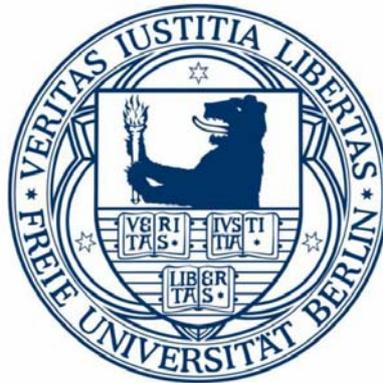


Der Einfluss von Selen und Geschlecht auf Knochenentwicklung und Knochenhomöostase

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades der
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von
Antonia Hög
Berlin, Juni 2013

Die experimentelle Arbeit für die vorliegende Dissertation wurde zwischen November 2007 und Juni 2013 am Institut für Experimentelle Endokrinologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Direktor Prof. Dr. Josef Köhrle, unter der Leitung von Prof. Dr. Lutz Schomburg angefertigt.

Berlin, Juni 2013

1. Gutachterin: Prof. Dr. Petra Knaus (FU Berlin)
 2. Gutachter: Prof. Dr. Lutz Schomburg (Charité Berlin)
- Disputation am 03.02.2014

Diese Arbeit wurde finanziert durch die Deutsche
Forschungsgemeinschaft.



Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Selen und seine biologische Bedeutung	1
1.1.1	Entdeckung und chemische Eigenschaften.....	1
1.1.2	Selen und seine Rezeption.....	1
1.1.3	Selenvorkommen und -aufnahme.....	1
1.1.4	Selenstoffwechsel.....	3
1.1.5	Selen und seine medizinische Bedeutung.....	5
1.2	Selenoproteine	6
1.2.1	Allgemeines	6
1.2.2	Se-bindende Proteine	6
1.2.3	SeMet-haltige Proteine	6
1.2.4	Sec-haltige Proteine	7
1.2.5	Biosynthese von Selenoproteinen	9
1.2.6	Geschlechtsspezifische Expression von Selenoproteinen	12
1.3	Die <i>SepP</i> -KO-Maus	13
1.3.1	Selenoprotein P	13
1.3.2	Die <i>SepP</i> -Knockout-Maus	14
1.4	Knochen und Selen	14
1.4.1	Knochenmetabolismus	14
1.4.2	Knochenendokrinologie	21
1.4.3	Selen, Selenoproteine und ihre Bedeutung für Knochen.....	33
2	Material und Methoden	38
2.1	Materialien	38
2.1.1	Geräte.....	38
2.1.2	Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmittel.....	39
2.1.3	Computerprogramme und Datenbanken	39
2.1.4	Oligonukleotide für die Genotypisierung.....	40
2.1.5	Oligonukleotide für Genexpressionsanalysen	40
2.1.6	Zelllinien.....	40
2.2	Zellkultur Methoden	41
2.2.1	Kryokonservierung von Zelllinien.....	41
2.2.2	Auftauen von Zelllinien	41
2.2.3	Passagieren von Zellen	41
2.2.4	Stimulation der Zellen	42
2.2.5	Murine <i>Micromass</i> Kultur	42
2.3	Tierexperimentelle Methoden	43

2.3.1	Haltung	43
2.3.2	Genotypisierung.....	43
2.3.3	Tötung und Probenentnahme	44
2.4	Molekularbiologische Methoden	45
2.4.1	Probenvorbereitung	45
2.4.2	RNA-Isolation.....	45
2.4.3	Quantitative Real-time PCR.....	46
2.5	Proteinbiochemische Methoden	48
2.5.1	Alkalische Phosphatase (ALP)	48
2.6	Histochemische Methoden	48
2.6.1	Alzian Blau-Färbung	48
2.6.2	Alkalische Phosphatase-Färbung (ALP-Färbung)	49
2.6.3	Hämatoxylin/Eosin-Färbung (HE-Färbung)	49
2.7	Knochenmorphologische Methoden	50
2.7.1	Micro-Computertomographie (μ CT).....	50
2.8	Serumanalytik.....	50
2.8.1	Das OPUS-Kollektiv.....	50
2.8.2	Bestimmung von Spurenelementen.....	51
2.8.3	SePP-Assay.....	51
2.9	Statistik	52
3	Zielsetzung der Arbeit	53
4	Ergebnisse	55
4.1	<i>In vitro</i> ist die Chondrogenese Se-abhängig.....	55
4.1.1	Murine Micromass-Zellkultur.....	55
4.1.2	Hepa1-6-Zellen	61
4.2	<i>In vivo</i> hat der Se-Status Einfluss auf die Knochenhomöostase	62
4.2.1	<i>SepP</i> -Knockout Mausmodell	62
4.2.2	Futtermessung.....	68
4.3	Der Se-Status ist im Menschen mit dem Knochenstoffwechsel assoziiert	85
4.3.1	Das OPUS-Kollektiv.....	85
4.3.2	Se Status und Schilddrüsenstatus.....	86
4.3.3	Se Status und Knochenparameter.....	88
4.3.4	Se-Status als Biomarker für das Frakturrisiko	92
5	Diskussion.....	96
5.1	Zur Se-Abhängigkeit der Chondrogenese <i>in vitro</i>	96
5.2	Zur Se-Abhängigkeit von Wachstum und Parametern des Knochenstoffwechsels im Tiermodell	99

5.3	OPUS-Kollektiv	103
5.4	Fazit und Ausblick	108
6	Zusammenfassung.....	111
7	Summary.....	113
8	Literatur	115
	Abkürzungsverzeichnis	134
	Abbildungsverzeichnis.....	137
	Tabellenverzeichnis.....	140
	Publikationen.....	141
	Lebenslauf.....	142
	Danksagung	143
	Erklärung	145

1 Einleitung

1.1 Selen und seine biologische Bedeutung

1.1.1 Entdeckung und chemische Eigenschaften

1817 entdeckte der schwedische Chemiker Jons Jakobs Berzelius (1779- 1848) bei der Untersuchung von Bleikammerschlamm ein silbrig glänzendes Element. Er benannte es nach der griechischen Mondgöttin Selene (Foster *et al.* 1997).

Selen (Se) zählt als drittes Element der sechsten Hauptgruppe neben Sauerstoff (O), Schwefel (S), Tellur (Te) und Polonium (Po) zu den so genannten Chalkogenen. Innerhalb dieser Hauptgruppe nehmen die metallischen Eigenschaften mit steigender Ordnungszahl zu, so dass Selen zu den Halbmetallen zählt. Die stabilste Modifikation des Elements ist das so genannte graue Selen (Barceloux 1999). Selen kommt in der Natur in den Oxidationsstufen –II, +IV und +VI vor (Wessjohann *et al.* 2007).

1.1.2 Selen und seine Rezeption

In höheren Konzentrationen wirken elementares Selen und seine Verbindungen stark toxisch auf den Organismus. Marco Polo war wahrscheinlich der erste, der von den toxischen Eigenschaften des Selens berichtete. Während seiner Reisen im 13. Jahrhundert beobachtete er in selenreichen Regionen Chinas bei Pferden eine Aufweichung der Hufe. Heute ist bekannt, dass es während einer so genannten Selenose bei Huftieren zu Haarausfall und Hufdystrophie kommt (O'Toole *et al.* 1995). Beim Menschen führt eine Selenintoxikation zu knoblauchartigem Atemgeruch, Müdigkeit, Erbrechen, Durchfällen, Veränderungen der Nägel, Haarausfall oder Fühlstörungen durch Schädigung der Nerven (Sutter *et al.* 2008).

Erst 1957 erkannten Schwarz und Foltz die essentielle Bedeutung von Selen für den Organismus. Sie konnten zeigen, dass die selenhaltige organische Verbindung Faktor 3 die Entstehung von Lebernekrosen in Nagern verhindern kann (Schwarz *et al.* 1958). 1973 wurde mit der Charakterisierung der Glutathionperoxidase durch Flohé erstmals Se als Bestandteil eines Enzyms nachgewiesen (Flohe *et al.* 1973). Seit diesen Entdeckungen hat sich die Wahrnehmung von Selen stark gewandelt. Das ehemals als toxisch und krebserregend angesehene Element ist heute als essentielles Spurenelement mit anti-karzinogenen und gesundheitsfördernden Eigenschaften bekannt.

1.1.3 Selenvorkommen und -aufnahme

Mit einer Konzentration von durchschnittlich 0,09 ppm steht Selen an Position 60 der in der Erdkruste vorkommenden Elemente. Der Selenanteil in der Erdkruste schwankt jedoch zwischen 0,1 - 2 mg Se/kg. In manchen extrem Se-reichen Böden steigt der Anteil bis auf 1200 mg/kg. Dadurch bedingen sich auch große Unterschiede in der täglichen Se-Zufuhr

Einleitung

durch die Nahrung.

Selen kommt im Boden hauptsächlich in anorganischer Form als Selenit, Selenat oder auch als elementares Selen vor. Der Anteil an organischen Selenverbindungen im Boden ist eher gering. Pflanzen sind jedoch in der Lage, anorganische Selenverbindungen in organische Selenverbindungen wie Selenocystein (Sec) und Selenomethionin (SeMet) umzuwandeln.

Die Bioverfügbarkeit für Pflanzen und damit der Eintritt von Selen in die Nahrungskette lässt sich allein anhand der Selenmenge im Boden jedoch nicht abschätzen (Barceloux 1999). Manche Pflanzen, wie z.B. die Gattung *Astragalus* und *Oonopsis* akkumulieren leicht über 1000 mg Se/kg Pflanzenmaterial, wohingegen die meisten anderen Pflanzen deutlich weniger als 1 mg/kg Pflanzenmaterial enthalten (Tab. 1-1).

Der menschliche Organismus nimmt Selen über pflanzliche oder tierische Quellen auf. Die Bioverfügbarkeit organischer Verbindungen liegt für den Menschen bei rund 90%. Anorganische Verbindungen spielen in der menschlichen Ernährung normalerweise nur in Form von Supplementen eine Rolle, und diese werden lediglich zu 60% resorbiert (Barceloux 1999).

Die Resorption von Selenverbindungen erfolgt hauptsächlich im oberen Dünndarm (Young *et al.* 1982). In der Forschung konnte lange kein Unterschied zwischen der Aufnahme anorganischer (Natriumselenit und -selenat) und organischer Selenverbindungen (z.B. selenhaltigen Aminosäuren und ihre Derivate) festgestellt werden. Später wurde jedoch bewiesen, dass organische Selenverbindungen besser resorbiert werden als anorganische. Swanson zeigte, dass ca 97% einer Dosis SeMet, aber nur 87% einer Dosis Selenit von Probanden resorbiert wurde (Swanson *et al.* 1991). Bei Moser-Veillon betrug der Anteil des gastrointestinal resorbierten Selenits sogar nur 25- 43 % im Vergleich zu 85% resorbierten SeMets (Moser-Veillon *et al.* 1992).

Durch den variablen Selengehalt der Nahrung ergeben sich weltweit große Unterschiede in der täglichen Selenzufuhr. In Tab. 1-1 ist der Selengehalt einiger Nahrungsmittel dargestellt, die Studienergebnisse zur täglichen Selenversorgung der Weltbevölkerung sind in Tab. 1-2 zusammengefasst.

Tab. 1-1: Se-Gehalt verschiedener Nahrungsmittel in verschiedenen Ländern ([ng/g Frischgewicht] mod. nach WHO-Bericht (WHO 1998))

Nahrungsmittel	Indien	USA	Internationaler Bereich
Getreide und Getreideprodukte	5 - 95	10 - 370	10 - 550
Fleisch, Fleischprodukte und Eier	40 - 120	100 - 810	10 - 360
Fisch und Meeresfrüchte	280 - 1080	400 - 1500	110 - 970
Hülsenfrüchte	10 - 138		
Molkereiprodukte	5 - 15	10 - 130	1 - 170
Obst und Gemüse	1 - 7	1 - 60	1 - 20

Tab. 1-2 Geographische Unterschiede in der täglichen Se-Aufnahme von Erwachsenen(mod .nach WHO-Bericht (WHO 1998)

Land bzw. Region	Se-Aufnahme [microg/Tag]
Kanada	98,0 – 224,0
China (Kashin Beck-Gebiet)	2,6 – 5,0
China (Keshan-Gebiet)	3,0 – 11,
China	13,3 ± 3,1
China (Se-reiche Gebiete)	1338,0
Finnland (vor staatlich verordneter Se-Supplementation)	26,0
Finnland(nach staatlich verordneter Se-Supplementation)	56,0
Frankreich	47,0
Deutschland	38,0 – 48,0
Indien (normale Diät)	48,0
Indien (vegetarische Diät)	27,0
Italien	41,0
Neuseeland (Se-arme Gebiete)	11,0 ± 3,0
Slowakei	27,0
Schweden (vegane Ernährungsweise)	10,0
Schweden (konventionelle Ernährungsweise)	40,0 ± 4,0
Großbritannien	33,0 (Referenz 45)
USA	80,0 ± 37,0
USA (Männer)	90,0 ± 14,0
USA (Frauen)	74,0 ± 12,0
USA (Se-reiche Gebiete)	216,0
Venezuela	80,0 – 500,0

Der WHO-Bericht geht auch auf unterschiedliche Ernährungsweisen und Geschlechterdifferenzen ein. Interessant sind hier vor allem die dokumentierten Unterschiede zwischen konventioneller oder vegetarischer Ernährungsweise (Abdulla *et al.* 1989; Mahalingam *et al.* 1997).

Hoeflich *et al.* konnten in ihrer veröffentlichten Studie von 2010 zeigen, dass eine vegetarische Ernährungsweise nicht zwangsläufig zu einem funktionalen Selenmangel führt. Die Einordnung des Selenstatus hängt hingegen von der Wahl des Biomarkers ab (Hoeflich *et al.* 2010)

1.1.4 Selenstoffwechsel

Selen wird entweder als Bestandteil organischer Verbindungen oder in anorganischer Form, durch Nahrungssupplemente, aufgenommen. Verstoffwechselt werden vor allem Selenomethionin (SeMet), Selenocystein (Sec), Selenit und Selenat.

Einleitung

Die biochemischen Mechanismen der Selenaufnahme unterscheiden sich dementsprechend. SeMet teilt sich mit seinem Schwefeläquivalent Met den gleichen Transporter; Sec hingegen wird über einen Transporter aufgenommen, der normalerweise basische Aminosäuren transportiert. Beide Selenverbindungen werden durch einen aktiven Transport in die Zelle eingeschleust (Barceloux 1999). Die anorganische Verbindung Selenit wird mit Hilfe von Thiolen wie L-Cystein oder Glutathion über Aminosäure-Carrier resorbiert. Selenat verwendet hingegen einen Na⁺/Selenat-Cotransport-Mechanismus und gelangt durch einen Selenat/OH-Austauschmechanismus in die Zelle (Barceloux 1999).

SeMet kann direkt für die Synthese SeMet-haltiger Proteine eingesetzt oder in Sec umgewandelt werden. Sec wird dagegen nicht direkt zur Proteinbiosynthese verwendet sondern in einem ersten Schritt mittels der L-Selenocystein-β-Lyase zu Selenid reduziert, mittels ATP aktiviert und kann anschließend auf einen Seryl-Rest einer tRNA transferiert werden. Diese Sec-tRNA dient im Folgenden zur Translation des Sec-spezifischen UGA-Codons der mRNA (Allmang *et al.* 2006).

Liegt ein Selenüberschuss vor und wird demzufolge nicht alles Selenid zur Proteinbiosynthese verwendet, muss dieses weiter umgewandelt werden, da Selenwasserstoff als eine der giftigsten Se-Verbindungen gilt. Die nach der Entgiftung, durch Methylierung des Selenids, entstehenden Verbindungen Dimethylselenid und Trimethylselenonium-Ionen sind weniger giftig für den Organismus. Dimethylselenid ist leicht flüchtig und wird abgeatmet, wobei es zu einem charakteristischen Knoblauchgeruch kommt. Das Trimethylselenonium-Ion kann über den Urin ausgeschieden werden. Bei normaler Se-Versorgung kann Selenid auch in Selenozucker, z.B. 1β-Methylseleno-N-acetyl-D-galactosamin entsorgt werden. In Abb. 1.1 ist der Se-Stoffwechsel graphisch veranschaulicht.

Die anorganischen Se-Verbindungen sind Vorstufen für die Sec-Synthese, wobei Selenat umgehend in das stabilere Selenit umgewandelt wird. Selenit wiederum wird direkt in den Epithelzellen der Mukosa oder nach Transport in die Leber reduziert, um nach Phosphorylierung in den Biosyntheseweg von Selenoproteinen eingeschleust zu werden.

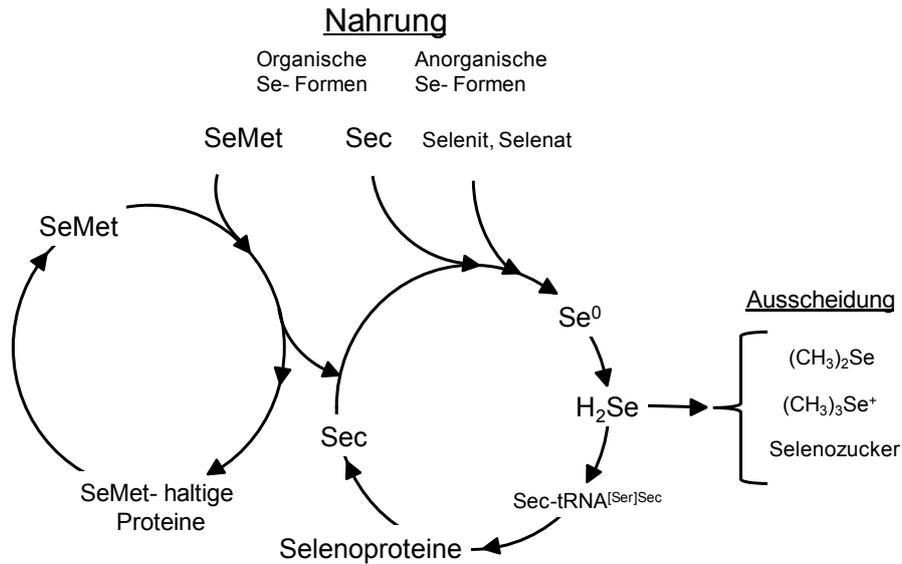


Abb. 1.1 Schematische Darstellung des Se-Stoffwechsels. Se kann in Form von SeMet direkt in SeMet-haltige Proteine eingebaut werden. Durch die Nahrung aufgenommenes Sec und die anorganischen Se-Formen Selenit und Selenat werden schrittweise zu Selenid (H₂Se) reduziert und anschließend auf die spezifische Sec-tRNA^{[Ser]Sec} geladen, von der aus sie dann in Selenoproteine eingebaut werden können. Überschüssiges Se wird in Form von Methylselenverbindungen und/oder als Selenozucker ausgeschieden. (Hoefig *et al.*)

1.1.5 Selen und seine medizinische Bedeutung

Mitte der 90er Jahre wurde in der so genannten Nutritional Prevention of Cancer (NPC) Studie (Clark *et al.* 1996) dargestellt, dass eine Supplementation mit Selen das Risiko für Krebserkrankungen verringern kann. Entscheidend für eine positive Wirkung von Selen scheint hier nicht die unmittelbare Gabe bei Krankheitsausbruch zu sein, sondern vielmehr der Selenstatus im Organismus vor Krankheitsausbruch.

Die Empfehlung der WHO für die tägliche Aufnahme beträgt zwischen 40 µg/Tag für erwachsene Männer bzw. 30 µg/Tag für erwachsene Frauen. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) gibt in ihren DACH-Referenzwerten für den Se-Bedarf in Deutschland einen Schätzwert von 30- 70 µg/Tag an (DGE). Liegt die tägliche Zufuhr im Mittel unterhalb von 20 µg/Tag, so spricht man von einer Mangelversorgung. Diese tritt vor allem in bestimmten Gebieten Chinas auf und stellt einen wichtigen Risikofaktor für die Ausbildung der Keshan-Krankheit, einer Kardiomyopathie und der Kashin-Beck-Krankheit, einer degenerativen Knorpelentzündung, dar (Beck 2001; Levander *et al.* 1997). In beiden Fällen scheint die Unterversorgung mit Selen allerdings nur eine von mehreren Voraussetzungen für den Ausbruch der Krankheit zu sein (Beck *et al.* 2003; Sudre *et al.* 2001).

Sowohl Se-Mangel als auch Se-Intoxikation führen zu schwerwiegenden Symptomen. Die Symptome einer Se-Vergiftung können ab einer täglichen Aufnahme von 800 µg auftreten und beinhalten Haarausfall, Müdigkeit und Depression (MacFarquhar *et al.* 2010).

1.2 Selenoproteine

1.2.1 Allgemeines

Man unterscheidet drei Arten Se-haltiger Proteine: Se-bindende Proteine, SeMet-haltige Proteine und Sec-haltige Proteine. Nur letztere werden als Selenoproteine bezeichnet (Burk *et al.* 2001). Grundsätzlich gilt, dass in SeMet- und Sec-haltigen Proteinen die klassischen Schwefel-haltigen Aminosäuren Methionin (Met) und Cystein (Cys) durch ihre Se-Analoga SeMet und Sec ausgetauscht sind. Dies führt zu veränderten biochemischen Eigenschaften, was vor allem in Selenoproteinen mit enzymatischer Bedeutung eine große Rolle spielt. So liegt der pK_a -Wert von Se bei 5,2 und ist deutlich niedriger als der pK_a -Wert von Schwefel ($pK_a = 8,3$) (Wessjohann *et al.* 2007). Sec liegt deshalb bei physiologischem pH-Wert meist als Anion (Selenolat) und Cys in protonierter Form vor. Daraus folgt eine bedeutend höhere Reaktivität von SeH-Funktionen, da die Nucleophilie der Selenolatfunktion bedeutend stärker ist als die des Thiols (Johansson *et al.* 2005).

1.2.2 Se-bindende Proteine

Die Gruppe der Se-bindenden Proteine wurde bisher nur wenig untersucht. Entdeckt wurden diese Proteine durch radioaktive Markierungsversuche mit Se-Isotopen. Im Menschen konnten bisher zwei Se-bindende Proteine (SeBP1 und FABP1) identifiziert werden. Ihre genaue Funktion im Se-Stoffwechsel ist jedoch nicht genau geklärt, allerdings konnte eine Regulation in verschiedenen pathologischen Zuständen gezeigt werden (Alabi *et al.* 2000; Porat *et al.* 2000). Das Fettsäurebindende Protein 1 (FABP1) ist auch in der Lage Se zu binden und konnte in der Maus und im Menschen nachgewiesen werden. Dieses 14 kDa große Protein spielt nicht nur eine Rolle im Fettsäurestoffwechsel sondern nach neuesten Erkenntnissen auch bei der Regulation des Zellwachstums und der Gentranskription (Zimmerman *et al.* 2002).

1.2.3 SeMet-haltige Proteine

SeMet kann prinzipiell in alle Proteine eingebaut werden. Es wird allerdings nicht gezielt während der Translation in die wachsende Peptidkette eingebaut, sondern unspezifisch anstelle von Met. SeMet wird von der Met-spezifischen Aminoacyl-tRNA-Synthetase als Substrat erkannt, auf die tRNA geladen und an entsprechender Stelle (Codon AUG) anstelle von Met in die Polypeptidkette inseriert. Die Translationsmaschinerie unterscheidet nicht zwischen Met und SeMet, weshalb der Anteil an SeMet in einem Protein abhängig vom vorherrschenden SeMet/Met-Verhältnis ist. Bei hoher SeMet-Zufuhr kommt es daher zu einem verstärkten Einbau von SeMet in Proteine, wie z. B. Albumin. SeMet-haltige Proteine haben scheinbar keine bestimmte biologische Funktion (Daniels 1996). Allerdings kann aus ihnen SeMet freigesetzt und entsprechend des Met-Stoffwechsels durch Transsulfurierung Sec gebildet werden (siehe Abb. 1.1) (Sunde 1990).

