tait, S.J. EURRECA-Estimating selenium requirements for deriving dietary reference values. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2013**, *53*, 1077–1096. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Ashton, K.; Hooper, L.; Harvey, L.J.; Hurst, R.; Casgrain, A.; Fairweather-Tait, S.J. Methods of assessment of selenium status in humans: A systematic review. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *89*, 2025s–2039s. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Combs, G.F., Jr. Biomarkers of selenium status. *Nutrients* **2015**, *7*, 2209–2236. [[CrossRef](#)]
57. Brodin, O.; Hackler, J.; Misra, S.; Wendt, S.; Sun, Q.; Laaf, E.; Stoppe, C.; Bjornstedt, M.; Schomburg, L. Selenoprotein P as Biomarker of Selenium Status in Clinical Trials with Therapeutic Dosages of Selenite. *Nutrients* **2020**, *2*, 1067. [[CrossRef](#)]
58. Demircan, K.; Bengtsson, Y.; Sun, Q.; Brange, A.; Vallon-Christersson, J.; Rijntjes, E.; Malmberg, M.; Saal, L.H.; Ryden, L.; Borg, A.; et al. Serum selenium, selenoprotein P and glutathione peroxidase 3 as predictors of mortality and recurrence following breast cancer diagnosis: A multicentre cohort study. *Redox Biol.* **2021**, *47*, 102145. [[CrossRef](#)]
59. Muecke, R.; Schomburg, L.; Buentzel, J.; Kisters, K.; Micke, O.; German Working Group Trace Elements and Electrolytes in Oncology-AKTE. Selenium or no selenium—That is the question in tumor patients: A new controversy. *Integr. Cancer Ther.* **2010**, *9*, 136–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Aaseth, J.; Alexander, J.; Bjorklund, G.; Hestad, K.; Dusek, P.; Roos, P.M.; Alehagen, U. Treatment strategies in Alzheimer’s disease: A review with focus on selenium supplementation. *Biometals* **2016**, *29*, 827–839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Steinbrenner, H.; Al-Quraishy, S.; Dkhal, M.A.; Wunderlich, F.; Sies, H. Dietary selenium in adjuvant therapy of viral and bacterial infections. *Adv. Nutr.* **2015**, *6*, 73–82. [[CrossRef](#)]
62. Tan, H.W.; Mo, H.Y.; Lau, A.T.Y.; Xu, Y.M. Selenium Species: Current Status and Potentials in Cancer Prevention and Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *20*, 75. [[CrossRef](#)]
63. Schweizer, U.; Michaelis, M.; Kohrle, J.; Schomburg, L. Efficient selenium transfer from mother to offspring in selenoprotein-P-deficient mice enables dose-dependent rescue of phenotypes associated with selenium deficiency. *Biochem. J.* **2004**, *378*, 21–26. [[CrossRef](#)]
64. Valentine, W.M.; Abel, T.W.; Hill, K.E.; Austin, L.M.; Burk, R.F. Neurodegeneration in mice resulting from loss of functional selenoprotein P or its receptor apolipoprotein E receptor 2. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2008**, *67*, 68–77. [[CrossRef](#)]
65. Kremer, P.M.; Torres, D.J.; Hashimoto, A.C.; Berry, M.J. Sex-Specific Metabolic Impairments in a Mouse Model of Disrupted Selenium Utilization. *Front. Nutr.* **2021**, *8*, 682700. [[CrossRef](#)]
66. Mehl, S.; Sun, Q.; Gorlich, C.L.; Hackler, J.; Kopp, J.E.; Renko, K.; Mittag, J.; Schwerdtle, T.; Schomburg, L. Cross-sectional analysis of trace element status in thyroid disease. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2020**, *58*, 126430. [[CrossRef](#)]
67. Flohé, L.; Gunzler, W.A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **1984**, *105*, 114–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Hoeflich, J.; Hollenbach, B.; Behrends, T.; Hoeg, A.; Stosnach, H.; Schomburg, L. The choice of biomarkers determines the selenium status in young German vegans and vegetarians. *Br. J. Nutr.* **2010**, *104*, 1601–1604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Jeffery, J.; Frank, A.R.; Hockridge, S.; Stosnach, H.; Costelloe, S.J. Method for measurement of serum copper, zinc and selenium using total reflection X-ray fluorescence spectroscopy on the PICOFOX analyser: Validation and comparison with atomic absorption spectroscopy and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Ann. Clin. Biochem.* **2019**, *56*, 170–178. [[CrossRef](#)]
70. Martitz, J.; Hofmann, P.J.; Johannes, J.; Kohrle, J.; Schomburg, L.; Renko, K. Factors impacting the aminoglycoside-induced UGA stop codon readthrough in selenoprotein translation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2016**, *37*, 104–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Auszug aus der Journal Summary List (Publikation 2)

Mehl S, **Sun Q**, Görlich CL, Hackler J, Kopp JF, Renko K, Mittag J, Schwerdtle T, Schomburg L.