1.2.4 Sec-haltige Proteine

Die eigentlichen Selenoproteine enthalten die 21. proteinogene Aminosäure Sec, die auf DNA-Ebene durch das TGA-Codon codiert wird. Selenoproteine werden durch wenige Gene codiert, ihre Biosynthese ist jedoch sehr komplex (siehe Abschnitt 1.2.5).

Im Menschen wurden bisher 25 für Selenoproteine codierende Gene (Kryukov *et al.* 2003) in Nagern 24 Gene (Gladyshev *et al.* 1999) und in *Drosophila* drei Gene (Martin-Romero *et al.* 2001) identifiziert. In einigen wenigen Organismen wie Hefen, oder auch manchen höheren Pflanzen konnten bisher keine Selenoproteine nachgewiesen werden.

In enzymatisch aktiven Selenoproteinen befindet sich Sec im aktiven Zentrum des Enzyms und ist direkt an Redoxreaktionen beteiligt (Jacob *et al.* 2003). Von einigen Selenoproteinen gibt es verschiedene Isozyme (z.B. drei Dejodase-Isozyme), wieder andere sind einzigartig. In Tab. 1-3 sind die humanen Selenoproteine und deren Funktionen zusammengestellt (Fairweather-Tait *et al.* 2011).

Tab. 1-3: Bekannte humane Selenoproteine und ihre Funktionen

Selenoprotein	Abkürzung	Funktion
Glutathionperoxidasen (Gpx): antioxidative Enzyme, Abbau von Hydroperoxiden		
cytosolische Glutathion-Peroxidase	GPx1, cGPx,	Peroxid-Abbau im Cytosol der Zellen aller Organe
gastrointestinale Glutathion-Peroxidase	GPx2, giGPx	Peroxid-Abbau im Magen-Darm-Trakt wichtig für Integrität der intestinalen Mukosa
plasmatische Glutathion-Peroxidase	GPx3, pGPx	in Niere synthetisiert, Peroxid-Abbau im Blut, Schutz der Schilddrüse durch Peroxid-Abbau
Phospholipid-Hydroperoxid Peroxidase	GPx4, PH-GPx	membranassoziiert, Abbau von Membranperoxiden, Fettsäuremetabolismus, Strukturprotein im reifen Spermium
Riechepithel-Glutathion-Peroxidase	GPx6	Peroxid-Abbau im Riechepithel und Embryo
Thioredoxin-Reduktasen (TrxR, TxnRd): Redoxenzyme mit breiter Substratspezifität		
cytosolische Thioredoxin-Reduktase	TrxR1, TxnRd1	Zellproliferation, Apoptose, Transkriptionskontrolle,
mitochondriale Thioredoxin-Reduktase	TrxR2, TxnRd2	essentiell für Kardiomyozyten
hodenspezifische Thioredoxin-Reduktase	TrxR3, TxnRd3	Kontrolle Redoxstatus im Hoden
Iodothyronin-Dejodasen (Dio): Aktivierung und Inaktivierung von Schilddrüsenhormonen		

Einleitung

5`-Iodothyronin Dejodase 1	Dio1	Aktivierung und Inaktivierung von Schilddrüsenhormonen in Schilddrüse, Leber, Niere usw., Bildung von T3 oder rT3 aus T4
5`-Iodothyronin Dejodase 2	Dio2	Aktivierung von Schilddrüsenhormonen hauptsächlich im Gehirn, Bildung T3
5 -Iodothyronin Dejodase 3	Dio3	Inaktivierung von Schilddrüsenhormonen, Bildung von T2 bzw. rT3 aus T3 bzw. T4
Einzigartige Selenoproteine		
Selenoprotein P	SepP	Se-Speicher- und –Transportprotein, potenzielle Funktion bei ER-Stress, Verbindung zu Glukose- und Insulinstoffwechsel
Selenophosphat-Synthetase 2	SPS2	Selenocysteinsynthese (Aktivierung von Se zu Selenophosphat)
Methionin-Sulfoxid-Reduktase B	MsrB, SelX	Redoxregulation (Reduktion von Methioninsulfoxid zu Methionin)
Selenoprotein N	SelN	Funktion während der Muskelregeneration und Muskelbildung
Selenoprotein S	SelS	Anti-inflammatorische Funktion während der Sepsis, Proteinfaltung im ER, Verbindung zu Glucose- und Insulinstoffwechsel
15 kDa Selenoprotein	Sel15	potenziell: Faltung von Glycoproteinen (Kasaikina <i>et al.</i> 2011)
SelK		potenziell: Kalziumhomöostase, Proteinfaltung (ERAD-pathway), Redoxhomöostase (Shchedrina <i>et al.</i> 2011)
SelH		potenziell: Redoxhomöostase, DNA-bindendes Protein, Glutathion-Biosynthese (Panee <i>et al.</i> 2007)
SelM		potenziell Redoxhomöostase vor allem im Gehirn, Kalziumhomöostase (Reeves <i>et al.</i> 2010)
SelW		potenziell: Regulation des Zellzyklus (Park <i>et al.</i> 2012)
SelT		potenziell: Redoxhomöostase (Moustafa <i>et al.</i> 2012)
SelV		potenziell: Redoxhomöostase und Funktion in Spermatogenese (Varlamova <i>et al.</i> 2012)
Sel I, O		genaue Funktion bisher unbekannt

1.2.5 Biosynthese von Selenoproteinen

Die Biosynthese von Selenoproteinen folgt einem einzigartigen Mechanismus und konnte in den letzten Jahren nahezu vollständig aufgeklärt werden (Hatfield *et al.* 2002). Eine Besonderheit des Translationsprozesses ist die Dekodierung des UGA-Codons als Sec. UGA steht normalerweise als Stoppcodon für das Ende der Translation.

Sowohl in Eu- als auch in Prokaryonten ist die Synthese einer Sec-tragenden tRNA ein wichtiger Schritt. Dekodierung und Synthese der Sec-tRNA geschehen mit Hilfe mehrerer *cis*- und *trans*- Faktoren. In Prokaryonten sind die beteiligten Faktoren jedoch teilweise in Multienzymkomplexen gebündelt.

Die Synthese der Sec-tragenden tRNA erfolgt über den Umweg der Seryl-tRNA, da im Gegensatz zu den klassischen 20 proteinogenen Aminosäuren nicht direkt eine tRNA mit Sec beladen werden kann (Hatfield *et al.* 2006). Es wird in einem ersten Schritt eine für das UGA-Codon spezifische tRNA mittels der Seryl-tRNA-Synthetase (SerS) unter ATP-Spaltung mit Ser beladen (Squires *et al.* 2008). Diese Seryl-tRNA kann von der Phosphoseryl-tRNA^{[Ser]Ser}-Kinase (PSTK) phosphoryliert und entsprechend aktiviert werden. Um nun den Phosphoseryl-Rest in einen Sec-Rest umzuwandeln, muss das sich im Se-Pool des Organismus befindliche Selenid (HSe^-) aktiviert werden. Diese Aktivierung (Phosphorylierung) liefert den Se-Donor Selenophosphat (SeP) und wird durch die Selenophosphat-Synthetase (SPS2) unter ATP-Verbrauch katalysiert. Die Phosphoseryl-tRNA^{[Ser]Ser} wiederum ist Substrat der Selenocystein-Synthase (SecS), die die Hydroxyl-Gruppe des Seryl-Restes durch das aktivierte Selenol ersetzt. Es entsteht die Selenocysteinyl-tRNA (tRNA^{[Ser]Sec}).

Einleitung

In Abb. 1.2 ist die Synthese der $tRNA^{[Ser]Sec}$ in Eukaryonten graphisch veranschaulicht (Xu *et al.* 2007). Mit Hilfe des 43 kDa RNA-bindenden Proteins Secp43 wird die $tRNA^{[Ser]Sec}$ vom Kern in das Zytoplasma und zurück transportiert und steht so der Translation der Selenoproteine zur Verfügung (Squires *et al.* 2008).

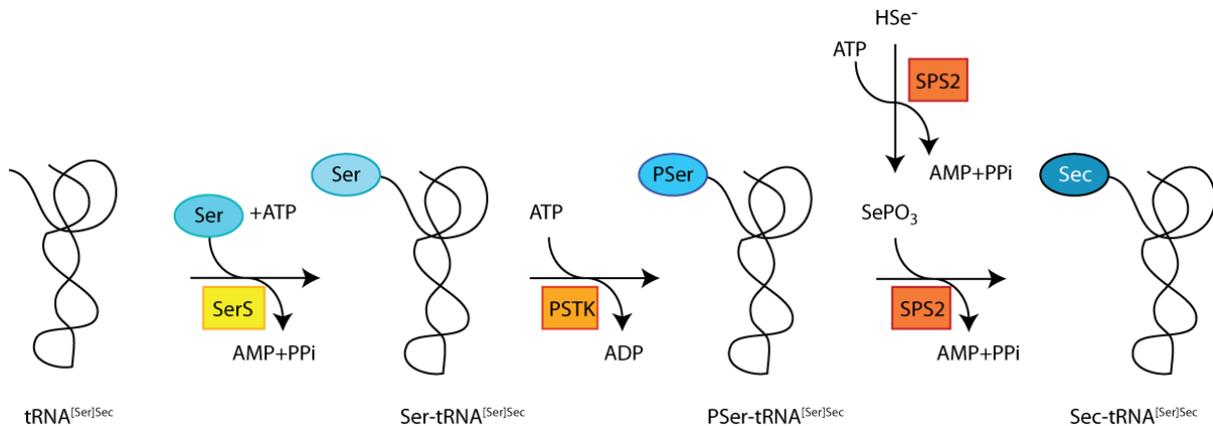


Abb. 1.2: $tRNA^{Ser}$ -Biosynthese in Eukaryonten (mod. Nach (Turanov *et al.* 2011)). Die Synthese der Sec-tragenden tRNA erfolgt über den Umweg der Seryl-tRNA. Dafür wird in einem ersten Schritt eine für das UGA-Codon spezifische tRNA mittels der Seryl-tRNA-Synthetase (SerS) unter ATP-Spaltung mit Ser beladen. Diese Seryl-tRNA kann von der Phosphoseryl-tRNA^{[Ser]Ser}-Kinase (PSTK) phosphoryliert und entsprechend aktiviert werden. Die Selenophosphat-Synthetase (SPS2) katalysiert unter ATP-Verbrauch die Aktivierung des sich im Se-Pool des Organismus befindlichen Selenids (HSe⁻) und liefert den Se-Donor Selenophosphat (SeP). Die Phosphoseryl-tRNA^{[Ser]Ser} wiederum ist Substrat der Selenocystein-Synthetase (SecS), die die Hydroxyl- Gruppe des Seryl-Restes durch das aktivierte Selenol ersetzt. Es entsteht die Selenocysteinyl-tRNA ($tRNA^{[Ser]Sec}$).

Der Einbau von Sec in die Polypeptidkette erfolgt nur in Anwesenheit mehrerer wichtiger *cis* und *trans* Faktoren. So befindet sich im untranslatierten Bereich (3'-UTR) einer jeden für ein Selenoprotein codierenden mRNA das so genannte SECIS-Element. Diese Sec-Insertionssequenz hat eine typische Haarnadelstruktur und wird unter anderem vom Transkriptionsfaktor SBP2 (*Secis binding protein 2*) erkannt und dient somit als Signal für die Decodierung des UGA-Codons (Hatfield *et al.* 2006).

Einleitung

In Abb. 1.3 sind typische SECIS Strukturen von Eu- und Prokaryonten vereinfacht dargestellt.

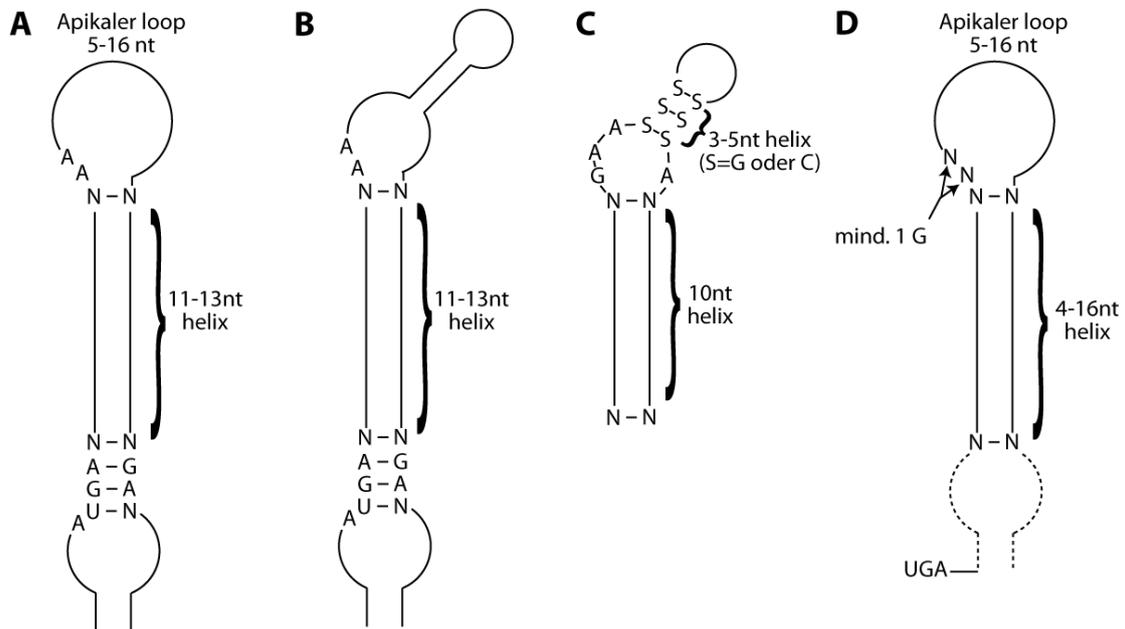


Abb. 1.3: Strukturen der SECIS- Elemente in Eu- und Prokaryonten und Archaea. (mod. Nach (Hatfield *et al.* 2006)) A) eukaryotisches Typ I SECIS- Element, B) eukaryotisches Typ II SECIS- Element, C) SECIS- Element bei Archaea und D) prokaryotisches SECIS- Element. Alle SECIS-Elemente weisen eine typische Haarnadelstruktur mit einem oder zwei apikalen Schleifen auf. Bestimmte Sequenzen sind zudem konserviert und in der Abbildung markiert.

Alle SECIS-Elemente weisen eine charakteristische Haarnadelstruktur auf und bestehen aus zwei Helices, die durch einen internen Loop unterbrochen werden. In Eukaryonten kommen zwei unterschiedliche SECIS-Typen vor. Sie unterscheiden sich durch das Vorhandensein einer zweiten apikalen Schleife im Typ II SECIS- Element. Entscheidend für den Einbau von Sec sind zwei konservierte Bereiche (Papp *et al.* 2007). Zum ersten die Nicht-Watson/Crick-Basenpaare in Helix 1, und die konservierten Adenosin-Nukleotide des apikalen und internen Loops (Papp *et al.* 2007). Das SECIS-Element kann sich bis zu mehreren Kilobasen entfernt vom UGA-Codon befinden.

Die Bindung des SECIS-bindenden Proteins SBP2 an die mRNA bewirkt die Bildung eines Decodierungskomplexes, der zusätzlich noch den an die $tRNA^{[Ser]Sec}$ gebundenen spezifischen Elongationsfaktor EF^{Sec} enthält. EF^{Sec} bindet an SBP2 und die 60 S-Untereinheit des Ribosoms und bringt somit den Sec-Rest für den Einbau in die Polypeptidkette in Position. Der Komplex wird auch als Dekodierungskomplex bezeichnet. Kommt es zur Bindung eines weiteren Proteins, dem ribosomalen Protein L30, wird eine Konformationsänderung des SECIS-Elements und die Annäherung des Sec-Dekodierungskomplexes an die A-Seite des Ribosoms bewirkt (Allmang *et al.* 2006). L30 verdrängt dabei SBP2, was wiederum die Positionierung der $tRNA^{[Ser]Sec}$ in der A-Seite des Ribosoms und somit den Einbau von Sec in das Protein ermöglicht (Squires *et al.* 2008).

1.2.6 Geschlechtsspezifische Expression von Selenoproteinen

Der Einfluss des Geschlechts auf die Expression von GPx3, Dio1, SePP und anderen Selenoproteinen wurde in unterschiedlichen Modellen untersucht. 2003 konnten Rush *et al.* zeigen, dass Frauen eine erhöhte GPx3 –Aktivität im Serum aufweisen als Männer (Rush *et al.* 2003). Andere Studien konnten einen Zusammenhang zwischen Östrogenstatus und GPx-Aktivität in den Erythrozyten nachweisen (Guemouri *et al.* 1991). Die GPx-Aktivität in den Erythrozyten prämenopausaler Frauen war signifikant höher als bei Männern gleichen Alters, und postmenopausale Frauen zeigen eine signifikant verringerte GPx-Aktivität in Erythrozyten (Massafra *et al.* 2002). In einer von Ha *et al.* durchgeführten Studie korrelierte zusätzlich der Serum Se-Status positiv mit dem Östrogenspiegel und auch die GPx3-Aktivität war mit steigendem Östrogenspiegel erhöht (Ha *et al.* 2003).

Untersuchungen zur Dio1-Expression wurden vor allem in Studien mit Ratten gewonnen. Die Ergebnisse sind allerdings widersprüchlich. Meist zeigte sich, wie in Experimenten von Susic-Jurjevic *et al.* eine Testosteron-abhängige Regulation der Dio1 in der Leber. Die Dio1-Aktivität in der Leber ist damit in Männchen deutlich höher als in Weibchen, nach Kastration sinkt sie jedoch signifikant. Dieselbe Studie konnte auch eine Testosteron-abhängige Regulation der Dio2-Aktivität in der Hypophyse nachweisen (Susic-Jurjevic *et al.* 2012). Eine Testosterongabe konnte die Dio1-Aktivitätswerte in der Leber der kastrierten Tieren auf das Niveau der Kontrollgruppe anheben (Lisboa *et al.* 2001).

Die Dio1-Aktivität unterliegt auch einer Regulation durch Östrogene. Diese ist jedoch nicht so stark ausgeprägt und wird eher durch zusätzliche Östrogengabe als durch endogenes Östrogen induziert (Marassi *et al.* 2007).

Eine geschlechtsspezifische Regulation der Selenoproteinexpression unterliegt nicht nur einer hormonellen Steuerung. Stoedter *et al.* analysierten in einem murinen Sepsismodell die Expression und Aktivität verschiedener Selenoproteine nach einer durch Lipopolysaccharid (LPS)-Gabe induzierten Sepsis. LPS bewirkt in beiden Geschlechtern eine signifikante Reduktion des Serum Se-Spiegels und der SepP-Konzentration bei gleichzeitiger Induktion der SelS-Expression. Die Gpx1-Aktivität ist hingegen nur in männlichen Tieren signifikant erniedrigt, Gpx3 und TrxR werden nicht durch LPS reguliert. Stoedter *et al.* untersuchten zudem den Einfluss des Se-Status auf die Expression der genannten Proteine. Auffallend war hier, dass ausreichend mit Se versorgte männliche Tiere im Gegensatz zu den weiblichen Tieren keine verstärkte SelS-Expression nach LPS-Gabe zeigten (Stoedter *et al.* 2010).

Riese *et al.* postulierten bereits 2006, dass die geschlechtsspezifische Regulation durch posttranskriptionale Mechanismen erfolgt. Sie stellten fest, dass weibliche Mäuse zwar eine höhere Dio1-mRNA-Expression in Niere und Leber aufwiesen als männliche Mäuse, die Dio1-Aktivität jedoch nur in der Niere der Weibchen entsprechend stark erhöht war. In der Leber von männlichen Tieren war die Dio1-Aktivität signifikant höher als in den Weibchen,

obwohl Weibchen eine stärkere Dio1-mRNA-Expression aufwiesen (Riese *et al.* 2006). In einer Folgestudie wiesen Schomburg *et al.* nach, dass diese Unterschiede zudem altersabhängig waren. Die von Riese *et al.* gezeigten Daten stammten aus 35 Tage alten Tieren. Schomburg *et al.* stellten in in der Leber von ein Jahr alten Tieren eine ähnliche mRNA-Expression und Dio1-Aktivität bei beiden Geschlechtern fest. Ein Unterschied zwischen Männchen und Weibchen war in der Leber nicht mehr nachzuweisen. In der Niere jedoch wiesen die Weibchen weiterhin sowohl eine signifikant höhere mRNA-Expression als auch eine signifikant höhere Dio1-Aktivität auf (Schomburg *et al.* 2007).

1.3 Die *SepP*-KO-Maus

1.3.1 Selenoprotein P

Selenoprotein P (SePP) ist das Speicher- und Transportprotein für Se im Organismus (Burk *et al.* 1994). Es wird in der Leber synthetisiert und enthält bis zu zehn Sec-Reste (Hill *et al.* 1991). Die Leber sezerniert SePP, welches mittels des Blutstroms in periphere Gewebe/Organe gelangen und dort Se in Form von Sec abgeben kann. Diese Sec-Reste können wiederum für die Synthese anderer Selenoproteine verwendet werden. Der typische Aufbau des SePP-Proteins ist in Abb. 1.4 gezeigt. Nur ein Sec-Rest befindet sich in der N-terminalen Domäne des Proteins, die weiteren neun sind in der der C-terminalen Domäne lokalisiert (Read *et al.* 1990).



Abb. 1.4: Schematischer Aufbau von SePP. SePP besitzt ein Signalpeptid, einen ersten Sec-Rest, gefolgt von einer His-reichen Domäne. Der C-Terminus kann bis zu 9 weitere Sec-Resten enthalten, die bei Bedarf abgespalten und für die Synthese anderer Selenoproteine verwendet werden können.

Nur dem N-terminalen Sec-Rest wird derzeit eine hypothetische enzymatische Aktivität zugeschrieben (Saito *et al.* 1999). So wurde z.B. von Steinbrenner *et al.* gezeigt, dass SePP Endothelzellen und Astrozyten vor oxidativem Schaden bewahren und die Oxidation von Lipoproteinen (LDL, low density lipoproteins) verhindern kann (Steinbrenner *et al.* 2006; Steinbrenner *et al.* 2006; Traulsen *et al.* 2004).

Die bis zu neun C-terminalen Sec-Reste in SePP dienen ausschließlich seiner Hauptaufgabe als Selenspeicher- und –Transportprotein. Dies und die Tatsache, dass ca. 60% des im Blut zirkulierenden Selens an SePP fixiert sind, machen das Protein zu einem geeigneten Biomarker für den Selenstatus eines Organismus (Hoefflich *et al.* 2010; Hollenbach *et al.* 2008).

Der Translationsprozess von SePP fällt durch einige Besonderheiten auf. Zum einen besitzt

seine mRNA zwei SECIS-Elemente (Berry *et al.* 1993) und zum anderen können während der Translation drei zusätzliche Isoformen von SePP entstehen – nämlich dann, wenn an einer der drei C-terminalen, für Sec-codierenden UGA-Codons ein Translationsabbruch erfolgt (Ma *et al.* 2002).

SePP-mRNA wird in vielen Geweben, wie Niere, Herz etc. (Burk *et al.* 1994) exprimiert, der Großteil des im Blut zirkulierenden SePP stammt jedoch aus der Leber. Von dort wird SePP als Glykoprotein in den Blutkreislauf abgegeben (Carlson *et al.* 2004) und versorgt periphere Organe, vor allem Hoden und Gehirn mit Selen (Burk *et al.* 1991). Die Zielgewebe verfügen über SePP-spezifische Rezeptoren. 2008 konnten Olson *et al.*, und Valentine *et al.* mit dem Apolipoprotein E-Rezeptor 2 (ApoER2/LRP8 = low density lipoprotein receptor related protein 8) und Megalin (LRP2) zwei SePP-Rezeptoren identifizieren (Olson *et al.* 2008; Valentine *et al.* 2008).

1.3.2 Die *SepP*-Knockout-Maus

Der Einfluss von Selen und Selenoproteinen auf Wachstum und Entwicklung konnte an Mäusen mit genetisch inaktivierter *SepP*-Expression (*SepP*-KO) beobachtet werden (Hill *et al.* 2003; Schomburg *et al.* 2003). Der Selenmangel zeigt sich bei den *SepP*-KO Mäusen durch ein stark reduziertes Wachstum, Ataxie, Epilepsie und Infertilität bei männlichen Tieren (Olson *et al.* 2005). Bei inadäquater Selenversorgung versterben die Tiere bereits nach wenigen Tagen. Durch Gabe von Selenit über das Trinkwasser kann der normale Phänotyp mit Ausnahme der Fertilität wiederhergestellt werden (Hill *et al.* 2003; Schweizer *et al.* 2004). Gewebsspezifische Unterschiede in der Expression von Selenoproteinen kann man in heterozygoten *SepP*-KO-Mäusen beobachten (Riese *et al.* 2006). Diese Tiere zeigen keinen Phänotyp weisen allerdings einen geringeren Se-Gehalt im Blut und in den mittels SepP mit Se versorgten peripheren Organen (Gehirn, Niere, Hoden) auf, jedoch nicht in der Leber, wo es zu einer Anreicherung von Se kommt (Schomburg *et al.* 2003).

Auch geschlechtsspezifische Unterschiede treten bei *SepP*-KO-Mäusen auf (Riese *et al.* 2006). Die männlichen KO-Tiere sind insgesamt stärker vom Selenmangel betroffen. Sie sind kleiner als ihre männlichen Wildtyp-Verwandten und als die entsprechenden KO-Weibchen und versterben früher.

1.4 Knochen und Selen

1.4.1 Knochenmetabolismus

1.4.1.1 Knochenaufbau

Der typische Knochen lässt sich morphologisch in zwei Bereiche unterscheiden: zum einen die Substantia compacta, eine stabile Knochenstruktur u. A. im Bereich des Schafts von

Einleitung

Röhrenknochen und zum anderen die Substantia spongiosa (kurz: Spongiosa), die durch schwammartige Bälkchenknochen im Inneren des Knochens gekennzeichnet ist. Die Bälkchenknochen werden auch als trabekulärer Knochen oder Trabekel bezeichnet (Ng *et al.* 1997). Diese ausgefeilte Mikrostruktur der Knochen soll maximale Stärke bei minimalem Gewicht ermöglichen (Boyle *et al.* 2003). In Abb. 1.5 ist ein typischer Röhrenknochen dargestellt. Er kann in Epi-, Meta- und Diaphyse unterteilt werden. Im Bereich der Epiphyse finden sich die Spongiosa, sie ist mit trabekulärem Knochen durchzogen. In der Metaphyse findet im Jugendalter das Längswachstum des Knochens statt. Der Übergang zwischen Epi- und Metaphyse wird daher auch als Wachstumsfuge bezeichnet. Im adulten Knochen verschmelzen Metaphyse und Epiphyse, das Längenwachstum des Knochens ist abgeschlossen. Die Diaphyse umfasst den Bereich des Knochenschafts, die Substantia compacta. Im Inneren des Schafts befindet sich das gelbe Rückenmark, welches durch den kortikalen Knochen geschützt wird. Der gesamte Knochen ist von der Knochenhaut, dem Periost umgeben: über diese erfolgt die Signaltransduktion und die Blutversorgung. Die Blutgefäße treten im Bereich der Diaphyse und Epiphyse in den Knochen ein und aus.

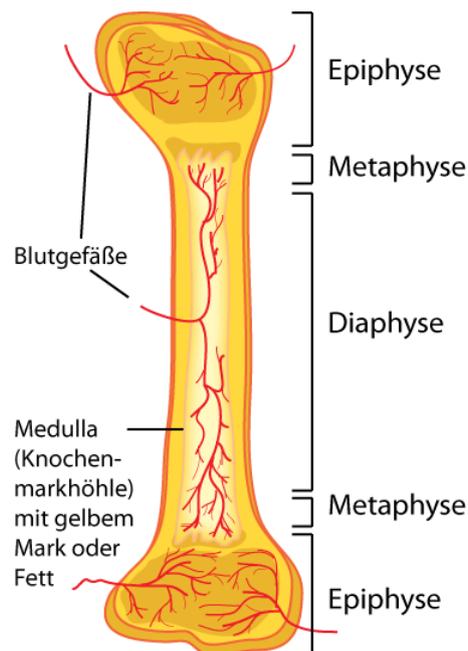


Abb. 1.5: Aufbau eines Röhrenknochens. Der Röhrenknochen lässt sich in drei Bereiche unterteilen. Die Epiphyse beinhaltet die Spongiosa. Die Metaphyse bezeichnet den Bereich der Wachstumsfuge, dort findet das Längenwachstum des Knochens statt. Die Diaphyse bezeichnet den Knochenschaft, der die Knochenmarkhöhle umgibt.

Knochen ist ein sehr komplexes Gewebe. Das Gewebe, auch als Knochenmatrix bezeichnet besitzt sowohl organische als auch anorganische Bestandteile. Die organischen Anteile bestehen zu 95% aus Kollagen Typ I und zu 5% aus Proteoglycanen sowie mehreren anderen nicht-kollagenen Proteinen, beispielsweise Osteonectin, Osteopontin und Osteocalcin (Hadjidakis *et al.* 2006). Die Mineralisierung erfolgt durch die Einlagerung der

Calciumphosphatverbindung Hydroxyapatit $[(Ca_3(PO_4)_2] Ca(OH)_2$ (Datta *et al.* 2008). Auf die im Knochen vorhandenen Zellen - die Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten - wird im Abschnitt 1.4.1.2.2 genauer eingegangen.

1.4.1.2 Knochenbildung und -umbau

1.4.1.2.1 Endochondrale Ossifikation

Knochen ist nicht nur ein sehr komplexes, sondern auch ein sehr dynamisches Gewebe, welches ständigem Auf- und Abbau unterliegt. Es entsteht durch desmale oder endochondrale Ossifikation. In beiden Prozessen bildet sich das Knochengewebe aus Vorläuferzellen, die im Laufe der Zeit durch Einlagerung der Calciumphosphatverbindung Hydroxyapatit $[(Ca_3(PO_4)_2]Ca(OH)_2$ ver härten (mineralisieren) (Datta *et al.* 2008).

Während der endochondralen Ossifikation kommt es zu einer indirekten Knochenbildung über knorpelige Vorläuferstrukturen. Mesenchymale Stammzellen differenzieren dabei zu Chondrozyten, die hypertroph werden und extrazelluläre Matrix absondern. Diese verfestigt sich durch Hydroxyapatiteinlagerungen und wird somit zu Knochengewebe (Mackie *et al.* 2008). Abb. 1.6 gibt einen Überblick über die einzelnen Schritte der endochondralen Ossifikation. Mesenchymale Stammzellen differenzieren zu Chondrozyten, sezernieren verschiedenartige Kollagenfasern, und es kommt zu Knorpelbildung. Durch Absonderung extrazellulärer Matrix(proteine) und deren Mineralisierung kommt es zur Ausbildung eines primären Ossifikationszentrums. Dieses befindet sich in Röhrenknochen meist im Bereich der Diaphyse und entsteht während der pränatalen Knochenbildung (Hatfield *et al.* 2013). Ausgehend von diesem Ossifikationszentrum bilden sich die Wachstumsfugen, denen sich die sekundären Ossifikationszentren anschließen (Blumer *et al.* 2008). Die Wachstumsfugen sind nach der Geburt für das Längenwachstum eines Knochens verantwortlich. Die Verknöcherung/Calzifizierung der extrazellulären Knorpelmatrix erfolgt durch die vesikelvermittelte Hydroxyapatitsekretion der hypertrophen Chondrozyten (Amizuka *et al.* 2012).

Einleitung

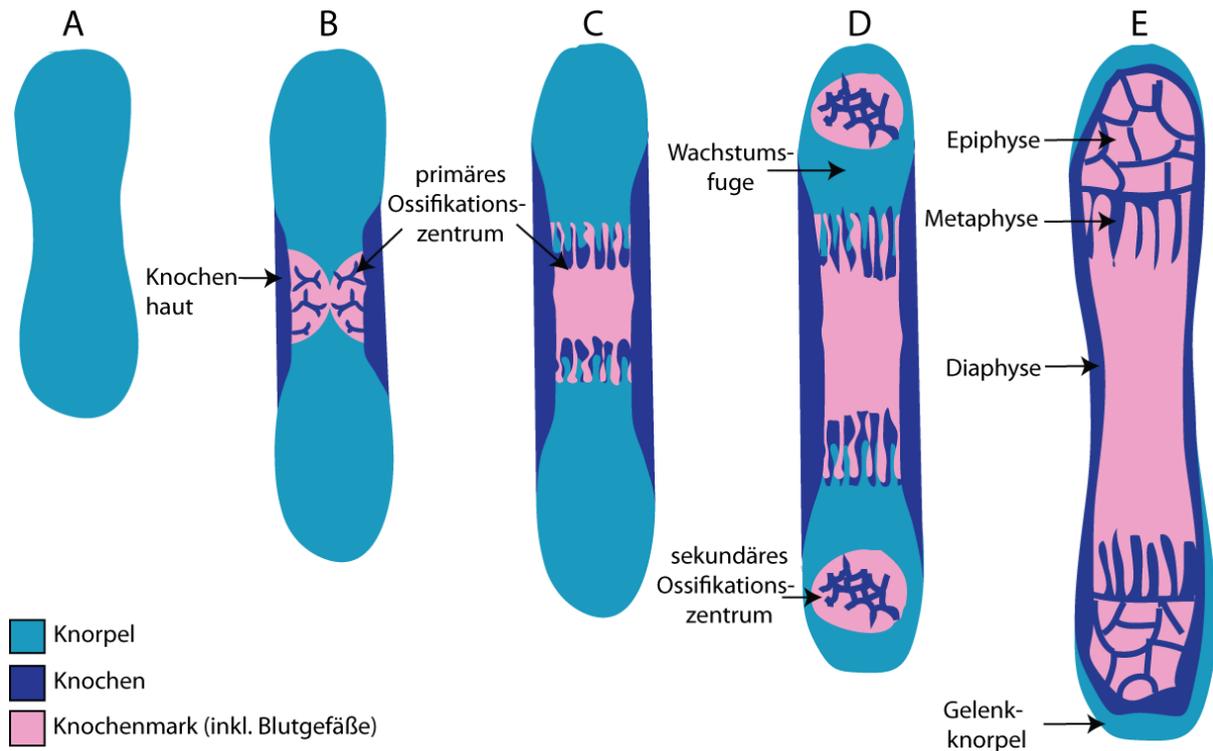


Abb. 1-6: Schematische Darstellung der endochondralen Ossifikation. Der knorpelige Bereich des zukünftigen Knochens (A) wird von Knochenhaut umgeben und das primäre Ossifikationszentrum bildet sich durch Differentiation von Chondrozyten zu hypertrophen Chondrozyten heraus (B). Das primäre Ossifikationszentrum wandert an die Endbereiche der knorpeligen Struktur (C) und bildet dort die sekundären Ossifikationszentren. Zwischen primärem und sekundärem Ossifikationszentrum liegt die Wachstumsfuge (D). Nach und nach wird Knorpel- durch Knochengewebe ersetzt, bis im adulten Knochen die Wachstumsfugen nahezu geschlossen sind (E). Am Ende des Röhrenknochens befindet sich der Gelenkknorpel (mod. nach (Mackie et al. 2011)).

Die Chondrozyten der Wachstumsfuge sind charakteristisch angeordnet. Abb. 1-7 zeigt deutlich die fünf unterschiedlichen Zonen. In der Reservezone finden sich schwach mitotisch aktive Chondrozyten, sie ist reich an extrazellulärer Matrix (Proteoglykanen, Typ II Kollagen) (Burdan et al. 2009). In der Proliferationszone teilen sich die Chondrozyten stark und es kommt zu einer säulenartigen Schichtung der Chondrozyten. In diesem Bereich sezernieren die Chondrozyten verstärkt Typ II und Typ XI Kollagen (Mackie et al. 2008). Weiter in Richtung Diaphyse hypertrophieren die Knorpelzellen zu sogenanntem Blasenknorpel. Sie werden größer und sezernieren verstärkt Typ X Kollagen (Burdan et al. 2009). Die säulenartig angeordneten hypertrophen Chondrozyten sezernieren Vesikel mit Hydroxyapatitkristallen (Ballock et al. 2003). Diese lagern sich an die Kollagenfasern an – es kommt zu einer longitudinalen Verknöcherung der extrazellulären Matrix (Wongdee et al. 2012). Die verbleibenden Zwischenräume ermöglichen die Invasion von Endothelzellen, sowie die Migration Osteoklasten und Osteoblasten (Amizuka et al. 2012). In der degenerativen oder auch Verknöcherungszone sterben die Chondrozyten ab, werden teilweise durch aus

Einleitung

Mesenchymzellen differenzierte Chondroklasten abgebaut oder dienen als Matrix für Osteoblasten und neue Knochenbildung (Wongdee et al. 2012).



Reservezone (Zona reservata)
(Metaphyse)

Proliferative Zone

Hypertrophe Zone

Degenerative Zone

Primäre Spongiosa (Diaphyse)

Abb. 1-7: Schematische Aufbau der Wachstumszone eines Röhrenknochens bzw. eines Knochens während der endochondralen Ossifikation. Im Bereich der Reservezone finden sich ungeordnete Chondrozyten. Die Chondrozyten der Proliferationszone sind flach und stapeln sich säulenartig. Anschließend stoppt ihre Zellteilung, sie werden hypertroph und auch als Blasenknorpel oder hypertrophe Zone bezeichnet. Abgestorbene Chondrozyten finden sich in der degenerativen Zone. Im Bereich der primären Spongiosa finden sich verknöcherte Strukturen. (mod. nach (Burdan et al. 2009))

Die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen zu funktionalen und später zu hypertrophen Chondrozyten ist essentiell für die endochondrale Ossifikation. Die bisher charakterisierten Transkriptionsfaktoren, die die Chondrozyten zur Teilung und Hypertrophe anregen sind in Abb. 1-8 aufgezählt. An dem Prozess sind z.B. Sox9 oder Runx2, Hormone wie GH, IGFs oder andere Proteine wie BMPs, Wnts beteiligt (Spath *et al.* 2011). Schließlich wird eine Hypotrophie durch eine unzureichende Versorgung der proliferierenden Chondrozyten induziert. Im Laufe der Zeit sterben die hypertrophen Chondrozyten ab.

Einleitung

Durch welche Signalwege das Sterben vermittelt wird, ist bisher noch nicht genau erforscht (Goldring *et al.* 2006).

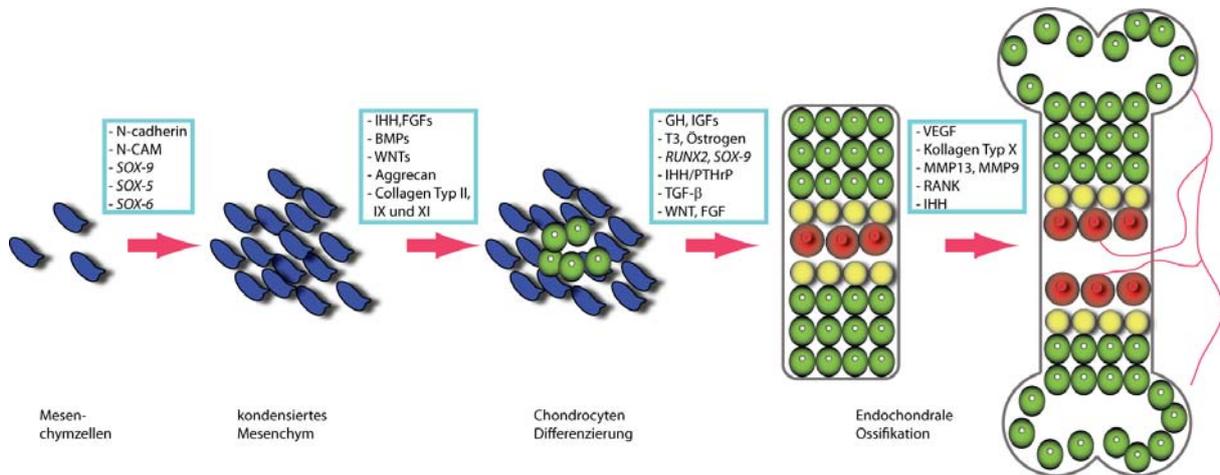


Abb. 1.8: Schematische Darstellung der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen. Die Differenzierung hin zu hypertrophen Chondrozyten wird durch mannigfaltige Faktoren beeinflusst. Mesenchymale Stammzellen werden u. A. durch Sox9, BMPs und Wnts zur Kondensation und Differenzierung angeregt. Die entstandenen Chondrozyten ordnen sich, induziert durch u. A. IGFs, Runx2, Sox9 charakteristisch an und unterliegen der endochondralen Ossifikation. Während dieser spielen RANK, MMPs und VEGF eine wichtige Rolle. (mod. nach (Las Heras *et al.* 2012)).

1.4.1.2.2 Knochenumbau und Knochenhomöostase

Im Knochen finden ständig Auf- und Abbauprozesse statt; (Datta *et al.* 2008). Während dieser auch Knochenumbau (engl. *bone remodelling*) genannten Prozesse wird permanent altes Knochengewebe abgebaut und durch neue Knochenmatrix ersetzt (engl. *bone turnover*) (Hadjidakis *et al.* 2006). Pro Jahr werden etwa 10% des Knochens auf diese Weise umgebaut. Rein rechnerisch wird damit innerhalb von ca. 10 Jahren das Äquivalent der gesamten Knochenmasse des Menschen einmal abgebaut und neu synthetisiert (Watts 1999). Der Knochenumbau dient dabei nicht nur der Anpassung an Belastungen sondern auch der Reparatur kleiner Mikrofrakturen und sichert somit die Stabilität des Knochens (Parfitt 1995; Raggatt *et al.* 2010).

Die Umbauprozesse finden in einem abgegrenzten und definierten Bereich des Knochens statt, der als *basic multicellular units* (BMUs) bezeichnet wird (Hadjidakis *et al.* 2006). Drei spezifische Zelltypen sind für den Knochenumbau von essentieller Bedeutung: die von mesenchymalen Vorläuferzellen abstammenden Osteoblasten und Osteozyten und die sich aus hämatopoetischen Vorläuferzellen entwickelnden Osteoklasten (Datta *et al.* 2008). Osteoklasten lösen altes Knochengewebe auf, welches durch neue Knochenmatrix ersetzt wird. Osteoblasten können neue Knochenmatrix synthetisieren: das Osteoid, welches durch Hydroxyapatiteinlagerungen mineralisiert (Datta *et al.* 2008). Osteozyten spielen eine Rolle in der Regulation des Knochenumbaus (Kennedy *et al.* 2012).

Einleitung

Abbau- und Aufbauprozesse während des Umbaus finden zwar zeitlich versetzt, aber gekoppelt miteinander statt, so dass Knochenschwund vermieden wird. Im juvenilen Organismus ist die Knochenaufbaurrate höher es kommt zu einer Zunahme der Knochenmasse. Bei Erwachsenen halten sich Ab- und Aufbau die Waage, die Knochenmasse bleibt ungefähr konstant. Mit zunehmendem Alter sinkt die Gesamtknochenmasse. Dies liegt an einem Ungleichgewicht zwischen Ab- und Aufbauprozessen, es kommt zum Beispiel zu Osteoporose.

Im Folgenden soll genauer auf den Verlauf des Knochenumbaus und die Rolle der genannten Zelltypen eingegangen werden.

Osteoklasten besitzen mehrere Zellkerne und differenzieren aus hämatopoetischen Stammzellen, den Osteoklastvorläuferzellen. Diese fusionieren zu mehrkernigen Osteoklasten, großen Zellen, die sich auch morphologisch von ihren „Verwandten“, den Makrophagen, unterscheiden. Kommen sie in Kontakt mit Knochengewebe, können sie sich polarisieren und auf der Seite des Kontakts zum Knochen eine stark gefaltete Membran ausbilden, die so genannte *ruffled border* (Teitelbaum 2000). Man vermutet, dass die *ruffled border* über Vesikel die Sekretion von Proteasen, wie Cathepsin K und Protonen steuert (Oikawa *et al.* 2013).

Osteoblasten bilden sich aus mesenchymalen Stammzellen. Im Gegensatz zu Osteoklasten besitzen sie nur einen Zellkern. Sie sind verantwortlich für den Aufbau von Knochen und synthetisieren extrazelluläre Matrixproteine (u. A. Kollagen Typ I, Osteocalcin und Matrix-Gla Protein). Außerdem sezernieren sie Sialoprotein I und II, Osteopontin, Osteonectin, Proteoglycane und die alkalische Phosphatase (ALP) (Orimo 2012). Die ALP wird als Maß für die Osteoblastenaktivität herangezogen, da sie Phosphat für die Mineralisierung der Knochenmatrix generiert. Osteoblasten regulieren auch die Differenzierung von Osteoklasten und somit die Knochenhomöostase. Auf ihrer Zelloberfläche exprimieren sie den *Receptor Activator of NF- κ B Ligand* (RANKL), ein aus der Tumornekrosefaktor(TNF)-Familie stammendes Protein (Mayahara *et al.* 2012).

RANKL interagiert mit RANK, welches von Osteoklastvorläuferzellen exprimiert wird. Durch diese Interaktion differenzieren die Vorläuferzellen zu reifen Osteoklasten und können mit der Knochenresorption beginnen. Osteoblasten sezernieren jedoch auch Osteoprotegrin (OPG), einen löslichen RANKL-Liganden, der die Bindung von RANKL an RANK verhindert und somit die Osteoklastenaktivität hemmt (Lacey *et al.* 2012). Das Verhältnis von OPG/RANKL unterliegt einer strengen Regulation und ist für die Aufrechterhaltung der Knochensubstanz von essentieller Bedeutung (Sinningen *et al.* 2012).