Cross-sectional analysis of trace element status in thyroid disease. *J Trace Elem Med Biol.* 2020 Mar;58:126430. doi: 10.1016/j.jtemb.2019.126430. Epub 2019 Nov 6. PMID: 31835129.

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2020** Selected Editions: SCIE, SSCI
 Selected Categories: **"BIOCHEMISTRY and MOLECULAR BIOLOGY"** Selected
 Category Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 297 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE MEDICINE	114,401	53.440	0.184050
2	CELL	320,407	41.582	0.526960
3	Molecular Cancer	24,931	27.401	0.030030
4	Annual Review of Biochemistry	24,394	23.643	0.021450
5	Signal Transduction and Targeted Therapy	3,848	18.187	0.005730
6	MOLECULAR CELL	86,299	17.970	0.161840
7	TRENDS IN MICROBIOLOGY	17,553	17.079	0.022820
8	NUCLEIC ACIDS RESEARCH	248,139	16.971	0.387070
9	MOLECULAR BIOLOGY AND EVOLUTION	61,557	16.240	0.082270
10	PROGRESS IN LIPID RESEARCH	7,328	16.195	0.004530
11	MOLECULAR PSYCHIATRY	28,622	15.992	0.046220
12	CELL DEATH AND DIFFERENTIATION	27,701	15.828	0.028730
13	NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY	32,038	15.369	0.051210
14	Nature Chemical Biology	27,428	15.040	0.047880
15	MOLECULAR ASPECTS OF MEDICINE	8,136	14.235	0.006640
16	TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES	22,003	13.807	0.025760
17	NATURAL PRODUCT REPORTS	13,293	13.423	0.011160
18	Molecular Plant	15,778	13.164	0.026860
19	Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry	752	12.200	0.000200
20	TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE	13,213	11.951	0.014720

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
21	Redox Biology	15,982	11.799	0.024930
22	EMBO JOURNAL	76,189	11.598	0.055000
23	MATRIX BIOLOGY	8,972	11.583	0.011010
24	Molecular Systems Biology	10,149	11.429	0.016300
25	PLANT CELL	64,794	11.277	0.036260
26	CURRENT BIOLOGY	78,289	10.834	0.116100
27	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA- REVIEWS ON CANCER	7,025	10.680	0.007000
28	Cell Systems	5,813	10.304	0.035330
29	ONCOGENE	77,576	9.867	0.059180
30	CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES	34,003	9.261	0.033790
31	GENOME RESEARCH	47,141	9.043	0.064690
32	CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY	12,240	8.822	0.014190
33	EMBO REPORTS	19,502	8.807	0.027490
34	EXPERIMENTAL AND MOLECULAR MEDICINE	8,780	8.718	0.013260
35	ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING	26,971	8.401	0.016700
36	CRITICAL REVIEWS IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY	4,576	8.250	0.005370
37	Science Signaling	15,954	8.192	0.023910
38	Cell Chemical Biology	5,236	8.116	0.018050
39	PLOS BIOLOGY	39,598	8.029	0.059920
40	Essays in Biochemistry	3,629	8.000	0.006450
41	BIOINORGANIC CHEMISTRY AND APPLICATIONS	1,406	7.778	0.000890

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
42	Acta Crystallographica Section D-Structural Biology	23,670	7.652	0.020190
43	CYTOKINE & GROWTH FACTOR REVIEWS	7,650	7.638	0.005850
44	FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE	52,714	7.376	0.034180
45	Computational and Structural Biotechnology Journal	3,620	7.271	0.006770
46	AMYLOID-JOURNAL OF PROTEIN FOLDING DISORDERS	2,202	7.141	0.003280
47	Cell and Bioscience	3,184	7.133	0.004320
48	Genes & Diseases	1,850	7.103	0.003170
49	Molecular Ecology Resources	13,390	7.090	0.016690
50	Journal of Integrative Plant Biology	6,749	7.061	0.006430
51	BIOMACROMOLECULES	45,724	6.988	0.026020
52	INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES	79,246	6.953	0.073720
53	AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY	15,280	6.914	0.015050
54	International Review of Cell and Molecular Biology	3,057	6.813	0.004320
55	CURRENT OPINION IN STRUCTURAL BIOLOGY	12,448	6.809	0.018970
56	PROTEIN SCIENCE	16,581	6.725	0.021220
57	International Journal of Biological Sciences	10,778	6.580	0.010540
58	Open Biology	4,059	6.411	0.010280
59	MOLECULAR MEDICINE	6,239	6.354	0.004460
60	Antioxidants	9,076	6.312	0.009480
61	JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B-BIOLOGY	17,015	6.252	0.012740