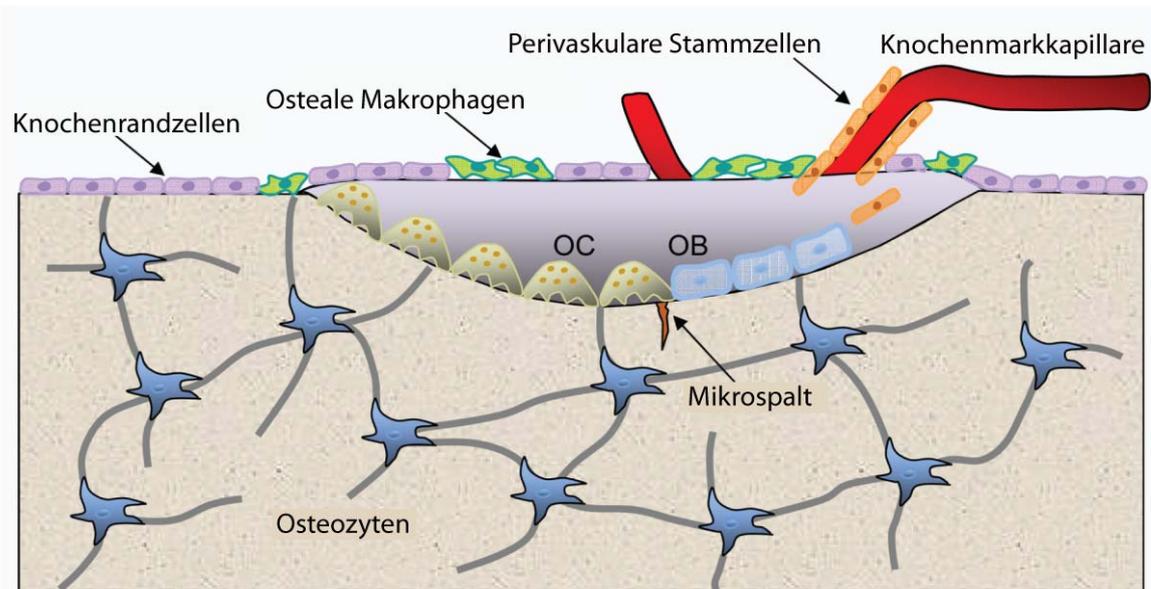


Abb. 1.9: Schematische Darstellung der Auf- und Abbauprozesse während des Knochenumbaus. Normalerweise dient der Knochenumbau der Reparatur von kleinen Mikrospalten/Ermüdungsbrüchen im Knochengewebe. Osteoklasten (OC) bauen Knochenmatrix ab, Osteoblasten (OB) bauen neues Knochengewebe auf. Die Osteozyten sind wichtig für Signalübertragung und das Erkennen der Mikrofrakturen. (mod. nach (Khosla *et al.* 2010))

Im Falle einer Mikrofraktur wird die Knochenmatrix durch Osteoklasten abgebaut. Vorher muss jedoch ein Zugang zur Mikrofraktur ermöglicht werden. Dazu wird noch nicht mineralisiertes Osteoid mittels Matrixmetalloproteasen (MMPs) abgebaut (Chambers *et al.* 1985). Nun können Osteoklasten direkt auf den Riss im Knochen einwirken. An der Stelle der Mikrofraktur sezernieren die Osteoklasten H^+ -Ionen. Diese Protonen lösen die Hydroxyapatitkristalle auf und demineralisieren den Knochen (Boyle *et al.* 2003). Es bleiben die Kollagenfasern. Die ebenfalls von den Osteoklasten sezernierten Proteasen wie Cathepsin K verdauen die Kollagenfasern; ein kompletter Verdau findet jedoch nicht immer statt. Bevor nun Osteoblasten neue Knochenmatrix synthetisieren können, müssen die restlichen Kollagenfasern durch MMPs abgebaut werden. Diese MMPs werden durch *bone lining cells*, die an der Knochenoberfläche sitzen (Hauge *et al.* 2001) synthetisiert und freigesetzt (Everts *et al.* 2002). Anschließend wird neue Knochenmatrix gebildet und mineralisiert.

1.4.2 Knochenendokrinologie

Der Knochenumbau unterliegt einer starken hormonellen Regulation. Zum einen muss die Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten gesteuert, zum Anderen müssen auch die Knochenbestandteile Ca und Phosphat zur Verfügung gestellt werden.

Ca ist als Bestandteil des Hydroxyapatits strukturgebendes und stabilisierendes Element des Knochens. Als dynamischer Calciumspeicher lagert der Knochen ca. 99% des gesamten im

Körper vorhandenen Calciums im mineralisierten Knochen ein. In einem 70 kg schweren Erwachsenen entspricht diese Menge ca. 1,1 kg Ca (Mitchell 1945). Durch Abbau der mineralisierten Knochenmatrix kann zusätzliches Ca freigesetzt und für andere Prozesse zur Verfügung gestellt werden. Insgesamt wird die freie Calciumkonzentration dabei über ein komplexes endokrines Netzwerk aus dem Calcitonin/ Parathormon (PTH)-System und VitD reguliert (Kopic *et al.* 2013). Diese Hormone sind somit von herausragender Bedeutung für die Aufrechterhaltung eines gesunden Knochengewebes und sollen in den folgenden Abschnitten genauer beleuchtet werden.

Außerdem spielt Calcium eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Signalweiterleitung, der Muskelkontraktion, für die neuronale Signalübertragung und Blutgerinnung. Das Gleichgewicht zwischen Resorption im Darm und Ausscheidung über die Nieren unterliegt daher einer strengen Kontrolle (Kopic *et al.* 2013).

1.4.2.1 Parathormon

Parathormon (PTH) wird als Präpropeptid in den Nebenschilddrüsen gebildet. Die Sequenz des humanen PTHs konnte 1981 von Hendy aufgeklärt werden (Hendy *et al.* 1981). Das aus 115 Aminosäuren (AS) bestehende Präpropeptid wird in zwei Schritten in das reife 84 AS enthaltende aktive PTH umgewandelt (Kemper *et al.* 1974). Das reife PTH wird in sekretorischen Vesikeln gespeichert und bei niedrigem Ca-Spiegel in die Blutbahn abgegeben. PTH wirkt in seinen Zielorganen über einen membrangebundenen G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR), den PTH-Rezeptor (Juppner *et al.* 1991). Die zwei Isoformen PTHR1 und PTHR2 unterscheiden sich in ihrem Expressionspattern, wobei nur PTHR1 eine Rolle für die Calciumhomöostase und somit den Knochenmetabolismus spielt. Für eine Aktivierung des Rezeptors sind nur die N-terminalen Aminosäuren 1-34 von Bedeutung, weshalb in der Klinik auch das PTH1-34 (Teriparatid) zur Behandlung von schwerer Osteoporose eingesetzt wird (Lamy 2012; Mosekilde *et al.* 1991; Tregear *et al.* 1973). PTH wirkt auf Knochen und Niere. Insgesamt trägt PTH zu einer Erhöhung der Ca-Konzentration im Serum und somit zu einer veränderten Knochenbildungsaktivität bei (Kopic *et al.* 2013).

In der Niere veranlasst PTH die verstärkte Ausscheidung von Phosphor als anorganisches Phosphat, da durch eine verringerte Expression des P_i -Transportproteins NaP_i -IIa die Reabsorption von P_i aus dem Primärharn reduziert wird (Forster *et al.* 2006; Pfister *et al.* 1997). Dieser Prozess wird entscheidend von einem Hormon der Osteozyten, dem Phosphatonin FGF23, kontrolliert (Ohnishi *et al.* 2013). PTH bewirkt zudem eine erhöhte Ca-Absorption im Bereich der distalen Tubuli des Nephrons über eine verstärkte Expression der Ca-Transportproteine TRPV5, Calbindin-D 28k und NCX1 (Lambers *et al.* 2006). PTH verursacht auch die direkte Phosphorylierung von TRPV5 und erhöht somit dessen Transportkapazität (de Groot *et al.* 2009). Darüber hinaus bewirkt PTH eine gesteigerte

Einleitung

Synthese von $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D, indem es die Expression der 1α -Hydroxylase (CYP27B1) erhöht. Diese katalysiert die Umwandlung des inaktiven Prohormons 25-(OH)VitD3 zu $1\alpha,25(\text{OH})_2$ VitD3 und aktiviert es so (Brenza *et al.* 2000). $1\alpha,25(\text{OH})_2$ VitD3 erhöht, wie in 1.4.2.3 genauer beschrieben zusätzlich die Resorption von Calcium im Darm und die Reabsorption von Ca in der Niere. Im Zusammenspiel mit VitD stellt PTH also Ca und anorganisches Phosphat für die Mineralisierung von Knochenmatrix zur Verfügung.

PTH wirkt auch direkt auf das Knochengewebe. Je nach Art des PTH-Signals können diese Wirkungen in zwei entgegengesetzte Richtungen erfolgen (Frolik *et al.* 2003). Ein pulsierendes PTH-Signal bewirkt eine Zunahme der Knochenmasse über eine Aktivierung der Osteoblastenproliferation und gleichzeitige Inhibition der Apoptose von Osteoblasten (Jilka *et al.* 2009; Schnoke *et al.* 2009). Eine kontinuierliche PTH Ausschüttung bewirkt einen verstärkten Knochenabbau durch eine erhöhte Osteoklastenaktivität. Osteoklasten exprimieren keinen PTHR1, so dass durch einen indirekten Mechanismus über die Interaktion zwischen Osteoblast und Osteoklastvorläuferzelle die Osteoklastendifferentiation verstärkt wird. PTH inhibiert in Osteoblasten die OPG-Synthese und aktiviert gleichzeitig die RANKL-Expression. Beides zusammen führt zu einem verstärkten RANKL-RANK-Signalling und resultiert in verstärkter Osteoklastenaktivität. Knochengewebe wird abgebaut und die freie Ca-Konzentration im Blut steigt an (Huang *et al.* 2004).

Da die extrazelluläre Ca-Konzentration im Körper nur in einem sehr engen Rahmen schwanken darf (Gesamt-Ca: 2,2–2,6 mM, gelöste Ca-Ionen: 1,1–1,3 mM) wird diese genau über den *Ca sensing receptor* (CaSR) gemessen und die PTH-Expression stark kontrolliert (Geibel *et al.* 2009). Die Halbwertszeit des Hormons ist mit weniger als 5 min sehr klein und erlaubt eine sehr präzise Regulation der PTH-Wirkung(sdauer) (Bieglmayer *et al.* 2002). Abb. 1.10 fasst die Wirkung von PTH noch einmal zusammen.

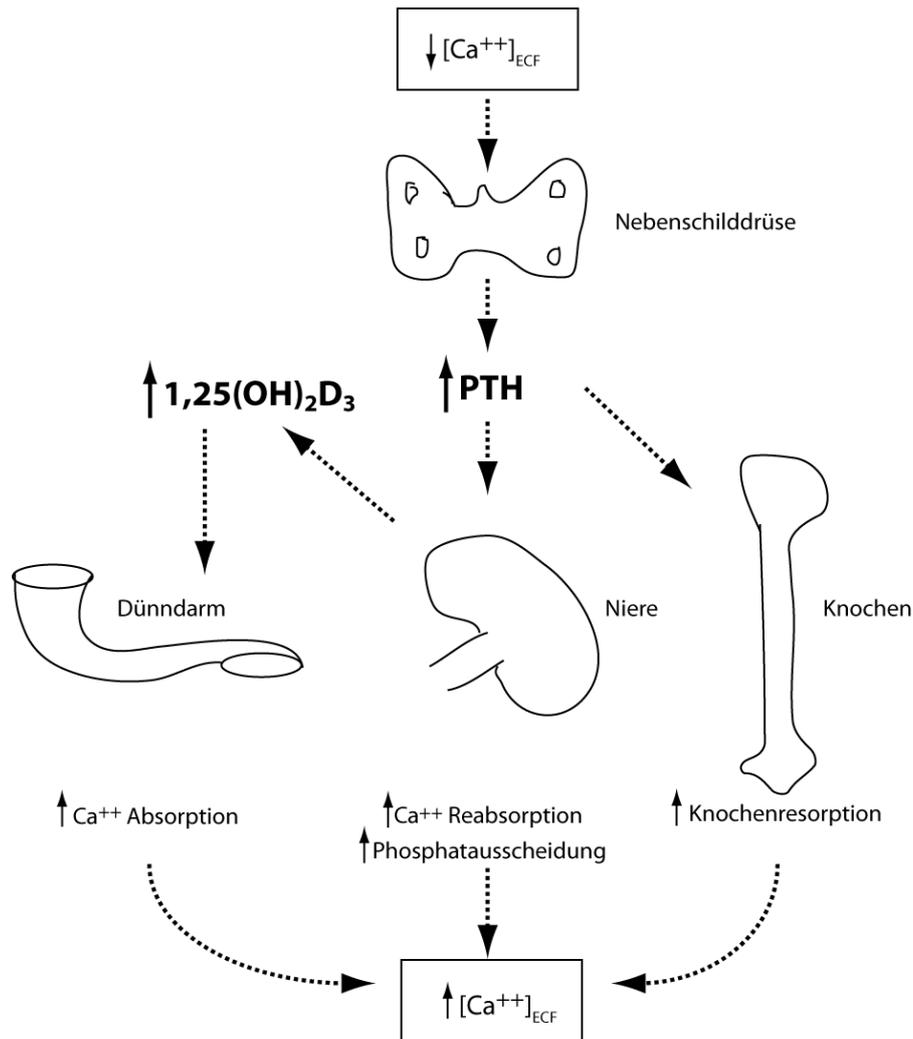


Abb. 1.10: Schematische Darstellung der Wirkung von PTH. Ein sinkender Ca-Spiegel im Blut löst in den Nebenschilddrüsen die Synthese von PTH aus. Dieses bewirkt einen verstärkten Abbau von Knochengewebe, eine erhöhte Reabsorption von Ca^{2+} in der Niere und eine verstärkte Ca^{2+} Absorption im Dünndarm und trägt damit zur Erhöhung des Serum-Ca-Spiegels bei.

1.4.2.2 Calcitonin

Auch Calcitonin ist ein Peptidhormon. Es konnte 1962 von Kopp als Ca-regulierendes Hormon beschrieben werden (Copp *et al.* 1962). Es wird in den C-Zellen der Schilddrüse synthetisiert und spielt im menschlichen Organismus nur eine untergeordnete Rolle in der Ca-Homöostase und somit auch bei der Aufrechterhaltung eines gesunden Knochengewebes (Hirsch *et al.* 1963). Dies konnte in Studien mit C-Zell-Tumorpatienten nach Thyreoektomie oder in Ratten ohne Schilddrüse gezeigt werden; in beiden Fällen konnte eine normale Knochendichte und ein unveränderter Ca-Spiegel im Blut beobachtet werden (Cooper *et al.* 1970; Wuster *et al.* 1992). Hirsch *et al.* postulieren deshalb, dass Calcitonin im Menschen ein evolutionäres Überbleibsel sei (Hirsch *et al.* 1963). Calcitonin aus anderen Spezies hat eine viel stärkere biologische Aktivität, so dass z.B. Lachs-Calcitonin zur Behandlung von Osteoporose eingesetzt wird (Thamsborg *et al.* 1996).

Einleitung

Darüber hinaus wird spekuliert, dass Calcitonin eine größere Rolle bei erhöhtem Ca- Bedarf, zum Beispiel während des Stillens oder des Knochenwachstums im Jugendalter, spielt (Woodrow *et al.* 2006). Calcitonin wird von den C- Zellen als Reaktion auf steigende Ca-Konzentration im Serum synthetisiert, wobei der CaSR das Signal übermittelt (Fudge *et al.* 2004). Calcitonin löst durch Bindung an den spezifischen Calcitonin-Rezeptor, wiederum ein GPCR, welcher vor allem von Osteoklasten und der Niere, aber auch in anderen Geweben exprimiert wird, eine cAMP-basierte Signalkaskade aus (Albrandt *et al.* 1995; Lin *et al.* 1991). In der Niere bewirkt Calcitonin speziesabhängig eine verstärkte Exkretion oder Absorption von Ca. Im Menschen wurde nach Calcitonin-Gabe zumeist eine verstärkte Ca-Exkretion beobachtet (Paillard *et al.* 1972), wohingegen Tierversuche meist eine durch Calcitonin verursachte verstärkte Ca-Reabsorption in der Niere (Carney *et al.* 1981) feststellten. Der direkte Einfluss von Calcitonin auf die Reabsorption und/oder Exkretion von Ca in der Niere ist somit noch nicht eindeutig geklärt. Calcitonin hat jedoch erwiesenermaßen einen Effekt auf die VitD-Synthese und somit indirekt auf die Knochenhomöostase. Es induziert die Expression der CYP27B1 und erhöht somit die Konzentration des aktiven $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{VitD}_3$ (Shinki *et al.* 1999).

Im Knochen wirkt Calcitonin auf Osteoklasten und bewirkt morphologische Veränderungen, die zu einer verringerten Aktivität und somit einem reduzierten Knochenabbau führen. Die *resorptive pits*, in denen durch Ausschüttung von H^+ -Ionen die Knochenmatrix aufgelöst wird, bilden sich nur unzureichend aus und der Knochenabbau und damit die Freisetzung von Ca wird reduziert (Holtrop *et al.* 1974). Außerdem hindert Calcitonin Osteoklast-Vorläuferzellen an ihrer vollständigen Differenzierung zu funktionalen Osteoklasten (Takahashi *et al.* 1988). Calcitonin und PTH wirken insgesamt antagonistisch. Während PTH auf einen erniedrigten Ca-Spiegel reagiert und einen verstärkten Knochenabbau und erhöhte Reabsorption von Ca bewirkt, wird Calcitonin bei einem erhöhten Ca-Spiegel ausgeschüttet und bewirkt eine Inhibierung des Knochenabbaus und erhöhte Exkretion von Ca (Abb. 1.11).

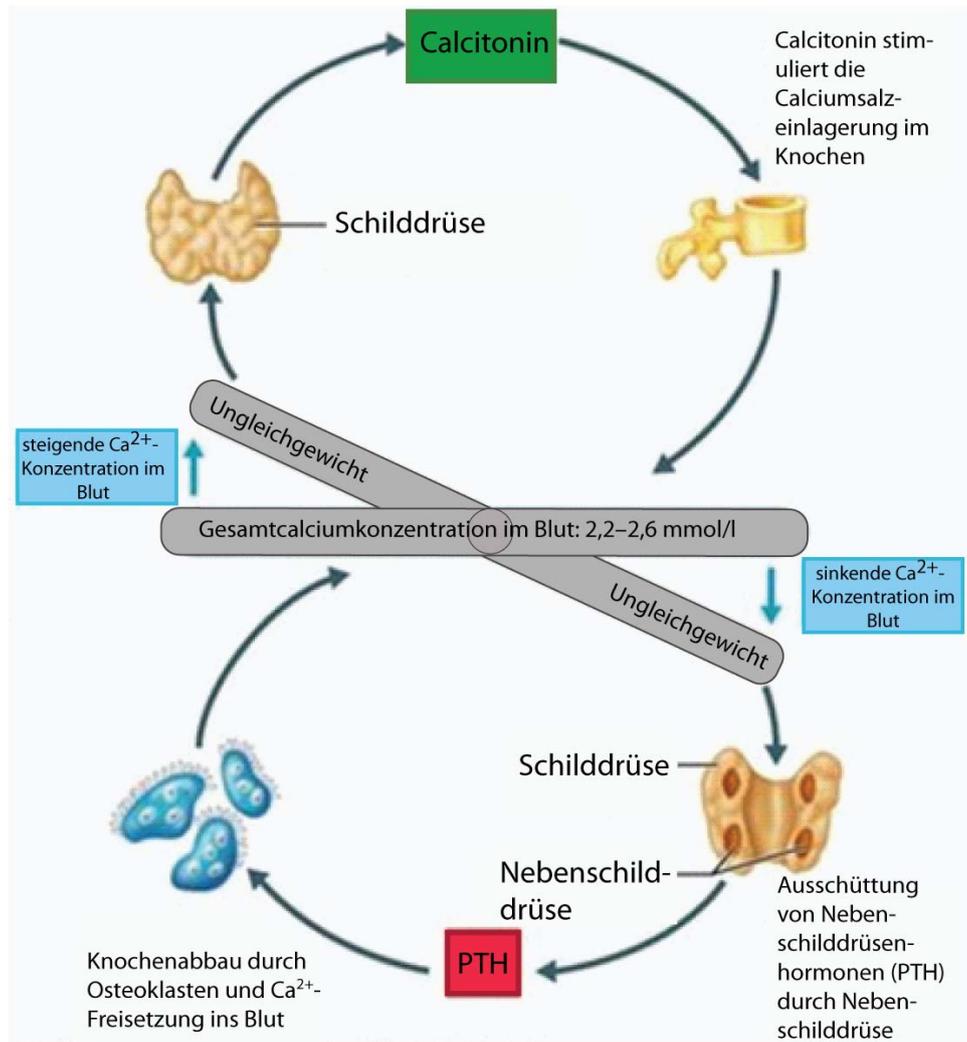


Abb. 1.11: Wechselspiel zwischen PTH und Calcitonin bei der Aufrechterhaltung eines konstanten Ca-Spiegels. Normalerweise wird ein Serum-Ca-Spiegel von 2,2-2,6 mM aufrecht erhalten. Gerät dieses Gleichgewicht durcheinander sorgen PTH und Calcitonin für dessen Wiederherstellung. Sinkt die Ca²⁺-Konzentration unter 2,2 mM wird PTH von den Nebenschilddrüsen gebildet und führt u. A. durch Induktion eines verstärkten Knochenabbaus zu einem Anstieg von Ca²⁺ im Serum. Steigt die Ca²⁺-Konzentration zu stark (über 2,6 mM) so wird in der Schilddrüse Calcitonin synthetisiert, welches eine verstärkte Einlagerung von Ca²⁺ in Knochen bewirkt. So wird der Ca-Spiegel konstant gehalten.

Doch nicht nur PTH und Calcitonin bestimmen die Ca-Konzentration im Blut und somit die Menge an Ca, die für die Knochenmineralisierung zur Verfügung steht. Hierbei spielen auch die D-Vitamine eine essentielle Rolle.

1.4.2.3 VitD

Der weitere entscheidende Spieler bei der Regulation der extrazellulären Ca-Konzentration und somit nachfolgend der Knochenmineralisierung ist Vitamin D. Dieses wird als Prohormon entweder über die Nahrung aufgenommen oder in einer UV-abhängigen Reaktion vom

Einleitung

Organismus synthetisiert. Es ist zu beachten, dass im allgemeinen Sprachgebrauch das $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{-VitD}$ als „VitD“ bezeichnet wird. Wie in Abb. 1.12 aufgeführt, ist VitD (Cholecalciferol) jedoch nur ein Vorläufermolekül, was durch Hydroxylierungen aktiviert wird.

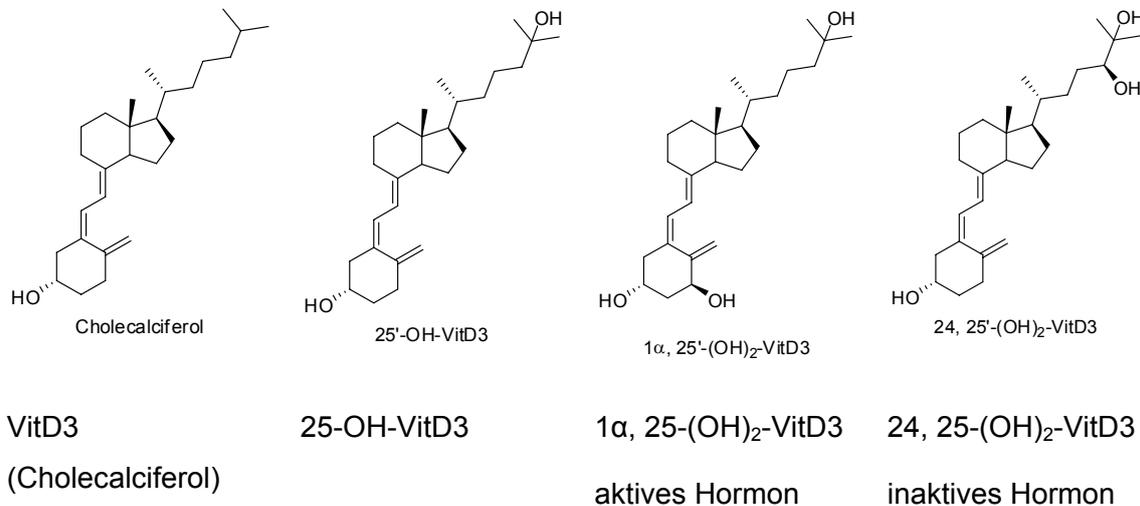


Abb. 1.12: VitD-Derivate und ihre Bezeichnungen.