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
62	MOLECULAR ECOLOGY	44,625	6.185	0.040470
63	HUMAN MOLECULAR GENETICS	47,192	6.150	0.047520
64	BIOFACTORS	5,004	6.113	0.002810
65	Biomedicines	2,391	6.081	0.003650
66	JOURNAL OF NUTRITIONAL BIOCHEMISTRY	14,446	6.048	0.010580
67	INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES	139,463	5.923	0.195430
68	JOURNAL OF LIPID RESEARCH	28,376	5.922	0.019290
69	CELLULAR & MOLECULAR BIOLOGY LETTERS	2,216	5.787	0.002190
70	EXPERT REVIEWS IN MOLECULAR MEDICINE	2,042	5.600	0.000790
71	Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology	865	5.545	0.000390
72	FEBS Journal	23,493	5.542	0.022540
73	Nucleic Acid Therapeutics	1,392	5.486	0.003070
74	JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY	65,163	5.469	0.038400
75	BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS	14,862	5.407	0.014350
76	Food & Function	19,700	5.396	0.021550
77	BIOELECTROCHEMISTRY	6,107	5.373	0.004870
78	JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY	40,281	5.372	0.019170
79	BIOORGANIC CHEMISTRY	10,576	5.275	0.010220
80	GENE THERAPY	8,112	5.250	0.004130
81	Frontiers in Molecular Biosciences	3,140	5.246	0.007660
82	CHROMOSOME RESEARCH	2,752	5.239	0.002250
83	CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS	16,208	5.192	0.011950

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
84	FASEB JOURNAL	54,279	5.191	0.044390
85	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-MOLECULAR BASIS OF DISEASE	20,194	5.187	0.019800
86	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY	397,453	5.157	0.155420
87	ACS Chemical Biology	16,023	5.100	0.029490
88	INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY & CELL BIOLOGY	19,050	5.085	0.010120
89	JOURNAL OF ENZYME INHIBITION AND MEDICINAL CHEMISTRY	7,303	5.051	0.005690
90	MOLECULES AND CELLS	6,228	5.034	0.006380
91	STRUCTURE	17,041	5.006	0.022940
92	MACROMOLECULAR BIOSCIENCE	8,407	4.979	0.005540
93	RNA	14,914	4.942	0.017530
94	Metabolites	3,956	4.932	0.005970
95	Biomedical Journal	1,582	4.910	0.002220
96	Biomolecules	10,162	4.879	0.014390
97	MOLECULAR CARCINOGENESIS	7,350	4.784	0.007820
98	BMB Reports	3,847	4.778	0.005130
99	CURRENT OPINION IN LIPIDOLOGY	4,741	4.776	0.005120
100	BIOCONJUGATE CHEMISTRY	18,580	4.774	0.017200
101	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-MOLECULAR CELL RESEARCH	20,873	4.739	0.017310
102	PLANT SCIENCE	20,176	4.729	0.013280
103	INSECT BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY	10,252	4.714	0.006770

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
104	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-MOLECULAR AND CELL BIOLOGY OF LIPIDS	12,873	4.698	0.012490
105	APOPTOSIS	7,359	4.677	0.004400
106	RNA Biology	8,697	4.652	0.014340
107	CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY	21,279	4.530	0.012490
108	Epigenetics	6,347	4.528	0.006530
109	Metallomics	6,417	4.526	0.007040
110	Biochimica et Biophysica Acta-Genes Regulatory Mechanisms	8,701	4.490	0.009070
111	Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology	5,029	4.481	0.005160
112	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY	30,567	4.429	0.029020
113	NITRIC OXIDE-BIOLOGY AND CHEMISTRY	5,311	4.427	0.004610
114	ACS Chemical Neuroscience	10,120	4.418	0.015000
115	REDOX REPORT	2,130	4.412	0.000970
116	MOLECULES	88,952	4.411	0.094550
117	MOLECULAR IMMUNOLOGY	14,321	4.407	0.014030
118	BIOESSAYS	11,559	4.345	0.011680
119	CHROMOSOMA	3,633	4.316	0.003660
120	GLYCOBIOLOGY	9,067	4.313	0.007380
121	JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY	12,816	4.292	0.010960
122	MOLECULAR PHYLOGENETICS AND EVOLUTION	22,497	4.286	0.022160
123	ADDICTION BIOLOGY	5,483	4.280	0.006770
124	Journal of Genetics and Genomics	2,754	4.275	0.003760

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
125	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY	59,220	4.272	0.015540
126	EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS	12,623	4.246	0.017880
127	MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS	13,703	4.171	0.006820
128	JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY	2,365	4.158	0.002390
129	JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY	12,863	4.155	0.006590
130	FREE RADICAL RESEARCH	9,040	4.148	0.004220
131	FEBS LETTERS	54,620	4.124	0.021530
132	BIOCHIMIE	13,342	4.079	0.010720
133	PLANT MOLECULAR BIOLOGY	17,172	4.076	0.007630
134	PHYTOCHEMISTRY	37,013	4.072	0.008470
135	BMC BIOCHEMISTRY	1,046	4.059	0.000310
136	ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS	26,354	4.013	0.011160
137	Frontiers in Bioscience-Landmark	10,370	4.009	0.004070
138	PROSTAGLANDINS LEUKOTRIENES AND ESSENTIAL FATTY ACIDS	5,083	4.006	0.003210
139	NEUROCHEMICAL RESEARCH	12,688	3.996	0.010650
140	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOENERGETICS	15,151	3.991	0.009950
141	PROTEOMICS	15,553	3.984	0.013400
142	PHOTOCHEMICAL & PHOTOBIOLOGICAL SCIENCES	8,582	3.982	0.006820
143	PESTICIDE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY	7,806	3.963	0.005790
144	Prion	1,413	3.931	0.001410
145	NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL	10,823	3.921	0.008090

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
146	BIOLOGICAL CHEMISTRY	7,481	3.915	0.005820
147	IUBMB LIFE	7,555	3.885	0.005160
148	Lipids in Health and Disease	8,243	3.876	0.009190
149	CYTOKINE	13,407	3.861	0.014280
150	BIOCHEMICAL JOURNAL	52,811	3.857	0.018710
151	JOURNAL OF TRACE ELEMENTS IN MEDICINE AND BIOLOGY	5,977	3.849	0.005610
152	ACTA BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA SINICA	4,903	3.848	0.004370
153	BIOSCIENCE REPORTS	10,164	3.840	0.014780
154	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-GENERAL SUBJECTS	17,653	3.770	0.013400
155	PROCESS BIOCHEMISTRY	21,378	3.757	0.008360
156	PROTEINS-STRUCTURE FUNCTION AND BIOINFORMATICS	16,929	3.756	0.009460
157	PEPTIDES	11,944	3.750	0.005380
158	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOMEMBRANES	21,203	3.747	0.014250
159	Molecular Omics	301	3.743	0.000660
160	BIOLOGICAL TRACE ELEMENT RESEARCH	13,562	3.738	0.007330
161	CURRENT DRUG METABOLISM	4,774	3.731	0.002910
162	JOURNAL OF COMPUTER-AIDED MOLECULAR DESIGN	5,890	3.686	0.003470
163	CELL BIOCHEMISTRY AND FUNCTION	3,108	3.685	0.001900
164	PROGRESS IN BIOPHYSICS & MOLECULAR BIOLOGY	4,668	3.667	0.003870
165	JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH	1,806	3.648	0.000850
166	JOURNAL OF BIOCHEMICAL AND MOLECULAR TOXICOLOGY	3,313	3.642	0.002620

Druckexemplar der Publikation 2

Mehl S, **Sun Q**, Görlich CL, Hackler J, Kopp JF, Renko K, Mittag J, Schwerdtle T, Schomburg L.

Cross-sectional analysis of trace element status in thyroid disease. *J Trace Elem Med Biol.* 2020 Mar;58:126430. doi: 10.1016/j.jtemb.2019.126430. Epub 2019 Nov 6. PMID: 31835129.

<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.126430>

Auszug aus der Journal Summary List (Publikation 3)

Kryczyk-Koziół J, Zagrodzki P, Prochownik E, Błażewska-Gruszczyk A, Słowiaczek M, **Sun Q**, Schomburg L, Ochab E, Bartyzel M.

Positive effects of selenium supplementation in women with newly diagnosed Hashimoto's thyroiditis in an area with low selenium status.

Int J Clin Pract. 2021 Sep;75(9):e14484. doi: 10.1111/ijcp.14484. Epub 2021 Jun 30.

PMID: 34107151.

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2020** Selected Editions: SCIE, SSCI
 Selected Categories: **"MEDICINE, GENERAL and INTERNAL"**
 Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 168 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE	464,351	91.245	0.631180
2	LANCET	369,601	79.321	0.445240
3	JAMA-JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION	224,147	56.272	0.279750
4	Nature Reviews Disease Primers	14,221	52.329	0.043550
5	BMJ-British Medical Journal	158,747	39.890	0.150630
6	ANNALS OF INTERNAL MEDICINE	72,588	25.391	0.082030
7	Lancet Digital Health	1,260	24.519	0.003000
8	JAMA Internal Medicine	25,002	21.873	0.077060
9	Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle	5,908	12.910	0.009440
10	PLOS MEDICINE	42,445	11.069	0.061920
11	Cochrane Database of Systematic Reviews	81,212	9.266	0.121830
12	JOURNAL OF INTERNAL MEDICINE	13,801	8.989	0.011960
13	BMC Medicine	20,511	8.775	0.040120
14	JOURNAL OF TRAVEL MEDICINE	5,260	8.490	0.004900
15	JAMA Network Open	12,653	8.483	0.039940
16	CANADIAN MEDICAL ASSOCIATION JOURNAL	19,683	8.262	0.014960
17	MEDICAL JOURNAL OF AUSTRALIA	14,127	7.738	0.011150
18	MAYO CLINIC PROCEEDINGS	20,504	7.616	0.025820