VitD ist von immenser Bedeutung für die gesunde Knochenentwicklung. VitD-Mangel kann Rachitis bei Kindern und Osteomalazie und Osteoporose bei Erwachsenen verursachen (Wagner *et al.* 2012). Während der Schwangerschaft kann ein VitD-Mangel negative Auswirkungen auf die Knochenmasse der Nachkommen haben. In einer Longitudinalstudie von Javaid *et al.* hatten Kinder von Frauen mit einem VitD-Mangel während der Schwangerschaft im Alter von 9 Jahren eine signifikant niedrigere Knochenmineralmasse als die Kinder von ausreichend mit VitD versorgten Frauen (Javaid *et al.* 2006). Hollis *et al.* konnten darüber hinaus zeigen, dass eine Supplementation mit VitD während der Schwangerschaft zu einer Erhöhung des VitD-Spiegels in Neugeborenen und damit voraussichtlich auch zu einem erhöhten Knochenmineralgehalt (*bone mineral content*, BMC) führt (Hollis *et al.* 2011).

Neben dem exogen über die Nahrung zugeführten VitD ist auch die endogene Biosynthese von VitD bedeutsam für eine gesunde Knochenentwicklung und soll nun genauer betrachtet werden. Haut, Leber und Niere sind die Organe der VitD-Biosynthese. Für die in Abb. 1.13 dargestellte Biosynthese von aktivem VitD spielen zudem Enzyme der P450-Monohydroxylasen eine entscheidende Rolle.

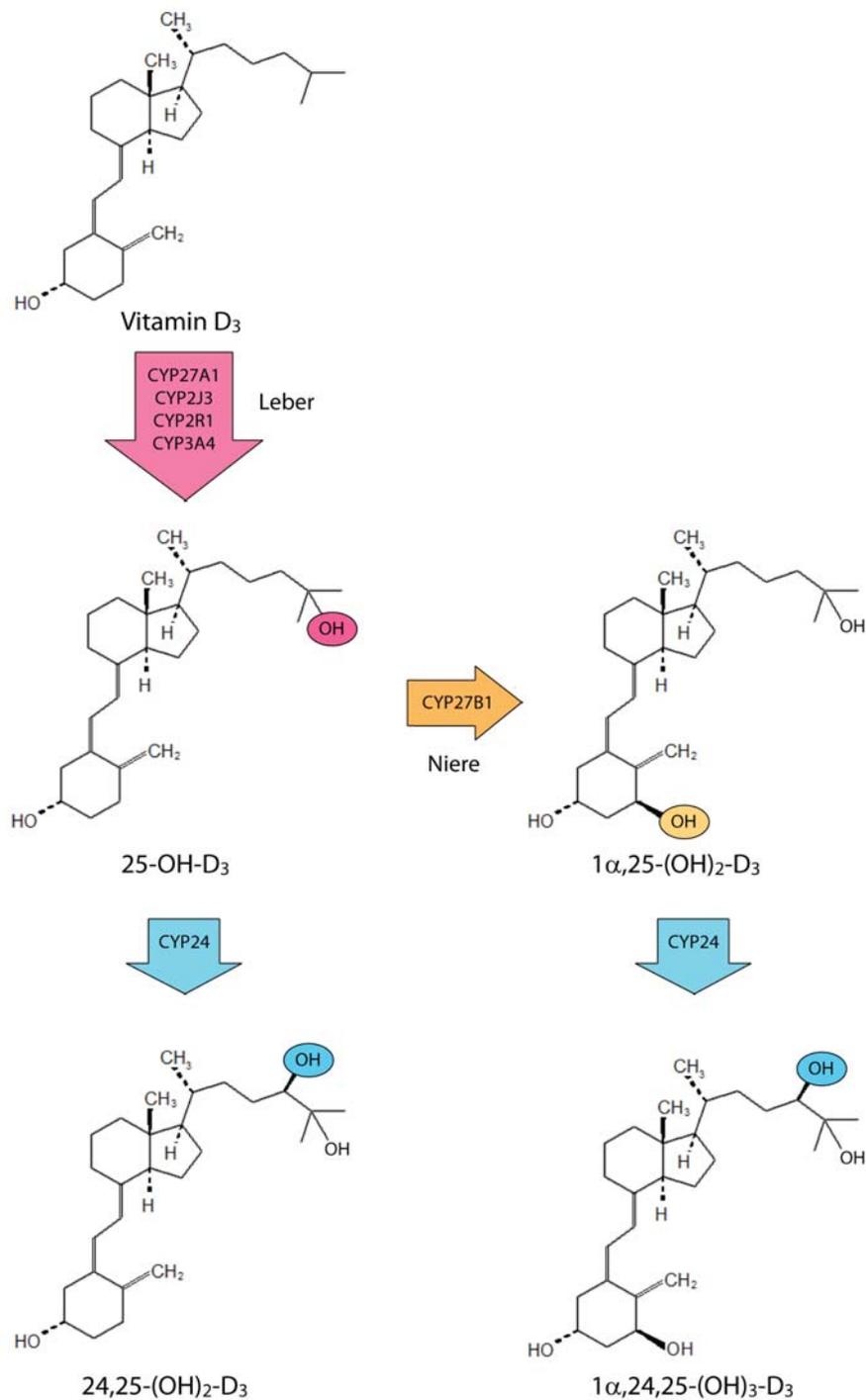


Abb. 1.13: Schematische Darstellung eines Ausschnitts der Biosynthese von VitD. Das in der Haut durch UV-Licht synthetisierte Vorläufermolekül VitD₃ wird in der Leber durch die Cyp27a1 und/oder Cyp2r1 an Position 25' hydroxyliert. Das entstandene Prohormon 25-OH-VitD₃ kann nun, gebunden an VDBP, zur Niere gelangen und durch die Cyp27b1 an 1α-Position nochmals hydroxyliert und in das aktive 1α, 25-(OH)₂-VitD₃ umgewandelt werden. Sowohl 25-OH-VitD₃ als auch 1α, 25-(OH)₂-VitD₃ können durch Hydroxylierungen an Position 24' (katalysiert von Cyp24a1) inaktiviert werden. (mod. nach (Prosser *et al.* 2004))

Einleitung

Nach der durch UV-Licht induzierten Umwandlung von 7-Dehydrocholesterol in VitD₃, die in der Haut stattfindet, bindet VitD₃ an sein Bindeprotein, das *Vitamin D binding protein* (VDBP) und gelangt über die Blutbahn zur Leber. Dort wird es an der 25-Position hydroxyliert, es entsteht das Prohormon 25-OH-VitD₃. Diese erste Hydroxylierung wird durch die P450-Monohydroxylasen Cyp27a1 und/oder Cyp2r1 (Cheng *et al.* 2003; Ohyama *et al.* 2004) katalysiert. Das Enzym wird auch als 25-Hydroxylase bezeichnet. 25-OH-VitD₃ ist das am häufigsten im Säuger vorkommende VitD-Derivat (Sutton *et al.* 2003). Von der Leber gelangt diese Vorstufe gebunden an VDBP über die Blutbahn in die Niere, wo es aktiviert und/oder inaktiviert werden kann. Zwei weitere P450-Monohydroxylasen entscheiden dabei, ob eine Hydroxylierung an 1 α - zur aktiven VitD-Form oder an 24'-Position zur Inaktivierung erfolgt.

Die Cyp27b1 katalysiert die Hydroxylierung an 1 α -Position und damit die Umwandlung in das aktive 1 α ,25-(OH)₂-VitD₃. Das aktive Hormon wiederum induziert eine weitere P450-Monohydroxylase, die Cyp24a1. Diese katalysiert die Hydroxylierung an der 24'-Position und inaktiviert das aktive Hormon und das Prohormon zum (1 α),24,25-(OH)₂-VitD₃ (Prosser *et al.* 2004). Die VitD₃ Konzentration wird somit über einen feedback-Mechanismus gesteuert (Makin *et al.* 1989). Zusätzlich zu 25'-OH-VitD₃ spielen auch PTH, die Ca- und P_i-Konzentration eine Rolle bei der Regulation der Cyp27b1. Eine Inaktivierung des 1 α , 25-(OH)₂-VitD₃ erfolgt durch Hydroxylierung an 24'-Position. Diese Reaktion wird von Cyp24 (auch 24'-Hydroxylase genannt) katalysiert und findet in nahezu allen Geweben statt (Sutton *et al.* 2003).

Mutationen in den Enzymen der VitD-Biosynthese haben unterschiedliche Konsequenzen für die Aufrechterhaltung eines gesunden Knochengewebes.

Patienten mit verringerter Expression der 25'-Hydroxylase zeigen wie von Foresta *et al.* beschrieben Anzeichen von Osteopenia und Osteoporose (Foresta *et al.* 2011). Kitanaka *et al.* und weitere Gruppen konnten zeigen, dass Rachitis-Patienten verschiedene Mutationen im *Cyp27b1*-Gen aufweisen, die zu einer veränderten Enzymaktivität führen und die Entstehung der Rachitis beschleunigen (Alzahrani *et al.* 2010; Kitanaka *et al.* 1998). Ein Patient mit einer Mutation innerhalb des 24-Hydroxylasegens (*Cyp24a1*) zeigte eine verringerte Knochenmineraldichte und erhöhte Calciumkonzentration im Urin (Tebben *et al.* 2012). Die komplette Ausschaltung des *Cyp24a1*-Gens in weiblichen Mäusen, führt zu einer stark eingeschränkten desmalen Knochenbildung. Die Nachkommen zeigten eine stark verringerte Mineralisierung und veränderten Knochenaufbau. Die zusätzliche Ausschaltung des *Vitamin D receptors* (VDR) ermöglichte eine normale Knochenentwicklung. Da parallel die Gabe von 24,25-(OH)₂-VitD₃ keine Verbesserung bewirkte, schlossen die Autoren, dass nicht der Mangel an 24,25-(OH)₂-VitD₃ sondern eher der Überschuss an 1 α ,25-(OH)₂-VitD₃ den Phänotyp hervorruft (St-Arnaud *et al.* 2000). All diese Beispiele deuten auf die enorme Rolle eines intakten VitD-Stoffwechsels für die Knochenhomöostase hin.

Einleitung

Das aktive VitD3 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{-VitD}_3$ wirkt über seinen nukleären Rezeptor, den VDR und induziert oder inhibiert die Transkription verschiedener Zielgene. In der Niere und dem Darm induziert $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{-VitD}_3$ die verstärkte Expression von Ca-Transportkanälen, wie TRPV5, Calbindin-D 28k, NCX1 und PMCA1b und erhöht so die Ca-(Re)absorption in Darm und Niere und die Ca-Konzentration im Serum (Kopic *et al.* 2013; Van Cromphaut *et al.* 2001). Im Knochen bzw. in Knochenzellen konnte die Expression des VDRs ebenfalls nachgewiesen werden. Die größte Wirkung von $1\alpha,25\text{(OH)}_2\text{-VitD}$ erfolgt über die Osteoblasten. Die Differenzierung zu reifen Osteoblasten und die Expression von Proteinen durch Osteoblasten wird durch $1\alpha,25\text{(OH)}_2\text{-VitD}$ angeregt (Atkins *et al.* 2007). Dennoch sind die Effekte nicht eindeutig und hängen stark von Expositionsdauer und Differentiationsstadium der Osteoblasten ab. Auch die Art der untersuchten Spezies hatte Einfluss auf die $1\alpha,25\text{(OH)}_2\text{-VitD}$ -vermittelten Effekte. Owen *et al.* zeigten, dass je nach Differentiationsgrad der Osteoblastenvorläuferzellen die Expression von Kollagen I und ALP hoch- oder runterreguliert wurde und damit die Knochenbildung entweder verstärkt oder verringert wurde (Owen *et al.* 1991). Das aktive $1\alpha,25\text{(OH)}_2\text{-VitD}$ stimuliert bei gleichzeitiger Gabe von VitK zusätzlich die Mineralisierung der Knochenmatrix (Koshihara *et al.* 1996). VitD wirkt sich auch auf Chondrozyten der proliferativen und hypertrophen Zone aus. Sie reagieren mit verstärkter Kollagen- und Proteoglycansynthese auf Stimulation mit $1\alpha,25\text{(OH)}_2\text{-VitD}$ (Schwartz *et al.* 1998). Insgesamt sind die bisher gewonnenen Ergebnisse zum Einfluss von VitD auf Knochenmetabolismus jedoch oft widersprüchlich. Besonders deutlich wird das an Studien mit VDR-Knockout-Tieren. Normalerweise leiden diese Tiere aufgrund der gestörten Ca-Absorption über den Darm unter Rachitis und Osteomalazie (Knochenerweichung). Wurde durch zusätzliche Ca-Zufuhr der Ca-Spiegel auf einen normalen Wert erhöht, konnte dieser Knochenphänotyp wieder aufgehoben werden, was für eine geringere Rolle von $1\alpha,25\text{(OH)}_2\text{-VitD}$ für die Knochenhomöostase spräche (Li *et al.* 1998). Panda *et al.* konnten dahingegen zeigen, dass die Anzahl der Osteoblasten, die Mineralisierungsrate und das gesamte Knochenvolumen in normocalcemischen (also ausreichend mit Ca versorgten) VDR-Cyp27b1-Doppelmutanten stark reduziert war. Dieses lässt wieder auf eine entscheidende Rolle von $1\alpha,25\text{(OH)}_2\text{-VitD}$ für eine korrekte Knochenentwicklung schließen (Panda *et al.* 2004). Seit den 90er Jahren wurden auch verstärkt non-genomische Effekte von $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{-VitD}_3$ beobachtet. Diese können bereits wenige Minuten nach VitD-Gabe eintreten, im Gegensatz zu den nach Stunden oder gar Tagen erfolgenden Effekten auf Transkriptionsebene. Nguyen *et al.* konnten 2004 zeigen, dass auch non-genomische Effekte den VDR benötigen (Nguyen *et al.* 2004). Bisher konnten non-genomische Effekte von $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{-VitD}_3$ in Osteoblasten, die eine durch $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{-VitD}_3$ induzierte erhöhte Ionentransportaktivität aufwiesen, im Darm, in Kardiomyozyten, Keratinozyten und β -Zellen (erhöhte Insulinausschüttung) nachgewiesen werden (Zanello *et al.* 2004). Diese bisher

Einleitung

beobachteten non-genomischen Effekte deuten darauf hin, dass VitD nicht nur für die Regulation der Ca-Konzentration wichtig ist, sondern auch viele andere Prozesse, z. B. das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System oder die Entstehung verschiedener Krebsarten beeinflusst und steuert (Kopic *et al.* 2013).

Eine funktionale Biosynthese der VitD-Derivate ist demnach ein entscheidender Faktor für gesundes Knochengewebe und andere physiologische Vorgänge.

1.4.2.4 Zusammenspiel der Hormone

PTH, VitD und eingeschränkt Calcitonin sind also die entscheidenden Faktoren in der Aufrechterhaltung einer stabilen Ca-Konzentration im Serum, die unabdingbar für eine normale Mineralisierung des Knochens ist. Alle drei Hormone beeinflussen sich gegenseitig, wie Abb. 1.14 deutlich macht.

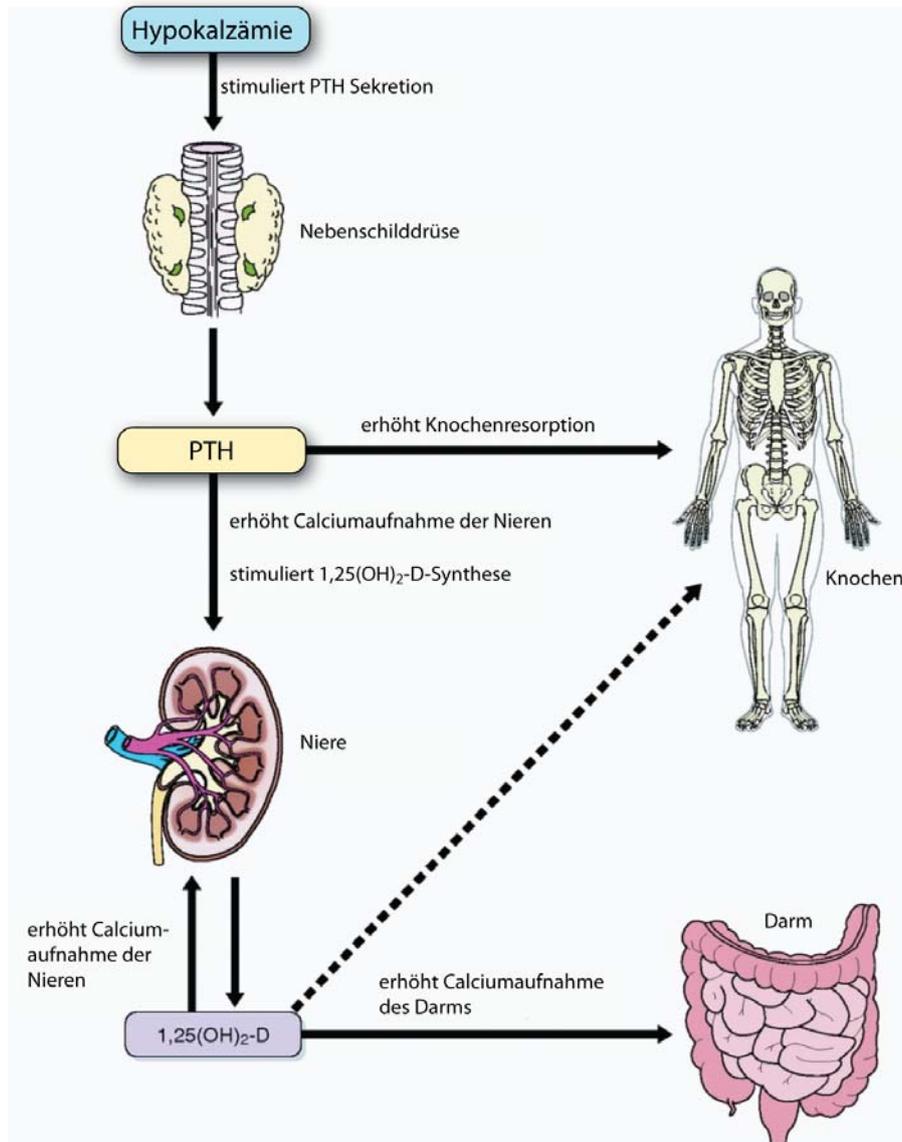


Abb. 1.14. Interaktion PTH und VitD auf die Ca-Homöostase und das Skelett. Eine sinkende Ca-Konzentration im Serum bewirkt die Freisetzung von PTH aus den Nebenschilddrüsen. Dieses erhöht den Ca-Spiegel, indem es zu einem verstärkten Knochenabbau führt und in der Niere die Reabsorption von Ca und die Synthese von $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{-VitD}_3$ erhöht. $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{-VitD}_3$ wiederum wirkt auf Knochengewebe ein und reguliert dort die Osteoblastenaktivität. Im Darm hingegen führt $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{-VitD}_3$ zu einer erhöhten Ca-Absorption (Kopic *et al.* 2013).

Bei sinkender Ca-Konzentration im Serum löst diese über den CaSR eine verstärkte PTH-Synthese und- ausschüttung in den Nebenschilddrüsen aus. PTH aktiviert im Knochen die Osteoklasten und erhöht die Ca-Absorption in der Niere. Zusätzlich wird in der Niere die Aktivität der Cyp27b1 erhöht und das aktive $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{-VitD}$ gebildet. Dieses wirkt auch positiv auf die Ca-Absorption in der Niere und zusätzlich noch auf die Ca-Absorption im Darm (Kopic *et al.* 2013). Im Knochen bewirkt $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{-VitD}$ meist ebenfalls einen erhöhten Knochenabbau und damit Ca-Freisetzung, zusätzlich wird die Ca-Einlagerung in Knochen verhindert (Lieben *et al.* 2012). $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{-VitD}$ hemmt parallel die Cyp27b-

Expression über einen negativen feedback-Mechanismus und induziert die Cyp24a1-Expression und somit die Inaktivierung von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{-VitD}$. Die Konzentration von aktivem $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{-VitD}$ ist dementsprechend streng reguliert. Die erhöhte Ca-Konzentration im Serum wird wiederum vom CaSR der Schilddrüse gemessen und bewirkt eine Reduktion der PTH-Expression in den Nebenschilddrüsen und eine gesteigerte Calcitonin-Expression durch die C-Zellen der Schilddrüse. Calcitonin wiederum hemmt die Osteoklasten bzw. deren Differenzierung und verstärkt die Ca-Exkretion über die Niere (Huebner *et al.* 2008). Die Ca-Konzentration im Serum wird über diese Mechanismen kontrolliert und in einem engen Rahmen konstant gehalten (Kopic *et al.* 2013).

1.4.3 Selen, Selenoproteine und ihre Bedeutung für Knochen

1.4.3.1 Selen und Wachstumsstörungen

Der Se-Gehalt im Boden variiert stark. So kommt es zu einer unterschiedlich guten Versorgung mit Se je nach Wohnort bzw. Anbauort der Lebensmittel (Barceloux 1999). Dass eine mangelhafte Selenversorgung negative Auswirkungen auf den menschlichen Organismus haben kann, wurde schon unter 1.1.5 angedeutet. Hier soll nun genauer auf die Rolle einer Se-Unterversorgung auf die Ausbildung der Kashin-Beck-Krankheit (KBD) eingegangen werden.

KBD, oder auch *big bone disease*, ist eine chronische endemische Osteoarthropathie, eine degenerative Knorpelerkrankung, die vor allem im ländlichen China und einigen Teilen Koreas bzw. Tibets auftritt (Moreno-Reyes *et al.* 1998). Insgesamt zeigen ca. 3 Mio Menschen in dieser Region die charakteristischen degenerativen und/oder nekrotischen Läsionen im Knorpelgewebe der Wachstumsfugen und Knorpeloberflächen des Gelenkknorpels (Guo *et al.* 1997; Hinsenkamp 2001). Außerdem konnten erhöhte Apoptoseraten und Dedifferenzierung der Chondrozyten sowie Veränderungen in der Extrazellulären Matrix beobachtet werden (Cao *et al.* 2008; Yang *et al.* 1993). Diese führen in den betroffenen Patienten zu Wachstumsverzögerungen und der Ausbildung einer sekundären Osteoarthrose (Yamamuro 2001). Obwohl die pathologischen Ausprägungen gut charakterisiert sind, ist die genaue Ursache der Krankheit noch nicht eindeutig gefunden. Geologische Untersuchungen des Bodens ergaben einen sehr geringen Se-Gehalt in allen von KBD betroffenen Gegenden. Auch der Jod-Gehalt war in diesen Gebieten signifikant niedriger (Wang *et al.* 2005). Zusätzlich zu einem Se-Mangel spielen auch eine durch Pilze hervorgerufene Mycotoxinkontamination des Getreides und eine erhöhte Fulvinsäurekonzentration im Trinkwasser eine Rolle (Haubruge *et al.* 2001). Durch Supplementation mit Se konnte in mehreren Fällen der Se-Status der Bevölkerung signifikant verbessert und zusätzlich ein Rückgang der pathologischen Ausprägungen der KBD erreicht werden. In anderen Studien konnte durch Se-Supplementation zwar die Se-Konzentration in

Einleitung

Haarproben der Menschen erhöht, jedoch kein positiver Effekt auf die Chondrozyten erzielt werden (Moreno-Reyes *et al.* 2003)

Forrest und Allen fanden weitere Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Se-Status und Knochenwachstum. Die spurenelementarme Diät von Phenylketonurie(PKU)-Patienten führte zu einer verringerten Knochenmineraldichte (BMD) (Allen *et al.* 1994; Forrest *et al.* 2002).