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
19	AMYLOID-JOURNAL OF PROTEIN FOLDING DISORDERS	2,202	7.141	0.003280
20	Translational Research	5,766	7.012	0.007980
21	Deutsches Arzteblatt International	6,542	5.594	0.007550
22	MEDICAL CLINICS OF NORTH AMERICA	4,487	5.456	0.005110
23	BRITISH JOURNAL OF GENERAL PRACTICE	8,303	5.386	0.009300
24	JOURNAL OF THE ROYAL SOCIETY OF MEDICINE	4,981	5.344	0.002310
25	PANMINERVA MEDICA	1,003	5.197	0.000930
26	ANNALS OF FAMILY MEDICINE	6,770	5.166	0.009280
27	JOURNAL OF GENERAL INTERNAL MEDICINE	26,727	5.128	0.028950
28	Frontiers in Medicine	6,143	5.091	0.013050
29	AMERICAN JOURNAL OF PREVENTIVE MEDICINE	28,400	5.043	0.037310
30	AMERICAN JOURNAL OF MEDICINE	29,186	4.965	0.021220
31	Journal of Personalized Medicine	1,071	4.945	0.002290
32	MINERVA MEDICA	1,338	4.806	0.001280
33	PALLIATIVE MEDICINE	7,332	4.762	0.009100
34	ANNALS OF MEDICINE	5,619	4.709	0.004060
35	EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION	8,197	4.686	0.005980
36	AMERICAN JOURNAL OF CHINESE MEDICINE	4,572	4.667	0.003020
37	European Journal of Internal Medicine	7,083	4.487	0.009330

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
38	BRITISH MEDICAL BULLETIN	5,494	4.291	0.003290
39	Journal of Clinical Medicine	21,502	4.241	0.031360
40	PREVENTIVE MEDICINE	20,705	4.018	0.028980
41	POSTGRADUATE MEDICINE	3,169	3.840	0.003850
42	DM DISEASE-A-MONTH	951	3.800	0.000600
43	PAIN MEDICINE	10,086	3.750	0.012300
44	International Journal of Medical Sciences	5,677	3.738	0.005680
45	Diagnostics	2,557	3.706	0.003180
46	JOURNAL OF URBAN HEALTH-BULLETIN OF THE NEW YORK ACADEMY OF MEDICINE	5,637	3.671	0.005810
47	JOURNAL OF PAIN AND SYMPTOM MANAGEMENT	15,063	3.612	0.015920
48	Journal of Translational Internal Medicine	457	3.451	0.000990
49	Internal and Emergency Medicine	3,446	3.397	0.004890
50	Military Medical Research	2,279	3.329	0.001380
51	Archives of Medical Science	4,209	3.318	0.005000
52	AMERICAN FAMILY PHYSICIAN	9,415	3.292	0.007180
53	JOURNAL OF THE FORMOSAN MEDICAL ASSOCIATION	5,341	3.282	0.005130
54	Polish Archives of Internal Medicine-Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej	1,933	3.277	0.002150
55	CANADIAN FAMILY PHYSICIAN	4,641	3.275	0.005350
56	QJM-AN INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICINE	7,086	3.210	0.003550

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
57	Journal of Hospital Medicine	4,166	2.960	0.008690
58	PRIMARY CARE	1,726	2.907	0.002090
59	JOURNAL OF INVESTIGATIVE MEDICINE	2,534	2.895	0.003120
60	KOREAN JOURNAL OF INTERNAL MEDICINE	3,042	2.884	0.004360
61	YONSEI MEDICAL JOURNAL	5,198	2.759	0.005250
62	Journal of the Chinese Medical Association	3,223	2.743	0.003190
63	Patient Preference and Adherence	4,927	2.711	0.009280
64	BMJ Open	55,068	2.692	0.145190
65	JOURNAL OF WOMENS HEALTH	7,434	2.681	0.009260
66	CLINICAL MEDICINE	3,101	2.659	0.003820
67	Journal of the American Board of Family Medicine	4,215	2.657	0.005770
68	CHINESE MEDICAL JOURNAL	11,843	2.628	0.010030
69	SCANDINAVIAN JOURNAL OF PRIMARY HEALTH CARE	1,842	2.581	0.001840
70	CURRENT MEDICAL RESEARCH AND OPINION	8,352	2.580	0.008310
71	International Journal of Evidence-Based Healthcare	1,721	2.548	0.003700
72	Systematic Reviews	7,616	2.522	0.019400
73	INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL PRACTICE	6,299	2.503	0.004300
74	BMC Family Practice	5,727	2.497	0.008090
75	Sexual Medicine	719	2.491	0.001430
76	ANNALS ACADEMY OF MEDICINE SINGAPORE	3,627	2.473	0.001170

Druckexemplar der Publikation 3

Kryczyk-Koziół J, Zagrodzki P, Prochownik E, Błażewska-Gruszczyk A, Słowiaczek M, **Sun Q**, Schomburg L, Ochab E, Bartyzel M.

Positive effects of selenium supplementation in women with newly diagnosed Hashimoto's thyroiditis in an area with low selenium status.

Int J Clin Pract. 2021 Sep;75(9):e14484. doi: 10.1111/ijcp.14484. Epub 2021 Jun 30.

PMID: 34107151.

<https://doi.org/10.1111/ijcp.14484>

Lebenslauf

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

Komplette Publikationsliste

- 1: Demircan K, **Sun Q**, Bengtsson Y, Seemann P, Vallon-Christersson J, Malmberg M, Saal LH, Rydén L, Minich WB, Borg Å, Manjer J, Schomburg L. Autoimmunity to selenoprotein P predicts breast cancer recurrence. *Redox Biol.* 2022 Jul;53:102346. doi: 10.1016/j.redox.2022.102346. Epub 2022 May 25. PMID: 35636018; PMCID: PMC9157254. (Impact Factor: 11.799 (2020))
- 2: Görlich CL, **Sun Q**, Roggenkamp V, Hackler J, Mehl S, Minich WB, Kaindl AM, Schomburg L. Selenium Status in Paediatric Patients with Neurodevelopmental Diseases. *Nutrients.* 2022 Jun 8;14(12):2375. doi: 10.3390/nu14122375. PMID: 35745104. (Impact Factor: 5.717 (2020))
- 3: Demircan K, Chillon TS, **Sun Q**, Heller RA, Klingenberg GJ, Hirschbil-Bremer IM, Seemann P, Diegmann J, Bachmann M, Moghaddam A, Schomburg L. Humoral immuneresponse to COVID-19 mRNA vaccination in relation to selenium status. *Redox Biol.* 2022 Apr;50:102242. doi: 10.1016/j.redox.2022.102242. Epub 2022 Feb 3. PMID: 35139480; PMCID: PMC8810594. (Impact Factor: 11.799 (2020))
- 4: **Sun Q**, Mehl S, Renko K, Seemann P, Görlich CL, Hackler J, Minich WB, Kahaly GJ, Schomburg L. Natural Autoimmunity to Selenoprotein P Impairs Selenium Transport in Hashimoto's Thyroiditis. *Int J Mol Sci.* 2021 Dec 3;22(23):13088. doi: 10.3390/ijms222313088. PMID: 34884891; PMCID: PMC8658221. (Impact Factor: 5.924 (2020))
- 5: Schmalbrock LJ, Weiss G, Rijntjes E, Reinschissler N, **Sun Q**, Schenk M, Schomburg L. Pronounced Trace Element Variation in Follicular Fluids of Subfertile Women Undergoing Assisted Reproduction. *Nutrients.* 2021 Nov 19;13(11):4134. doi: 10.3390/nu13114134. PMID: 34836389; PMCID: PMC8619388. (Impact Factor: 5.717 (2020))
- 6: Du Laing G, Petrovic M, Lachat C, De Boevre M, Klingenberg GJ, **Sun Q**, De Saeger S, De Clercq J, Ide L, Vandekerckhove L, Schomburg L. Course and Survival of COVID-19 Patients with Comorbidities in Relation to the Trace Element Status at Hospital Admission. *Nutrients.* 2021 Sep 22;13(10):3304. doi: 10.3390/nu13103304. PMID: 34684306; PMCID: PMC8541297. (Impact Factor: 5.717 (2020))

7: Demircan K, Bengtsson Y, **Sun Q**, Brange A, Vallon-Christersson J, Rijntjes E, Malmberg M, Saal LH, Rydén L, Borg Å, Manjer J, Schomburg L. Serum selenium, selenoprotein P and glutathione peroxidase 3 as predictors of mortality and recurrence following breast cancer diagnosis: A multicentre cohort study. *Redox Biol.* 2021 Nov;47:102145. doi: 10.1016/j.redox.2021.102145. Epub 2021 Sep 21. PMID: 34563873; PMCID: PMC8476451. (Impact Factor: 11.799 (2020))

8: Kazi Tani LS, Gourlan AT, Dennouni-Medjati N, Telouk P, Dali-Sahi M, Harek Y, **Sun Q**, Hackler J, Belhadj M, Schomburg L, Charlet L. Copper Isotopes and Copper to Zinc Ratio as Possible Biomarkers for Thyroid Cancer. *Front Med (Lausanne).* 2021 Sep 8;8:698167. doi: 10.3389/fmed.2021.698167. PMID: 34568365; PMCID: PMC8455850. (Impact Factor: 5.091 (2020))