Einige Tiermodelle ermöglichen die Untersuchung der Auswirkungen von Se-Mangel auf Wachstum, Knochenbildung und Knochenregeneration. Thompson *et al.* stellten fest, dass Ratten, die in zweiter Generation auf einem Se-armen Futter gehalten wurden, ein signifikant verringertes Körpergewicht aufwiesen (Thompson *et al.* 1995). Moreno-Reyes konnte zusätzlich zeigen, dass in diesen Tieren auch Körperlänge und Wachstumsfaktoren wie der *Insuline-like growth factor* (IGF) oder das Wachstumshormon (GH) signifikant reduziert waren. Zusätzlich wiesen diese Tiere einen Knochenphänotyp auf. Die Längsknochen zeigten einen verringerten BMD und *bone mineral content* (BMC) (Moreno-Reyes *et al.* 2001). Se-Mangel hat auch einen Einfluss auf die Mikrostruktur der Knochen. Cao *et al.* untersuchten mittels μ CT die Epiphysen der Femura Se-defizienter Ratten und stellten eine signifikant verringerte Anzahl an trabekulärem Knochen und ein kleineres Verhältnis von Knochen- zu Gesamtvolumen fest. Biochemische Parameter ließen auf einen gesteigerten Knochenabbau schließen, der wiederum durch erhöhte ROS-Konzentration ausgelöst sein könnte (Cao *et al.* 2012). Auch die Metaphyse in Se-defizienten Tieren weist signifikante Änderungen auf. In Kombination mit Jod-Mangel ist die Wachstumsfuge in Ratten signifikant kleiner (Ren *et al.* 2007). Sowohl die Proliferations- als auch die hypertrophe Zone waren kleiner. Außerdem war die Anordnung der hypertrophen Chondrozyten in der Wachstumsfuge unregelmäßig. Eine erhöhte Expression von ColX im Gelenkknorpel wies auf aufkommende Gelenksarthrose hin und zeigt damit Ähnlichkeit mit den in KBD-Patienten beobachteten Gelenkknorpelveränderungen (Ren *et al.* 2007). Auch wenn der genaue Mechanismus weiter unklar ist, deuten die hier aufgeführten Studien auf eine große Rolle eines guten Se-Status für eine normale Knochenentwicklung und Knochenhomöostase hin.

1.4.3.2 Selenoproteine und Knochen

1.4.3.2.1 Expression von Selenoproteinen im Knochen

Die unter 1.4.3.1 beschriebenen Effekte werden teilweise durch veränderte Expression und/oder Aktivitäten von Selenoproteinen vermittelt.

Bereits 1998 konnte die Expression einiger Selenoproteine in humanen Osteoblasten und Osteoblastvorläuferzellen nachgewiesen werden. Unter den analysierten Selenoproteinen waren verschiedene GPx-Isoenzyme, TRxR und SePP (Dreher *et al.* 1998; Schutze *et al.* 1998). Ein direkter Einfluss der Gpx1 auf Knochensteifigkeit konnte jedoch nicht gezeigt

Einleitung

werden (Wang *et al.* 2008). Bisher konnte noch keine Expression von Selenoproteinen in Osteoklasten nachgewiesen werden (Sun *et al.* 2011).

Wird die Sec-spezifische tRNA (*Trsp*) in Chondroprogenitorzellen ausgeschaltet und somit die Selenoproteinbiosynthese in diesen Zellen blockiert, so kommt es zur Ausbildung eines schweren Phänotyps. So beobachteten Downey *et al.* in *Trsp*-KO-Mäusen nekrotisches Knorpelgewebe und gestörte Knochenbildung. Der Phänotyp ähnelte stark demjenigen der KBD- Patienten (Downey *et al.* 2009).

Neben der Sec-tRNA spielt auch SBP2 eine wichtige Rolle in der Biosynthese von Selenoproteinen (siehe 1.2.5). Treten im Menschen Mutationen im SBP2-Gen auf, so können nicht nur ein gestörter Schilddrüsenhormonstatus, geringere Selenoproteinexpressionen (Dumitrescu *et al.* 2005) sondern auch ein verzögertes Knochenwachstum beobachtet werden (Azevedo *et al.* 2010). Supplementation mit Se bewirkte keine verstärkte Selenoprotein-Biosynthese und konnte den beobachteten Phänotyp nicht ausgleichen (Schomburg *et al.* 2009). Somit scheint nicht nur ein guter Se-Status sondern auch eine funktionale Expression von Selenoproteinen für ein gesundes Knochengewebe von Bedeutung zu sein.

1.4.3.2 Schilddrüsenhormone, Dejodasen und Knochen

Viele Untersuchungen haben sich mit der Wirkung von Schilddrüsenhormonen befasst. Dabei erwies sich, dass Schilddrüsenhormone, deren Konzentration mittels Dejodasen reguliert wird, für den Knochenmetabolismus von großer Bedeutung sind. Die Anlagen für gesunde Knochen im Alter werden während des jugendlichen Wachstums gelegt. Wichtig ist hier besonders die *Peak Bone Mass*, diese wird im jungen Erwachsenenalter erreicht und legt die Basis für langfristig gesunde Knochen. Bei Erwachsenen spielt ein ausgewogener *bone remodeling cycle* die entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Knochenstabilität. Da mit zunehmendem Alter der Knochen verstärkt abgebaut wird, ist eine hohe *Peak Bone Mass* eine essentielle Voraussetzung, um nicht frühzeitig an Osteoporose zu erkranken (Ralston *et al.* 2006). Der Schilddrüsenstatus hat sowohl Einfluss auf die juvenile Knochenentwicklung als auch auf den Knochenumbau im Erwachsenen. Leiden Kinder unter einer Schilddrüsenunterfunktion, so zieht dies ein verzögertes Knochen- und Größenwachstum nach sich (Rivkees *et al.* 1988). Die Gabe von Schilddrüsenhormonen kann diese Verzögerung stoppen und ein nahezu normales Wachstum ermöglichen, wobei jedoch nie die theoretisch mögliche Größe erreicht wird (Boersma *et al.* 1996). In Kindern mit einer Schilddrüsenüberfunktion geschieht das Gegenteil. Das Knochenwachstum erfolgt schneller. Auch diese Kinder sind im ausgewachsenen Zustand kleiner, da sich ihre Wachstumsfugen vorzeitig schließen und das Längenwachstum zu früh gestoppt wird (Segni *et al.* 1999).

Im erwachsenen Organismus regulieren die Schilddrüsenhormone den Erhalt der

Einleitung

Knochenmasse. Liegt eine Hypothyreose, eine Schilddrüsenunterfunktion vor, so ist der *bone turnover*, also die Umwandlung von altem in neues Knochengewebe verzögert. Dabei sind Knochenabbau und Knochenaufbau betroffen (Eriksen *et al.* 1986). Die Knochen sind zusätzlich anfälliger für Frakturen (Vestergaard *et al.* 2002). Eine Hyperthyreose (Schilddrüsenüberfunktion) erhöht signifikant das Risiko einer Osteoporose, wobei sowohl prä- als auch postmenopausale Frauen und Männer betroffen sein können (Murphy *et al.* 2004). Die Osteoporose wird durch einen erhöhten Knochenabbau ausgelöst, der ungleich stärker ist als der nachfolgende Knochenaufbau. So kann es pro *remodelling* –Zyklus zu einem Knochenverlust von bis zu 10% kommen (Mosekilde *et al.* 1990). Dies wiederum bewirkt eine verringerte Knochenmineraldichte und ein erhöhtes Frakturrisiko.

Doch nicht nur die Konzentration zirkulierender Schilddrüsenhormone ist von Bedeutung sondern vor allem die intrazelluläre Konzentration an aktivem T3 (3,5,3'-Trijodthyronin). Der Großteil an zirkulierendem T3 wird in der Leber und Niere durch die von der Dio1 katalysierte Dejodierung von T4 an 5'-Position gewonnen. Spezifische membranständige Transporter, wie MCT8, OATP1 u. a. vermitteln die Aufnahme von zirkulierendem T4 und T3 in die Zielzelle (van der Deure *et al.* 2009). Innerhalb der Zelle kann mittels Dejodierung wiederum T3 aus T4 synthetisiert werden. Diese Reaktion wird nun hauptsächlich von der Dio2 katalysiert, deren Expression von Gouveia *et al.* in verschiedenen Mausknöcheln sowie in MC3T3, osteoblastenähnlichen murinen Zellen mit präoste- bzw. osteoblastären Eigenschaften nachgewiesen werden konnte (Gouveia *et al.* 2005). Eine Expression von Dio1 im Knochen oder knochenrelevanten Zelltypen konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Wang *et al.* 2012). T3 kann über eine weitere Dejodierung zum T2 inaktiviert werden. Diese Reaktion wird von der Dio3 katalysiert, die bisher zwar in Zellkulturexperimenten in allen relevanten Zelltypen, im Tier jedoch nur in juvenilen Knochen nachgewiesen werden konnte. Ihre genaue Funktion für die Knochenentwicklung und –homöostase ist noch nicht endgültig geklärt (Williams *et al.* 2008).

Das aktive Schilddrüsenhormon T3 kann seinen Einfluss auf die Expression von Zielgenen über seine nukleären Rezeptoren TR α 1, TR β 1 und TR β 2 ausüben (Cheng *et al.* 2010; Siddiqi *et al.* 2002). TR α 1 und TR β 1 konnten in Chondrozyten, Knochenmarkszellen und Osteoblasten, jedoch nicht in Osteoklasten nachgewiesen werden (Siddiqi *et al.* 2002). Bassett *et al.* analysierten Rezeptor-Knockout-Mäuse und stellten dabei unterschiedliche Konsequenzen für die Knochenentwicklung und die Knochenhomöostase fest. Erwachsene TR α -Knockout-Tiere hatten einen normalen Schilddrüsenhormonspiegel und zeigten parallel dazu eine verstärkte Knochenmineralisierung (Osteosklerose) und mehr trabekulären Knochen, beides Anzeichen für eine verminderte Osteoklastenaktivität. In juvenilen Tieren kam es zu einer verzögerten endochondralen Ossifikation mit verringerter Knochenmineralisierung. Das umgekehrte Bild ergab sich für TR β -KO-Tiere. Im adulten Tier

Einleitung

waren sowohl TSH als auch die Schilddrüsenhormonwerte erhöht, und die Knochen zeigten Anzeichen von verstärktem Knochenabbau bis hin zu Osteoporose. Die jugendlichen Tiere wiederum wiesen eine verstärkte Knochenmineralisierung und vorzeitige Verknöcherung auf (Bassett *et al.* 2007).

T3 inhibiert die Proliferation von Chondrozyten und stimuliert deren hypertrophe Differenzierung. Dazu passend konnten nach T3-Stimulation die verstärkte Expression von ALP, ColX und eine verstärkte Matrixmineralisierung nachgewiesen werden (Robson *et al.* 2000). T3 induziert außerdem den Abbau von Proteoglycanen und Kollagen in der hypertrophen Zone der Wachstumsfugen, indem es die Expression von degradierenden Enzymen, wie Aggrecanase 2 und der Matrixmetalloprotease 13, induziert (Makihira *et al.* 2003)).

Die Wirkung von T3 auf Osteoblasten hat zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt. Als sicher gilt jedoch, dass T3 die Osteoblastenaktivität erhöht (Wojcicka *et al.* 2012). T3 stimuliert die Kollagen I-Synthese (Varga *et al.* 2010). Auch die Expression von ALP und Osteocalcin wird durch T3 induziert (Gouveia *et al.* 2001). Auch die Differentiation zu und Proliferation der reifen Osteoblasten wird unter anderem über T3 und nachfolgend IGF und MAPK gesteuert (Milne *et al.* 2001; Stevens *et al.* 2003).

Ein Überschuss an Schilddrüsenhormonen bewirkt einen Anstieg an Osteoklasten und einen erhöhten Knochenabbau (Mundy *et al.* 1976). Dies kann indirekt über die OPG-Expression oder auch unabhängig von der RANKL-Signaltransduktion erfolgen (Kanatani *et al.* 2004; Varga *et al.* 2004). Bisher konnte zwar die Expression von TRs durch Osteoklasten auf mRNA-Ebene gezeigt werden jedoch fehlen bisher Nachweise der funktionalen Proteine. *In vitro* Versuche wurden zudem meist in gemischten Zellkulturen durchgeführt, so dass im Allgemeinen von einer indirekten Wirkung von T3 auf Osteoklasten ausgegangen wird (Allain *et al.* 1992).

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tab. 2-1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage CP 423S	Sartorius, Göttingen
Autoklav Varioklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Binokular (Stereomikroskop SZ2)	Olympus, Hamburg
CO ₂ -Inkubator	Heracell, Heareus Sepatec
Elektrophoresekammer (horizontal)	Roth, Karlsruhe
Geldokumentationssystem	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Kettenluminometer	Berthold LB 952 T716, BRAHMS AG
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer M 32	GLW, Würzburg
Microdismembrator Modell U	B. Braun Biotech, Melsungen
Mikrowellenofen Micro	Whirlpool, Schorndorf
Mikroskop Axioskop 2	Carl Zeiss, Oberkochen
Netzgeräte EPS 601	Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA
PCR-Cycler Primus 25 und 96plus	MWG Biotech, Ebersberg
pH-Meter inoLab Benchtop	WTW, Weilheim
Photometer NanoDrop 1000	Thermo Scientific, Waltham USA
Pipetten 0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand, Wertheim
Plattenschüttler DELFIA Plateshake	PerkinElmer GmbH, Rodgau – Jügesheim
Präparierbesteck	FST GmbH, Heidelberg
PCR-Cycler	MWG Biotech, Ebersberg
qPCR-Cycler iCycler	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Reinstwasser-Anlage EASYpure UV™	Barnstead Int., Dubuque, Iowa, USA
Rotationsmikrotom RM 2125 RT	Leica Microsystems, Nussloch
Schüttler Histologie	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Sterilbank	HeraSafe, Heraeus Sepatec
Spectrophotometer U-2001	Hitachi, Deutschland
S2-Picofox	Bruker Nano GmbH, Berlin
Tischphotometer	Eppendorf, Hamburg

Material und Methoden

Tischschüttler	KS 260 basic
Tissuelyser	Qiagen, Hilden
Trockenschrank ST 6200	Heraeus Holding, Hanau
Tiefkühlschrank HFU 486	Heraeus Sepatech, Osterode
Vortex	Eppendorf, Hamburg
Waagen CP 2201, CP 323S, Ultramicro 4504 MP8	Sartorius, Göttingen
Zellkulturmikroskop	Wilovert 30 Standard, Hund Wetzlar
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments

2.1.2 Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmittel

Sofern nicht anders angegeben wurden die Chemikalien von Sigma-Aldrich (Steinheim), Carl Roth (Karlsruhe), Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

2.1.3 Computerprogramme und Datenbanken

Tab. 2-2: Verwendete Software und Datenbanken

Software/Datenbank	Hersteller
AxioVision Rel. 4.7.	Carl Zeiss Microimaging, Göttingen
Bio-Rad iCycler iQ 3.0	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
GraphPad Prism 4	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
Picofox-Software	Bruker Nano GmbH, Berlin
Primer 3 Version 4.0	http://frodo.wi.mit.edu
REST Version 1.9.12	http://rest.gene-quantification.info
SPSS 19	IBM Deutschland GmbH, Ehningen
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
BLAT Search	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat
Electronic-PCR	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/e-pcr/
Mouse Genome Informatics	http://www.informatics.jax.org/
National Center for Biotechnology	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

2.1.4 Oligonukleotide für die Genotypisierung

Tab. 2-3: Sequenzen der Genotypisierungsprimer

Gen	Forward-Primer	Fragmentgrößen
SepPvorn	ataggacaacctcagcaatgtg	
R-SepPvorn_p200	caagtatcagctggcttgaaga	Wildtyp: 200 bp
R-lacZvorn_p262	cgggcctcttcgctattac	Heterozygot: 262 bp

2.1.5 Oligonukleotide für Genexpressionsanalysen

Die für die *real-time* PCR verwendeten Primer wurden wie in 2.4.3.1 beschrieben aus den bei NCBI abgelegten mRNA-Sequenzen abgeleitet und mit Hilfe der Software Primer3 Version 4.0 erstellt und von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Tab. 2-4: Sequenzen der Primer für die *real-time* PCR

Gen	Forward-Primer	Reverse-Primer
<i>18S</i>	ttgacggaagggcaccaccag	gcaccaccaccacggaatcg
<i>Runx2</i>	gaccagtcttaccctctatc	agaagtcagagggtggcagtg
<i>Kollagen 1</i>	cagtgatggaagcgttg	aaagacctggaagaccactt
<i>alk. Phosphatase (ALP)</i>	aaaagctcaacaccaatgtagc	cgttgggttatatgtcttga
<i>VitD Rezeptor (VDR)</i>	tggctgatctgtcagttacag	caaggtaaaagactgggtggag
<i>VitD Bindeprotein (VDBP)</i>	gaatgaagaggggtctggttct	gcgagttcattgcaaactttat
<i>Cyp27a1</i>	gctcagtactcaggagaccatc	gctctttgaaagggtgtacagg
<i>Cyp2r1</i>	gttctatcctgagcgatttctg	aaaacaagaacattccattcg
<i>Cyp3a4</i>	taccgatatgggactcgtaaac	tccatgtcgaattccataaac
<i>Cyp27b1</i>	gcagagcttgagctacaaatg	gtagattgatgctcctctcagg
<i>Cyp24a1</i>	ctaaaggagtcctatgaggctta	tgtcagcatcttcaaaattgtc
<i>Parathormon (PTH)</i>	agtctgtcttctaccctaaacg	atatcttcagcttctctca
<i>Calcitonin 1 (Calca1)</i>	gccactctcagtgaagaagaag	tgaaactgttgaggcttctg
<i>Calcitonin 2 (Calca2)</i>	aacagataacagcccagaat	aagggagaagggttttcaata
<i>SepP</i>	ggccgtcttgttatcacct	tggtgtttgtgggtgctatg
<i>IGF1</i>	gtcgtcttcacaccttctac	tctccagctcctcagatcac
<i>IGFBP2</i>	agacgctacgctgctatc	tgctgttcattgaccttctc

2.1.6 Zelllinien

Die verwendete Zelllinie Hepa1-6 stammt von einem Hepatom aus einer C57/L-Maus. Hepa1-6-Zellen (ATCC-Nummer: CRL-1830, DSMZ-Nummer: ACC 175) wachsen adhärent

in DMEM/F12 (+20%FCS)-Medium und bilden eine Monolayerschicht aus. Die Zellsplittung erfolgte ca. alle 3 Tage im Verhältnis 1:5.

Für die murine MicroMass wurden primäre Zellen aus entsprechenden Embryonen isoliert und in speziellem Medium kultiviert (DMEM:F12, 10% FCS, 0,2% CS, Pen/Strep). Die genaue Aufarbeitung der Chondroprogenitorzellen wird unter 2.2.5 beschrieben.

2.2 Zellkultur Methoden

2.2.1 Kryokonservierung von Zelllinien

Zur längerfristigen Lagerung wurden die Zelllinien in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Zugabe von Frostschutzmitteln wie Glycin oder DMSO verhinderte Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zelle und ermöglichte die Lagerung und das Auftauen ohne große Vitalitätsverluste.

Für die Kryokonservierung wurden Zellen in 150 cm²-Kulturflasche bis zur Konfluenz (ca. 80% des Bodens bedeckt) inkubiert, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA dissoziiert. Die abgelösten und mittels einer Pipette vereinzelt Zellen wurden in 8 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde bei 500xg, RT für 10 min zentrifugiert und das Zellpellet in 19,8 ml Kryomedium resuspendiert. Pro Kryostock wurden 1,8 ml Zellen abgefüllt. Zum Einfrieren wurden die Stocks zunächst für 24 h in einer Styroporbox bei -80°C gelagert, um ein Abkühlen von ca. 1°C/min zu gewährleisten. Danach konnten sie dauerhaft in Stickstoff gelagert werden.

2.2.2 Auftauen von Zelllinien

Da DMSO toxisch auf die Zellen wirkt, sollte der Auftauvorgang möglichst schnell durchgeführt werden.

Dazu wurde das Kryoröhrchen direkt von -196°C in einem 37°C warmen Wasserbad für max. 5 min erwärmt. Im Anschluss wurden die Zellen in ein Falcon-Röhrchen überführt und mit dem entsprechenden Medium auf 10 ml aufgefüllt. Die Zelllösung wurde bei 500xg bei RT für 10 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt, um das DMSO zu entfernen. Anschließend wurde das Zellpellet in 12 ml Kulturmedium aufgenommen. Nach Vereinzeln der Zellen durch mehrmaliges Pipettieren wurde die Zellsuspension in einer Kulturflasche ausgesät. Nach sechs bis 12 h erfolgte ein Mediumwechsel, um die letzten DMSO-Reste zu entfernen.

2.2.3 Passagieren von Zellen

Die Zelldichte sollte 70-80% Konfluenz nicht überschreiten, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Deshalb müssen Zelllinien regelmäßig passagiert werden. Die Subkultivierung erfolgt in Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinie.

Das verbrauchte Kulturmedium wurde abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Zugabe einer Trypsin/EDTA-Lösung und die nachfolgende Inkubation im Brutschrank für 5-10 min bewirkten das Ablösen der Zellen vom Gefäßboden. Die Zugabe von Kulturmedium im Verhältnis 2x Kulturmedium: 1x Trypsin/EDTA stoppte die proteolytische Wirkung des Trypsins. Die abgelösten Zellen wurden anschließend vereinzelt und ein Teil wurde in eine neue, mit frischem Kulturmedium befüllte Kulturflasche überführt. Der Grad der Verdünnung wurde durch die Wachstumsgeschwindigkeit und minimale Aussaatdichte bestimmt.

2.2.4 Stimulation der Zellen

Die meisten Zellkulturexperimente wurden in Sechslach-Platten (*six well plates*) durchgeführt, bei einer Zelldichte von 10^6 Zellen/well. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und Trypanblau bestimmt.

Dazu wurden die Zellen Hilfe von Trypsin/EDTA gelöst, vereinzelt und anschließend im Verhältnis 1:10 mit Trypanblau versetzt. Dieses färbte tote Zellen blau, lebende Zellen erschienen unter dem Lichtmikroskop durchsichtig. Die genaue Zellzahl wurde mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Diese besteht aus vier großen Quadraten, von denen mind. zwei ausgezählt und der Mittelwert der Zellzahl bestimmt wurde. Nach folgender Formel konnte dann die ursprüngliche Zellkonzentration bestimmt werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert} \cdot 10^4 \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

Für die hier beschriebenen Experimente wurden die Zellen in einer Konzentration von $5 \cdot 10^5$ /ml verwendet, so dass insgesamt 10^6 Zellen/Loch ausgesät wurden. Die Stimulation mit NaSe, SeMet und PBS erfolgte in den für die jeweiligen Experimente angegebenen Konzentrationen für die angegebenen Zeiträume. Dabei wurden die Stimulanzen wenn möglich direkt mit dem Medium verdünnt, um Lösungsmittelleffekte zu verringern.