9: Pedaran M, Oelkrug R, **Sun Q**, Resch J, Schomburg L, Mittag J. Maternal Thyroid Hormone Programs Cardiovascular Functions in the Offspring. *Thyroid.* 2021 Sep;31(9):1424-1435. doi: 10.1089/thy.2021.0275. Epub 2021 Aug 25. PMID: 34269617. (Impact Factor: 6.568 (2020))

10: Notz Q, Herrmann J, Schlesinger T, Helmer P, Sudowe S, **Sun Q**, Hackler J, Roeder D, Lotz C, Meybohm P, Kranke P, Schomburg L, Stoppe C. Clinical Significance of Micronutrient Supplementation in Critically Ill COVID-19 Patients with Severe ARDS. *Nutrients.* 2021 Jun 20;13(6):2113. doi: 10.3390/nu13062113. PMID: 34203015; PMCID: PMC8235175. (Impact Factor: 5.717 (2020))

11: Seelig J, Heller RA, Haubruck P, **Sun Q**, Georg Klingenberg J, Hackler J, Crowell HL, Daniel V, Moghaddam A, Schomburg L, Biglari B. Selenium-Binding Protein 1 (SELENBP1) as Biomarker for Adverse Clinical Outcome After Traumatic Spinal Cord Injury. *Front Neurosci.* 2021 May 28;15:680240. doi: 10.3389/fnins.2021.680240. PMID: 34140879; PMCID: PMC8204909. (Impact Factor: 4.677 (2020))

12: Kryczyk-Kozioł J, Zagrodzki P, Prochownik E, Błażewska-Gruszczyk A, Słowiacek M, **Sun Q**, Schomburg L, Ochab E, Bartyzel M. Positive effects of selenium supplementation in women with newly diagnosed Hashimoto's thyroiditis in an area with low selenium status. *Int J Clin Pract.* 2021 Sep;75(9):e14484. doi: 10.1111/ijcp.14484. Epub 2021 Jun 30. PMID: 34107151. (Impact Factor: 2.503 (2020))

13: Hackler J, Heller RA, **Sun Q**, Schwarzer M, Diegmann J, Bachmann M, Moghaddam A, Schomburg L. Relation of Serum Copper Status to Survival in COVID-19. *Nutrients*. 2021 May 31;13(6):1898. doi: 10.3390/nu13061898. PMID: 34072977; PMCID: PMC8229409. (Impact Factor: 5.717 (2020))

14: Heller RA, Seelig J, Crowell HL, Pilz M, Haubruck P, **Sun Q**, Schomburg L, Daniel V, Moghaddam A, Biglari B. Predicting neurological recovery after traumatic spinal cord injury by time-resolved analysis of monocyte subsets. *Brain*. 2021 Nov 29;144(10):3159-3174. doi: 10.1093/brain/awab203. PMID: 34022039. (Impact Factor: 13.501 (2020))

15: Gül-Klein S, Haxhiraj D, Seelig J, Kästner A, Hackler J, **Sun Q**, Heller RA, Lachmann N, Pratschke J, Schmelzle M, Schomburg L. Serum Selenium Status as a Diagnostic Marker for the Prognosis of Liver Transplantation. *Nutrients*. 2021 Feb 14;13(2):619. doi: 10.3390/nu13020619. PMID: 33672988; PMCID: PMC7918136. (Impact Factor: 5.717 (2020))

16: Belhadj M, Kazi Tani LS, Dennouni Medjati N, Harek Y, Dali Sahi M, **Sun Q**, Heller R, Behar A, Charlet L, Schomburg L. Se Status Prediction by Food Intake as Compared to Circulating Biomarkers in a West Algerian Population. *Nutrients*. 2020 Nov 24;12(12):3599. doi: 10.3390/nu12123599. PMID: 33255224; PMCID: PMC7760749. (Impact Factor: 5.717 (2020))

17: Heller RA, **Sun Q**, Hackler J, Seelig J, Seibert L, Cherkezov A, Minich WB, Seemann P, Diegmann J, Pilz M, Bachmann M, Ranjbar A, Moghaddam A, Schomburg L. Prediction of survival odds in COVID-19 by zinc, age and selenoprotein P as composite biomarker. *Redox Biol*. 2021 Jan;38:101764. doi: 10.1016/j.redox.2020.101764. Epub 2020 Oct 20. PMID: 33126054; PMCID: PMC7574778. (Impact Factor: 11.799 (2020))

18: Moghaddam A, Heller RA, **Sun Q**, Seelig J, Cherkezov A, Seibert L, Hackler J, Seemann P, Diegmann J, Pilz M, Bachmann M, Minich WB, Schomburg L. Selenium Deficiency Is Associated with Mortality Risk from COVID-19. *Nutrients*. 2020 Jul 16;12(7):2098. doi: 10.3390/nu12072098. PMID: 32708526; PMCID: PMC7400921. (Impact Factor: 5.717 (2020))

19: **Sun Q**, Hackler J, Hilger J, Gluschke H, Muric A, Simmons S, Schomburg L, Siegert E. Selenium and Copper as Biomarkers for Pulmonary Arterial Hypertension in Systemic Sclerosis.