2.2.5 Murine *Micromass* Kultur

Die Präparation und Kultivierung der Zellen erfolgte wie in der Literatur beschrieben (DeLise *et al.* 2000). Die Embryonen mit dem Entwicklungsstadium E11,5 wurden aus trächtigen Muttertieren präpariert und in vorgekühltes (4°C) PBS überführt. Die Extremitätenknospen wurden abgetrennt und in 37°C warmem HBSS gesammelt. Dabei war zu beachten, dass nur Embryonen gleichen Entwicklungsstands vereinigt wurden. Durch Zugabe einer Collagenase/Dispase-Lösung (3 mg/ml in HBSS) und Inkubation für ca. 15 min bei 37°C löste sich das Ektoderm ab. Es wurden ca. 400 µl Dispase zu den Extremitätenknospen von 30 Embryonen gegeben. Nach mehrfachem Waschen mit warmen HBSS wurde der Zellverband mit 0,1% Collagenase Typ Ia; 0,1% Trypsin; 5% FCS in PBS ohne Ca/Mg in

einem Wasserbad bei 37° C für 15-30 min inkubiert. Durch vorsichtiges „Schnippsen“ des Eppendorfreaktionsgefäßes kam es zur Auflösung des Zellverbandes. Die Zugabe von 1 ml vorgewärmten Micromass-Mediums (DMEM:F12, 10% FCS, 0,2% CS, Pen/Strep) stoppte die Reaktion, die Zellen konnten nach Zugabe weiterer 10 ml Medium vereinzelt und durch ein Zellsieb (40 µm) gegeben werden. Im Anschluss wurden die Zellen gezählt und auf eine Konzentration von $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml eingestellt. 10 µl dieser Zellsuspension wurden pro Loch in einer 12-Loch-Platte ausgesät (je vier Replikate) und 1 h bei 37°C ohne Zugabe weiteren Mediums inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml Medium, welches bereits die Stimulantien NaSe bzw. PBS enthielt. Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumswechsel. Die Analysen erfolgten nach sieben bzw. 14 Tagen.

2.3 Tierexperimentelle Methoden

2.3.1 Haltung

Bei den hier verwendeten Tieren handelte es sich ausschließlich um Tiere der Linie C57BL/6, aus der hauseigenen Zucht. Die Tiere wurden in der Tierhaltung des Forschungshauses am Campus Virchow unter einem automatisch kontrollierten 12 h Hell-/Dunkel- Rhythmus gehalten und erhielten ein, auf Basis des Standard-Laborfutters von Altromin (Haltungsfutter 1326, Zuchtfutter 1314, Altromin, Lage) selbst hergestelltes Futter mit definiertem Selengehalt. Der Selengehalt von 0,15 ppm wurde durch manuelle Zugabe von gelöstem NaSe eingestellt und mittels Totalröntgenfluoreszenz-Analyse (TRFA-Analyse, siehe Abschnitt 2.8.2) überprüft. Dabei entsprachen 0,15 ppm Se einer adäquaten Selenversorgung für Nagetiere. Das Futter wird im Folgenden als RDA-Futter bezeichnet. Für die Micromass-Versuche wurden die Weibchen ab zwei Wochen vor Befruchtung bis zur Tötung auf Se- armem Futter gehalten, welches einen Selengehalt von 0,08 ppm hatte.

2.3.2 Genotypisierung

Um die verwendeten Mäuse hinsichtlich ihres *SepP*-Genotyps eindeutig zu charakterisieren wurde die genomische DNA aus Ohrstanzen, die beim Markieren der Tiere anfielen, isoliert. Dazu wurden die Ohrstanzen in PCR-Tubes mit 50 µl ALK-Puffer (25 ml H₂O bidest., 62,5 µl 10 M NaOH, 10 µl 0,5 M EDTA, pH 12) versetzt und für ca. 2 h bei 95°C im Thermocycler inkubiert. Das Lysat wurde anschließend resuspendiert, mit 50 µl NEUT-Puffer (24 ml H₂O bidest., 1 ml 1 M Tris-HCl, 45 µl 37% HCl) versetzt, gevortext und konnte dann direkt in der PCR eingesetzt werden. Der PCR-Ansatz enthielt folgende Komponenten

Ansatz pro Reaktion (Gesamtvolumen 20 µl)	
Komponente	Volumen [µl]
Genomische DNA-Lysat	1
ddH ₂ O	18,25
MgCl ₂ [25 mM]	1
dNTPs [10 mM]	0,5
Primer1, 2 und 3 [10 µM]	Je 1
Taq-Polymerase [5U/µl]	0,2

In einem Thermocycler wurden die Proben anschließend nach folgendem Temperaturprogramm inkubiert.

Temperaturprogramm Genotypisierung		
Schritt	Zeitraum	Temperatur
Initiale Denaturierung	15 min	95°C
Denaturierung	15 s	95°C
Primeranlagerung	15 s	53°C
Elongation	15 s	72°C
} 45 Zyklen		
Finale Elongation	3 min	72°C

Anschließend wurden die Proben mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und der Genotyp der Proben bestimmt. Dazu wurden 5 µl aus der PCR-Reaktion mit 1 µl DNA-Probenpuffer (6x, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 30% (w/v) Glycerin in H₂O bidest.) versetzt und in einem 2%-igen Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel mit SB-Puffer (20x, 36,5 mM Borsäure, 10 mM NaOH in H₂O bidest., pH 8,5 einstellen mit H₃BO₃), bei 220 V für ca. 30 min elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend unter UV-Licht fotografiert und mit Hilfe eines mitgeführten Größenstandards (*1 kb DNA Ladder Generuler™ Plus*, Fermentas, Kanada) ausgewertet.

2.3.3 Tötung und Probenentnahme

Die Tötung der Tiere erfolgte mittels CO₂-Inhalation. Nach dem Öffnen des Brustraums wurde das Blut entnommen und eine Stunde bei 4°C gelagert. Anschließend wurde das Vollblut für 10 min bei 10000xg und 4°C zentrifugiert, das Serum abgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und langfristig bei -80°C gelagert. Die entnommenen Organe (Leber, Niere und Schilddrüse) wurden ebenfalls sofort in flüssigem Stickstoff gelagert, um eine Zersetzung von RNA und Proteinen zu verhindern. Die langfristige Lagerung erfolgte bei -80°C.

Für die Analyse der Extremitäten- und Wirbelknochen wurde die Haut entfernt und die Extremitäten möglichst oberhalb des Oberschenkelkopfes bzw. am Schulterblatt abgetrennt. Der Schwanz wurde so dicht wie möglich an der Wirbelsäule abgetrennt und nach den

ersten vier Wirbeln zerteilt. Je ein Vorder- und Hinterlauf (jeweils Ober- und Unterschenkelknochen) und das distale Schwanzende wurden in Formalin (*neutral buffered formalin*, NBF) überführt und für 24 h bei 4°C inkubiert und anschließend in 70% EtOH überführt und bei 4°C gelagert. Der zweite Ober- bzw. Unterlauf und das proximale Schwanzstück wurden unmittelbar in 70% EtOH überführt und bei 4°C gelagert.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Probenvorbereitung

Für alle weiteren Untersuchungen wurden homogene Proben der Organe benötigt, weshalb große Organe mit Hilfe eines Mikrodismembrators im gefrorenen Zustand gepulvert und anschließend als Pulver wieder bei -80°C eingelagert wurden. Alle Arbeiten mit den Gewebeproben erfolgten auf Trockeneis bzw. unter flüssigem Stickstoff. Für weitere Schritte, z. B. RNA-Isolierung wurden kleine Mengen an Gewebepulver entnommen und in die entsprechenden Puffer überführt. Kleinere Organe, wie die Schilddrüse, konnten für die Weiterverarbeitung direkt in dem entsprechenden Puffer aufgenommen werden, ohne vorherige Zerkleinerung.

Die Zellkulturproben wurden durch Absaugen des Mediums, anschließendem Waschen mit PBS und sofortigem Überführen der Platte auf Trockeneis gewonnen. Die Platten konnten bis zur endgültigen Weiterbearbeitung bei -80°C gelagert werden. Anschließend wurden die Zellen mittels einer Schabers vom Boden gekratzt und mit den entsprechenden Puffern in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, um nachfolgend RNA zu gewinnen.

2.4.2 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte aus allen Geweben und Zellkulturen mittels Trifast-Reagenz (PEQlab, Erlangen).

Eine Spatelspitze an Gewebepulver wurde in 1 ml TriFast-Reagenz aufgenommen und mit der Pipette homogenisiert. Um eine vollständige Lyse zu erreichen, erfolgte die Zugabe einer vorgekühlten Keramikugel und das Homogenat wurde mit Hilfe eines TissueLysers bei 15 Hz für 5 min aufgeschlossen und im Anschluss für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die nachfolgende Zugabe von 200 µl Chloroform, weitere 15 s im Tissuelyser (15 Hz) und eine anschließende Zentrifugation (14.000xg, 5 min) bewirkte eine Phasentrennung. Die obere, wässrige Phase enthielt die RNA und wurde in ein Reaktionsgefäß mit 500 µl 4°C kaltem Isopropanol überführt und mittels Vortexer gut gemischt. Nach einer zehnmütigen Inkubationsphase auf Eis wurde die ausfallende RNA durch Zentrifugation (12.000xg, 10 min, 4°C) pelletiert. Das RNA-Pellet wurde zweimal mit jeweils 1 ml 4°C kaltem Ethanol (75%) gewaschen und zentrifugiert (12.000xg, 10 min, 4°C). Der ethanolische Überstand wurde möglichst vollständig entfernt und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Die

RNA wurde durch Zugabe von DEPC-haltigem Wasser in Lösung gebracht und bei -80°C gelagert. Die RNA-Konzentration wurde anschließend mittels photometrischer Quantifizierung am NanoDrop 1000 bestimmt.

Die RNA-Isolation den Zellen erfolgte nach dem gleichen Prinzip, allerdings wurden pro Loch nur $400\ \mu\text{l}$ TriFast-Lösung verwendet.

2.4.3 Quantitative Real-time PCR

Mit der quantitativen *real-time* PCR (qPCR) kann die Menge eines Transkripts in unterschiedlichen Proben miteinander verglichen werden. Die qPCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR), wobei mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen während der PCR-Zyklen die Menge des Transkripts quantifiziert werden kann. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional zur Menge des PCR-Produktes zu. Durch die Wahl eines *housekeeping* Gens, bei dem keine Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen Bedingungen angenommen werden, können die Werte normalisiert und anschließend mehrere Proben/Bedingungen relativ zueinander verglichen werden. Bei der qPCR kommt es vor allem auf die Wahl spezifischer Primer und eine saubere cDNA an.

2.4.3.1 Primerdesign

Die verwendeten Primer müssen spezifisch für die von der mRNA aus gebildete cDNA sein, das heißt sie dürfen nicht zur Amplifikation genomischer DNA führen, die sich evtl. auch in der Probe befinden kann. Deshalb sollten die Primer Exon-/Exongrenzen überspannen.

Sämtliche für die qPCR verwendeten Primer wurden nach folgendem Schema erstellt. Die mRNA Referenzsequenzen wurden aus der Genbank (NCBI) kopiert. Mittels des Online-Tools Blat wurden die Exongrenzen bestimmt und eine der Exongrenzen als Amplifikationsziel markiert. Im Online-Tools Primer3 wurden folgende Spezifikationen angegeben: 100-300 bp als optimale Fragmentlänge, 58°C als optimale Schmelztemperatur und 22 bp als optimalen Primerlänge. Anschließend wurden gut geeignete Primerpaare errechnet. Diese wurden in der reversen e-PCR (Elektronische PCR; NCBI) gegen das Genom sowie das Transkriptom des Zielorganismus getestet, wobei unter den e-PCR-Standardbedingungen kein Target im Genom angezeigt werden sollte.

2.4.3.2 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wurde die aus Gewebe isolierte RNA in komplementäre DNA-Stränge (cDNA) umgeschrieben, was als reverse Transkription (RT) bezeichnet wird. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem cDNA-Synthese Kit von BioRad, wobei $0,5\text{-}1,0\ \mu\text{g}$ Gesamt-RNA umgeschrieben wurden. Das Ansetzen der cDNA-Synthese erfolgte in PCR-Gefäßen auf Eis.

Ansatz pro Reaktion (Gesamtvolumen 20 µl]	
Komponente	Volumen [µl]
RNA-Probe (0,5 µg]	x
ddH ₂ O 5x	15-x
iScript RT-Reaktionsmix	4
iScript Reverse Transkriptase	1

In einem Thermocycler wurden die Proben anschließend nach folgendem Temperaturprogramm inkubiert.

Temperaturprogramm cDNA- Synthese	
Zeitraum	Temperatur
5 min	25°C
30 min	42°C
5 min	85°C

Die synthetisierte cDNA wurde 1:10 verdünnt (20 µl cDNA + 180 µl ddH₂O), gemischt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.4.3.3 *Real-time* PCR

Die *real-time* PCR wurde mit dem SybrGreen® Komplettmix von Abgene durchgeführt. Dazu wurde folgender Reaktionsmix hergestellt und in einer 96 well-Platte vorgelegt:

Ansatz pro Reaktion (Gesamtvolumen 20 µl]	
Komponente	Volumen [µl]
Forward-Primer [10 µM]	0,25
Reverse-Primer [10 µM]	0,25
SybrGreen® Reaktionsmix	12,5
ddH ₂ O	7

Nachfolgend wurde in Doppelbestimmung zu jedem Ansatz 5 µl der cDNA-Verdünnung bzw. als Negativkontrolle H₂O zugegeben und anschließend nach folgendem Temperaturprogramm im iCycler-System von BioRad inkubiert:

.Temperaturprogramm <i>real-time</i> PCR		
Schritt	Zeitraum	Temperatur
Initiale Denaturierung	15 min	95°C
Denaturierung	} 50 Zyklen	15 s
Primeranlagerung		30 s
Elongation		30 s
Finale Elongation	3 min	72°C

Die resultierenden Daten („*Cycle of Threshold*“, Ct-Wert) wurden mit der Analysesoftware

„Relative Expression Software Tool“ (REST) ausgewertet. Die Normalisierung erfolgte durch die Verrechnung mit einem *Housekeeper* (z.B. 18S rRNA).

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Alkalische Phosphatase (ALP)

Die Messung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) gibt Aufschluss über die Osteoblastenaktivität, ist also ein Maß für die Mineralisierung der Zellen. Die ALP ist in der Lage, anorganisches Phosphat aus Pyrophosphatverbindungen zu gewinnen. Die Bestimmung der ALP-Aktivität basiert auf dem bei 405 nm photometrisch messbaren Umsatz des farblosen para-Nitrophenylphosphats (pNPP) in das gelbe para-Nitrophenolat (PNP).

Die primären Chondroprogenitorzellen wurden zweimal mit 1xPBS/Bidest gewaschen, und anschließend wurden pro Loch 500 µl ALP-Puffer I (0.1 M Glycin pH 9.6, 1% NP-40, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂) dazu gegeben. Mit einer Pipettenspitze wurde die Kultur abgekratzt und vollständig in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe einer vorgekühlten Metallkugel wurden die Proben im Tissuelyser homogenisiert und anschließend durch Zentrifugation (13000xg, 4°C, 15 min) die ALP im Überstand gewonnen. 100 µl des Überstandes wurden in eine Vertiefung einer 96er Mikrotiterplatte überführt. Durch Zugabe von 100 µl ALP-Puffer II (0.1 M Glycin pH 9.6, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂, 20 mg pNPP/ml (frisch zugegeben)) wurde die Reaktion gestartet. Die Messung erfolgte in einem auf 37°C erwärmten Plattenphotometer, bei einer Wellenlänge von 405 nm über einen Zeitraum von ca. 30 min. Der Anstieg der Absorption korrespondiert zur ALP Aktivität und gilt als Maß der Osteoblastenaktivität.

2.6 Histochemische Methoden

2.6.1 Alzian Blau-Färbung

Chondroprogenitorzellen können mit Alzian Blau angefärbt werden um die Differenzierung von Vorläuferzellen in Richtung Knorpelzellen sichtbar zu machen.

Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 1 ml Kahles Fixativ (28,9% (v/v) EtOH; 0,37% Formaldehyd; 3,9%(v/v) Essigsäure) für 10 min fixiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBS wurden 500 µl der Alzian Blau-Lösung (1% Alcian blue in 0,1N HCl) zugegeben, die Zellen für 24h inkubiert und anschließend mit dH₂O gewaschen, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Die Zellen wurden dann fotografiert und ihre Färbung qualitativ ausgewertet. Die Färbung kann auch quantitativ ausgewertet werden. Durch Zugabe von 500 µl einer 6 M Guanidiniumhydrochloridlösung wurde der Farbstoff über Nacht aus den Zellen gelöst. 200 µl des Überstandes wurden in einer 96 well-Platte bei 595 nm

photometrisch vermessen.

2.6.2 Alkalische Phosphatase-Färbung (ALP-Färbung)

Auch die alkalische Phosphatase (ALP) kann direkt in den Chondroprogenitorzellen angefärbt werden. Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen, anschließend für 15 min mit 4%PFA/PBS fixiert und wieder mit PBS gewaschen. Es erfolgte die Zugabe von 500 µl CHAP-Puffer (100 mM TRIS, pH 9,5; 100 NaCl, 50 mM MgCl), in dem die Zellen für 30 min inkubiert wurden. Anschließend erfolgte die Zugabe des frisch hergestellten ALP-Substrats NBT-BCIP (45 µl NBT + 35 µl BCIP in 10 ml H₂O). Nach Entfernen von überschüssigem Farbstoff durch Waschen mit TE und dH₂O wurden die Zellen fotografiert und ihre Färbung qualitativ ausgewertet.

2.6.3 Hämatoxylin/Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die Hämatoxylin/Eosin-Färbung dient als Übersichtsfärbung, um die Morphologie eines Gewebes beurteilen zu können. Dabei färbt Hämatoxylin basophile Strukturen (z. B. Zellkern, ER) blau, eosinophile Strukturen (z. B. Plasma) werden durch Eosin rot angefärbt.

Die im Alter von 1 Tag (P1) abgetrennten Extremitätenknospen wurden in PBS gelagert. Das Entwässern und Einbetten in Paraffin erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Pathologie der Charité am Campus Mitte nach Standardprotokoll. Die Paraffinblöcke wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Mit einem Rotationsmikrotom (Leica Microsystems) wurden 2 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Nach dem Trocknen über Nacht bei 37°C im Trockenschrank konnten die Schnitte bei RT gelagert werden. Vor der Färbung wurden die Schnitte im Trockenschrank bei 55°C ca.10 min. angewärmt und dann mittels einer absteigenden Ethanol-Reihe dehydriert (Tab. 2-5). Die Färbung mit Hämatoxylin (1:10 verdünnt, nach Mayer: 0,2% (w/v) Mayer's Hämatoxylin (Chroma,Münster), 6,25% (w/v) Kalialaun, 6, 25% (w/v) Chloralhydrat, 0,125% (w/v) Zitronensäure kristallin, 0,025% (w/v) Natriumjodat (NaIO₃)) erfolgte für 5 min, anschließend wurden die Schnitte für 3 min unter Leitungswasser gebläut. Nach Spülen mit A.dest. wurden die Schnitte für 5 min mit Eosin (1,25% (w/v) Eosin Yellowish (Chroma,Münster), 70% (v/v) EtOH, direkt vor Gebrauch 4% (v/v) Eisessig) gefärbt und anschließend durch eine aufsteigende Ethanolreihe entwässert (Tab. 2-5) und mit Entellan zur langfristigen Lagerung eingedeckelt.

Tab. 2-5: Schritte der H/E-Färbung.

Rehydrierung	Färbung	Dehydrieren
Xylol: 10min (2x)	Hämalaun- Lösung: 5min.	Ethanol 96%: 1 min (2x)
Ethanol- 100%: 5 min (2x)	Warmes Wasser: 5 min.	Ethanol 100%: 1 min(2x)
Ethanol- 96%: 3 min (2x)	Eosin B: 5 min.	Xylol: 1 min (2x)
Ethanol- 70%: 1 min	d.H ₂ O: 2min.	
d.H ₂ O: 5 min (2x)	Ethanol 96%: 1 min (2x)	

Die Schnitte wurden rehydriert, gefärbt, anschließend wieder dehydriert und abschließend durch „Eindeckeln“ mit Entellan haltbar gemacht.

2.7 Knochenmorphologische Methoden

2.7.1 Micro-Computertomographie (μCT)

Die μCT-Untersuchungen wurden in Kooperation mit Dr. Uwe Kornak vom Institut für Medizinische Genetik der Charité Berlin durchgeführt.

Die präparierten Unterschenkel sollten hinsichtlich ihrer Knochenmikroarchitektur untersucht werden und wurden dafür mittels eines Micro-CT vom Fabrikat 'Scanco VivaCT40' vermessen. Folgende Einstellungen wurden dabei verwendet: Voxel 0,1 mm × 0,1 mm × 0,5 mm; Scangeschwindigkeit 2 mm/s; contour mode 1; cortical threshold 350 mg/cm³. Zur quantitativen Auswertung wurde ein *volume of interest* (VOI) von 213 aufeinander folgenden Schnitten distal der Wachstumsfuge definiert. So konnte trabekulärer Knochen bestimmt werden. Alle Messungen erfolgten unter identischen Bedingungen, und zur Auswertung wurde die Scanco-Auswertungssoftware verwendet. Die Ergebnisse wurden als MW±SD angegeben und die statistische Signifikanz mittels *t*-test ermittelt.

Sämtliche im Abschnitt 4.2.2.1 dargestellten knochenmorphologischen Untersuchungen erfolgten in der Gruppe von Prof. Graham Williams am Imperial College London. Knochenmineralgehalt (bone mineral content (BMC)), Knochenlänge (bone length) und Cortexdicke (cortical bone thickness) wurden mittels Faxitron-Röntgenuntersuchungen bestimmt. Die Ergebnisse wurden als MW±SEM angegeben und die statistische Signifikanz mittels *t*-test ermittelt.

2.8 Serumanalytik

2.8.1 Das OPUS-Kollektiv

In der vorliegenden Arbeit wurden Serumproben von postmenopausalen Frauen analysiert, die im Rahmen der OPUS-Studie von Gluer *et al.* (Gluer *et al.* 2004) bereits hinsichtlich ihrer Knochenparameter charakterisiert worden waren. Murphy *et al.* hatten die Probandinnen

bereits hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen Schilddrüsen- und Knochenstatus untersucht (Murphy *et al.* 2010). Wir konnten nun in einer Kooperation mit der Gruppe von Prof. Williams (Imperial College, London) die Probandinnen auf den Zusammenhang zwischen Knochenparametern und Se-Satus untersuchen. Genaue Angaben zu den Ein- und Ausschlussverfahren der Probandinnen sind in Abschnitt 4.3.1 zu finden.

2.8.2 Bestimmung von Spurenelementen

Für die Messung der Gesamtkonzentrationen der unterschiedlichen Spurenelemente und des Calcium wurde die Totalreflektionsröntgenfluoreszenzanalytik (TRFA) herangezogen, die eine simultane Messung mehrerer (Spuren-)elemente erlaubt. Die Bestrahlung der Probe mit Röntgenstrahlen hat die Emission von Fluoreszenzstrahlung zur Folge. Die Wellenlänge und Energie der entstandenen Fluoreszenzstrahlung ist jeweils charakteristisch für die unterschiedlichen Elemente und lässt eine qualitative Zuordnung dieser Elemente zu. Durch Zugabe eines nicht in der Probe enthaltenen Standardelements kann die Konzentration der enthaltenen Elemente bestimmt werden. Für die Analyse der Serumproben wurde das humane Serum mit A. dest. 1:2 verdünnt. Das für die Verdünnung verwendete A. dest. enthielt bereits das Standardelement Gallium in einer Konzentration von 2 mg/ml. 10 µl der so verdünnten Serumprobe wurden auf ein Quarzplättchen gegeben und eingetrocknet. Die Spurenelementbestimmung erfolgte in Doppelbestimmung. Blasenfrei getrocknete Proben wurden jeweils über 1000 Sekunden in einem TRFA Spektrometer (S2 PICOFOX, Bruker AXS Microanalysis GmbH, Berlin) vermessen. Die Quantifizierung erfolgte mit der Picofox2-Software.