Nutrients. 2020 Jun 25;12(6):1894. doi: 10.3390/nu12061894. PMID: 32630589; PMCID: PMC7353414. (Impact Factor: 5.717 (2020))

20: Heller RA, Sperl A, Seelig J, Haubruck P, Bock T, Werner T, Besseling A, **Sun Q**, Schomburg L, Moghaddam A, Biglari B. Zinc Concentration Dynamics Indicate Neurological Impairment Odds after Traumatic Spinal Cord Injury. *Antioxidants (Basel)*. 2020 May 13;9(5):421. doi: 10.3390/antiox9050421. PMID: 32414139; PMCID: PMC7278606. (Impact Factor: 6.312 (2020))

21: Brodin O, Hackler J, Misra S, Wendt S, **Sun Q**, Laaf E, Stoppe C, Björnstedt M, Schomburg L. Selenoprotein P as Biomarker of Selenium Status in Clinical Trials with Therapeutic Dosages of Selenite. *Nutrients*. 2020 Apr 12;12(4):1067. doi: 10.3390/nu12041067. PMID: 32290626; PMCID: PMC7230801. (Impact Factor: 5.717 (2020))

22: Gachkar S, Oelkrug R, Herrmann B, Scanlan TS, **Sun Q**, Biebermann H, Hoefig CS, Schomburg L, Mittag J. N- and O-Acetylated 3-Iodothyronamines Have No Metabolic or Thermogenic Effects in Male Mice. *Eur Thyroid J*. 2020 Feb;9(2):57-66. doi: 10.1159/000504887. Epub 2019 Dec 20. PMID: 32257954; PMCID:PMC7109410. (Impact Factor: 4.209 (2020))

23: Mehl S, **Sun Q**, Görlich CL, Hackler J, Kopp JF, Renko K, Mittag J, Schwerdtle T, Schomburg L. Cross-sectional analysis of trace element status in thyroid disease. *J Trace Elem Med Biol*. 2020 Mar;58:126430. doi: 10.1016/j.jtemb.2019.126430. Epub 2019 Nov 6. PMID: 31835129. (Impact Factor: 3.849 (2020))

Danksagung

Es gibt viele Menschen, die mir die Vollendung meiner Promotion ermöglichten, bei denen ich mich ganz herzlich bedanken möchte.

An erster Stelle geht ein großes Dankeschön an meinen Doktorvater Prof. Dr. Lutz Schomburg für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe promovieren zu dürfen, die anspruchsvolle und interessante Promotions-Thematik und die beste Betreuung! Lieber Lutz, vielen Dank für das Vertrauen und die ausnahmslose Unterstützung. Du hast mir nicht nur die Tür zu Wissenschaftlicher Forschung geöffnet, sondern auch mich durch dein enormes Wissen, deine Leidenschaft und Positivität für die Forschung inspiriert.

Bei unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. George J. Kahaly aus der Universitätsmedizin Mainz, Prof. Zagrodski, Krakau, Polen, und Sebastian Mehl, Berlin, möchte ich mich herzlich bedanken für die Unterstützung in der Anlegung und Organisation der Serumdatenbanken und für den gelungenen Austausch von Daten und Ergebnissen, und ebenso bedanke ich mich bei den Patienten und medizinischen Mitarbeitern, die zu der Probengewinnung und Fertigstellung der wissenschaftlichen Untersuchungen beigetragen haben.

Von Herzen danke ich allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Endokrinologie für die einmalig tolle Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft. Ganz besonderen Dank an Julian und Vartiter, die mich fast die ganze Arbeitszeit der Promotion begleitet haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten. Herzlichen Dank an Dr. Waldemar B. Minich für die Einführung in die Welt der Autoantikörper sowie Dr. Kostja Renko für die Einführung in die GPX-Aktivität Messung. Bei Anja und Gaby bedanke ich mich für die tatkräftige Unterstützung im Laboralltag und die so viel schöne gemeinsame Mittagszeit, sowie Thilo und Kamil für die zahlreichen anregenden und konstruktiven Diskussionen. Noch möchte ich mich hier herzlich bedanken an unseren ehemaligen Arbeitskolleginnen, Dr. Carolin Dinjer, Dr. Janine Differ und Katja Schreiber, die mich in der Anfangsphase meiner Promotion sehr viel unterstützt und motiviert haben. Vielen Dank für die tolle gemeinsame Zeit mit euch allen!

Am Ende möchte ich die Gelegenheit nutzen, hier besonders meiner Familie und meinen Freunden zu danken. Meinen Eltern, meinem Mann und auch meinen beiden Töchtern möchte ich herzlich danken für ihre bedingungslose Unterstützung in jeder Hinsicht,

sowie meinen Freunden danke ich für die stetige Motivation, Ablenkung und emotionale Unterstützung. Ohne eure Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen – Ihr seid die Besten!