2.8.3 SePP-Assay

Die quantitative Bestimmung von Selenoprotein P (SePP) erfolgte im Triplikat mittels eines an unserem Institut entwickelten Sandwich-ELISAs. Alle eingesetzten Reagenzien sowie die Standardreihe wurden über ICI Berlin bezogen und sind inzwischen in leicht modifizierter Form als Selenotest LIA Kit (ICI GmbH, Berlin) kommerziell zu erwerben. Die Serumproben wurden 1:78 mit Probenpuffer (100 mM KH_2PO_4 , 200 mM K_2HPO_4 , 100 mM NaCl, 10 mM Na-EDTA, 0,5% BSA, 0,09% NaN_3 , 0,1% Rind IgG, 0,1% IgG, pH 7,4) verdünnt, welcher auch für das Lösen der lyophilisierten Standards und des Tracers verwendet wurde. Je 50 µl der Standards und Proben wurden in beschichtete Polystyrolröhrchen (CTs = Coated tubes) gegeben. Direkt im Anschluss wurden in jedes CT 200 µl Tracer gegeben und die Proben für zwei Stunden im Dunklen bei Raumtemperatur und 300 rpm geschüttelt. Nach zwei Stunden wurden die Proben viermal mit 1 ml Waschpuffer (400 mM Tris; 3 M NaCl; 1% Tween 20; 0,001% Entschäumer) gespült und am Ende gut ausgeklopft und für ca. 5 min über Kopf getrocknet. Danach erfolgte die SePP Quantifizierung durch Lumineszenzmessung in einem Kettenluminometer (Berthold, Modell LB 953) nach automatischer Zugabe von 300 µl

Material und Methoden

Basisreagenz 1 (100 mM HNO₃; 0,5% H₂O₂) und 300 µL Basisreagenz 2 (250 mM NaOH). Die Berechnung der SePP- Konzentration erfolgte auf Basis einer Standardreihe von Humanseren bekannten SePP-Gehalts.

2.9 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS. Die Daten wurden zunächst auf Normalverteilung überprüft (Kolmogorov-Smirnov Test) und dann entsprechend mittels Student's t-Test für normalverteilte bzw. Mann-Whitney-U-Test für nicht normalverteilte Daten getestet. Die Auswertung der Serumanalytik der OPUS-Probandinnen erfolgte in Kooperation mit der Gruppe von Prof. Williams und mit SPSS. Die verwendeten Tests sind in den einzelnen Abbildungen aufgeführt. Die graphische Darstellung erfolgte mit GraphPad Prism 4. Die Fehlerbalken der Diagramme stellen den Standardfehler des Mittelwertes (SEM = *standard error of the mean*) dar. Signifikanzen sind angegeben mit *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

3 Zielsetzung der Arbeit

Die in unserem Institut generierte *SepP*-KO-Maus weist einen Wachstumsphänotyp auf, welcher sich jedoch nicht eindeutig auf eine veränderte hormonelle Regulation des Wachstums über die Growth-Hormon- und IGF-Achse zurückführen lässt. Eine Vermutung ist, dass die Knochenentwicklung in den Tieren gestört ist. In der hier vorliegenden Arbeit soll deshalb untersucht werden, welche Rolle die veränderte Se-Versorgung für den Knochenstoffwechsel der Mäuse spielt. Durch Deletion des Se-Transportproteins SepP weisen die Tiere sowohl einen veränderten Se-Status als auch eine veränderte Expression der Selenoproteine auf (Schomburg *et al.* 2003). Um den Einfluss von Se auf die Knochenentwicklung und Homöostase zu testen, wurden sowohl entsprechende *in vitro* als auch *in vivo* Untersuchungen durchgeführt.

Für die *in vitro* Untersuchungen wurde als Modell die murine Micromass Zellkultur mit embryonalen Chondroprogenitorzellen und die aus der Mausleber gewonnenen Hepa1-6 Zellen verwendet. Diese Ergebnisse werden im ersten Abschnitt präsentiert.

In einem zweiten Ergebnis-Komplex sollen die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse auf die Maus übertragen werden. Studien von Moreno-Reyes, Cao und anderen zeigen, dass ein Se-Mangel Veränderungen im Knochen hervorrufen können, von Wachstumsverzögerungen bis hin zu degenerativen Erscheinungen (Cao *et al.* 2012; Moreno-Reyes *et al.* 2001; Ren *et al.* 2007). Wir vermuten, dass eine veränderte SepP-Expression sich im Knochengewebe der *SepP*-KO und *SepP*-heterozygoten Mäusen molekular niederschlägt und eine veränderte Mikroarchitektur, veränderte Knochendichte (BMD) und einen veränderten Mineralisierungsgrad (BMC) bewirkt. Riese *et al.* konnten zeigen, dass die Regulation der Selenoproteinexpression gewebs- und geschlechtsspezifisch erfolgt (Riese *et al.* 2006). Darüber hinaus sind Steroidhormone wichtige Regulatoren des Knochenstoffwechsels, in dem sie Differenzierung und Lebensdauer von Osteoblasten und Osteoklasten regulieren (Manolagas 2013). Sie induzieren die Differentiation von Osteoblasten und hemmen die der Osteoklasten (Kousteni *et al.* 2002; Weinstein *et al.* 2002). Dabei sind sowohl Testosteron als auch Östrogen zentrale regulatorische Faktoren, da z.B. ein postmenopausaler Östrogenmangel als Hauptursache einer hormonell bedingten Osteoporose angesehen wird (Frenkel *et al.* 2010). Um zu untersuchen, ob Geschlecht und eine gestörte Se-Versorgung sich in einem veränderten Knochenmetabolismus niederschlagen, wurden Mäuse in einem ersten Versuch bis zum Alter von 34 Tagen auf Se-adäquatem (RDA) Futter gehalten und anschließend die Knochenmorphologie untersucht. Um neben der geschlechtsspezifischen auch die altersbedingte Regulation der Knochenphysiologie zu untersuchen, wurden in einer zweiten Versuchsanordnung Tiere auf RDA-Futter gehalten und nach 14, 80 bzw. 159 Tagen getötet und ihre Knochen analysiert sowie bestimmte für die Regulation des

Zielsetzung der Arbeit

Knochenstoffwechsels wichtige Organe untersucht.

Dank einer Kooperation war es möglich den Einfluss vom Se-Status auf die Schilddrüsenachse und damit einhergehend auf die Knochenparameter und das Frakturrisiko in einer exzellent charakterisierten Kohorte europäischer postmenopausaler Frauen zu untersuchen. Der dritte Ergebnis-Komplex widmet sich der Auswertung dieser klinischen Daten.

4 Ergebnisse

4.1 *In vitro* ist die Chondrogenese Se-abhängig

4.1.1 Murine Micromass-Zellkultur

Um den Einfluss von Selen bzw. SepP auf die Knochendifferenzierung zu untersuchen, wurden Knorpelvorläuferzellen aus Mäuseembryonen isoliert und unter verschiedenen Bedingungen inkubiert. Um den Einfluss des Genotyps zu untersuchen, wurden Zellen von *SepP*-Wildtyp-Tieren (WT) und *SepP*-Knockout-Tieren (KO) isoliert und inkubiert. Da mehrere Muttertiere zur Isolation der Zellen verwendet wurden, gab es Unterschiede im Entwicklungsstadium der Embryos. Einige wt-Embryonen waren deutlich weiter entwickelt und wurden separat (WT-extra) inkubiert. Bei den KO-Embryos wurden keine großen Unterschiede festgestellt, so dass alle Zellen gemeinsam inkubiert wurden (KO). Die Zellen wurden mit 100 nM NaSe (+ NaSe) bzw. mit PBS (-NaSe) stimuliert, um den direkten Einfluss von Se auf die Differenzierung der Chondroprogenitorzellen zu analysieren. Dafür wurden die Zellen sieben bzw. 14 Tage im Brutschrank inkubiert. Die Chondroprogenitorzellen wurden durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren und anderen Stimulanzen in die Differenzierung gedrängt. Dabei konnten sie unter anderem Knorpelgewebe bilden, was sich mit Alzian Blau (AB) anfärben lässt. Nach sieben bzw. 14 Tagen wurden die Zellen mit Alzian Blau angefärbt, um die Knorpelbildung sichtbar zu machen.

Ergebnisse

Die Auswertung der Blaufärbung erfolgte qualitativ (Abb. 4-1) und quantitativ (Abb. 4-2)

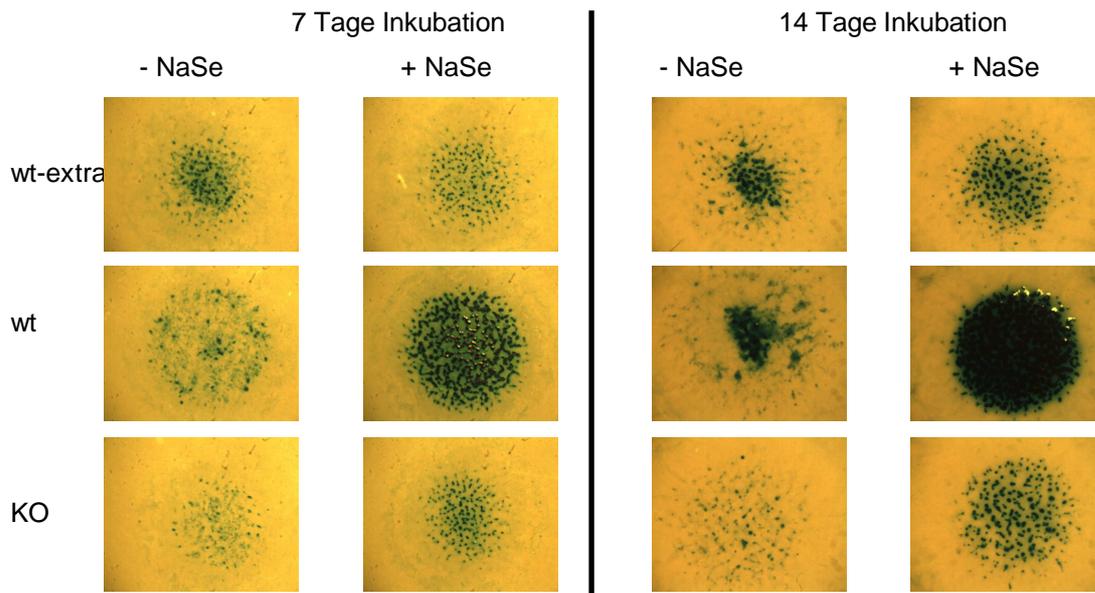


Abb. 4-1: Qualitative Auswertung der AB-Färbung nach sieben bzw. 14 Tagen Inkubation mit oder ohne 100 nM NaSe-Supplementation. Es wurden embryonale Chondroprogenitorzellen aus Wildtyp (WT) und *SepP*-KO (KO)-Tieren isoliert und unter verschiedenen Bedingungen inkubiert. Bereits nach sieben Tagen war ein deutlicher Einfluss des Genotyps und der Selenstimulation zu erkennen.

Ein deutlicher Einfluss der Selengabe aber auch des *SepP*-Genotyps auf die Chondrogenese war zu beobachten. Die Gabe von NaSe führte im WT bereits nach sieben Tagen zu einer deutlichen Knorpelbildung. Nach insgesamt 14 Tagen Inkubation war auch in den KO-Tieren eine stärkere Differenzierung zu Knorpelzellen zu beobachten, wenn auch schwächer ausgeprägt als in den WT-Tieren. Die Färbung wurde zusätzlich quantitativ ausgewertet, um die Unterschiede biostatistisch zu erfassen und stärker hervorzuheben.

Ergebnisse

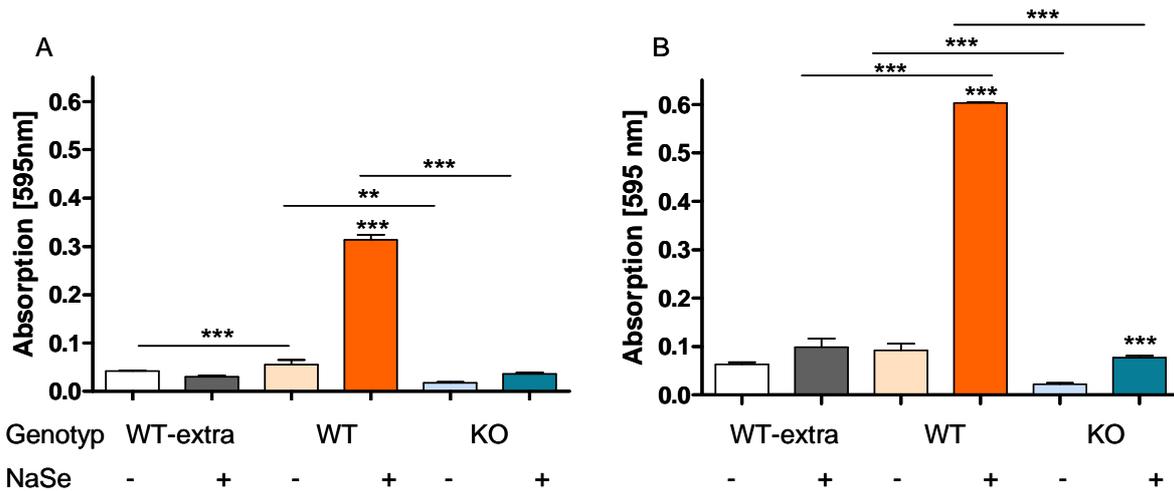


Abb. 4-2 Quantitative Auswertung der AB-Färbung nach sieben (A) bzw. 14 Tagen (B) Inkubation mit oder ohne 100 nM NaSe-Supplementation. Es wurden embryonale Chondroprogenitorzellen aus Wildtyp (WT) und *SepP*-KO (KO)-Tieren isoliert und unter verschiedenen Bedingungen inkubiert. Es war ein deutlicher positiver Einfluss des *SepP*-Genotyps und der Selenstimulation auf die Knorpeldifferenzierung zu erkennen. (n=3, Bonferroni, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

Es wurde in diesem Versuch deutlich, dass nicht nur der Se-Status sondern auch der *SepP*-Genotyp einen großen Einfluss auf die Chondrogenese der Zellen hatte. So konnte durch Se-Supplementation die Blaufärbung und somit der Anteil an differenzierten Knorpelzellen in den WT-Zellen um das Dreifache gesteigert werden. Diese Steigerung war bereits nach sieben Tagen statistisch signifikant. In den KO-Tieren war die Steigerung nicht so dramatisch, aber gerade nach 14d auch deutlich zu beobachten und statistisch signifikant. Die Knorpeldifferenzierung ging in den WT-Zellen deutlich schneller und stärker voran als in den KO-Zellen. So erreichte die AB-Färbung der mit NaSe stimulierten KO-Zellen erst nach knapp zwei Wochen die Intensität der Färbung der unstimulierten WT -Zellen. Besonders auffällig war das extrem schmale Zeitfenster, in dem eine NaSe-Gabe einen Einfluss auf die Knorpeldifferenzierung hatte. Die WT-extra-Zellen stammten aus Embryonen, die ca. einen halben Tag älter waren als die WT-Embryonen. In ihnen war jedoch fast kein Einfluss der NaSe-Supplementation auf die Chondrogenese zu beobachten. Die AB-Färbung entsprach ungefähr der der KO-Zellen, unabhängig davon, ob die Zellen mit NaSe stimuliert wurden oder nicht. Der positive Einfluss von Se scheint somit im Zeitfenster E11 bis E12 Tage am stärksten zu sein.

Um zusätzlich die Mineralisierungskapazität der differenzierten Zellen zu untersuchen, kann die Alkalische Phosphatase (ALP) angefärbt werden. Diese gilt als Maß für die Osteoblastenaktivität und gewinnt anorganisches Phosphat aus Pyrophosphat, welches dann in Form von Hydroxyapatit die Knochenmatrix bilden kann.

Ergebnisse

Nach sieben bzw. 14 Tagen wurden die Zellen auf ALP-Aktivität untersucht und die Färbung qualitativ (Abb. 4-3) und quantitativ (Abb. 4-4) ausgewertet.

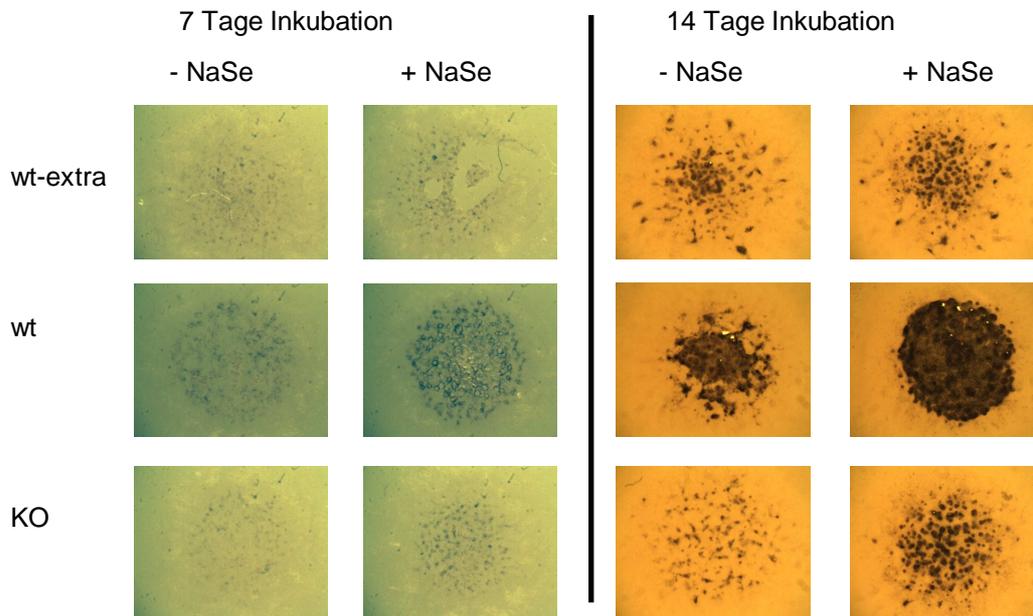


Abb. 4-3: Qualitative Auswertung der ALP-Färbung nach sieben bzw. 14 Tagen Inkubation mit oder ohne 100 nM NaSe-Supplementation. Es wurden embryonale Chondroprogenitorzellen aus Wildtyp (WT) und *SepP*-KO (KO)-Tieren isoliert und unter verschiedenen Bedingungen inkubiert. Ein deutlicher Einfluss des Genotyps und der Selenstimulation war zu beobachten, der bereits nach sieben Tagen deutlich sichtbar wurde.

Ähnlich der AB-Färbung war ein großer Unterschied zwischen Se-reichen und Se-armen Zellen zu beobachten. Die mit NaSe stimulierten Zellen wiesen eine deutlich stärkere Färbung auf, als die nicht stimulierten. Die Effekte traten jedoch langsamer ein als bei der eben beschriebenen Alzian Blau-Färbung. Nach sieben Tagen war ein Trend und erst nach 14 Tagen ein deutlicher Unterschied zu beobachten.

Ergebnisse

Um den Effekt noch sichtbarer zu machen, wurde die Färbung quantitativ ausgewertet (Abb. 4-4).

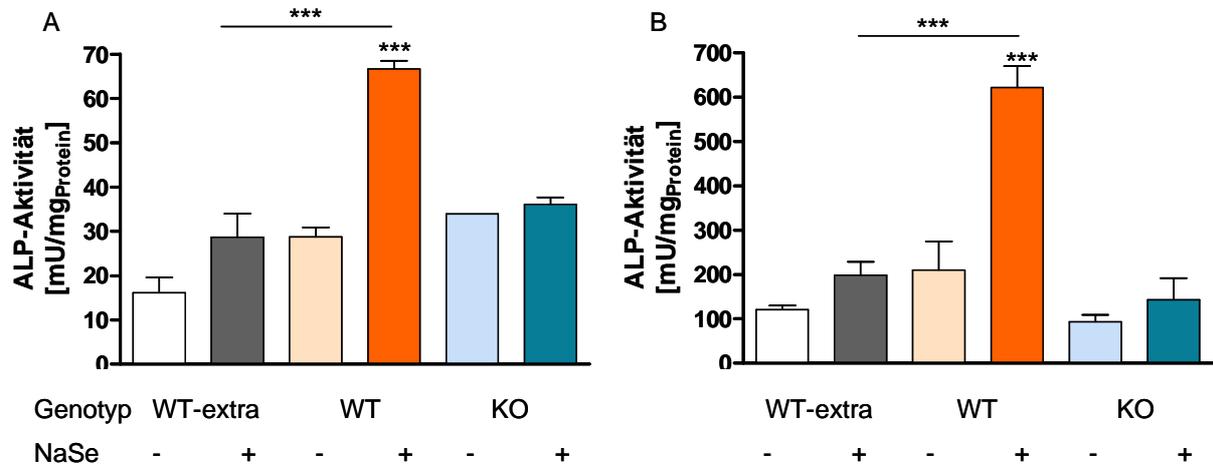


Abb. 4-4: Quantitative Auswertung der ALP-Färbung nach sieben (A) bzw. 14 Tagen (B) Inkubation mit oder ohne 100 nM NaSe-Supplementation. Es wurden embryonale Chondroprogenitorzellen aus Wildtyp (WT) und *SepP*-KO (KO)-Tieren isoliert und unter verschiedenen Bedingungen inkubiert. Sowohl Se als auch der *SepP*-Genotyp hatten einen starken Einfluss auf die ALP-Aktivität. (n=3, Bonferroni, * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001)

Eine NaSe-Supplementation hatte in allen untersuchten Zellen einen stimulierenden Effekt auf die ALP-Aktivität. Am stärksten und statistisch signifikant fiel dieser Effekt wiederum bei den WT-Zellen aus. So betrug die gemessene ALP-Aktivität der stimulierten WT-Zellen knapp das Vierfache der Aktivität in den stimulierten WT-extra-Zellen. In den KO-Zellen erreichte die ALP-Aktivität mit NaSe-Stimulation ungefähr das Niveau der WT-extra-Zellen. Es war zusätzlich wieder ein Genotyp-Effekt zu beobachten. Fehlte den Zellen von vornherein *SepP*, so erhöhte die NaSe-Supplementation die ALP-Aktivität wenig und die Zelldifferenzierung blieb eingeschränkt. Wiederum war ein enges Zeitfenster der Se-Wirkung zu beobachten: die WT-extra-Zellen reagierten deutlich schwächer auf eine Stimulation mit NaSe als die etwas jüngeren WT-Zellen.

Um die Unterschiede in der Differenzierung auf der Genebene nachvollziehen zu können, wurde die Expression verschiedener Gene auf mRNA-Ebene mittels real-time-PCR untersucht. Es wurde dabei die Expression der *Col1a2* Kette des Typ I Kollagens, des für Osteoblasten wichtigen Transkriptionsfaktors *Runx2*, der alkalischen Phosphatase (ALP) und des VitD-Rezeptors (VDR) bestimmt. Abb. 4-5 stellt die Ergebnisse für die WT- und KO-Zellen dar.

Ergebnisse

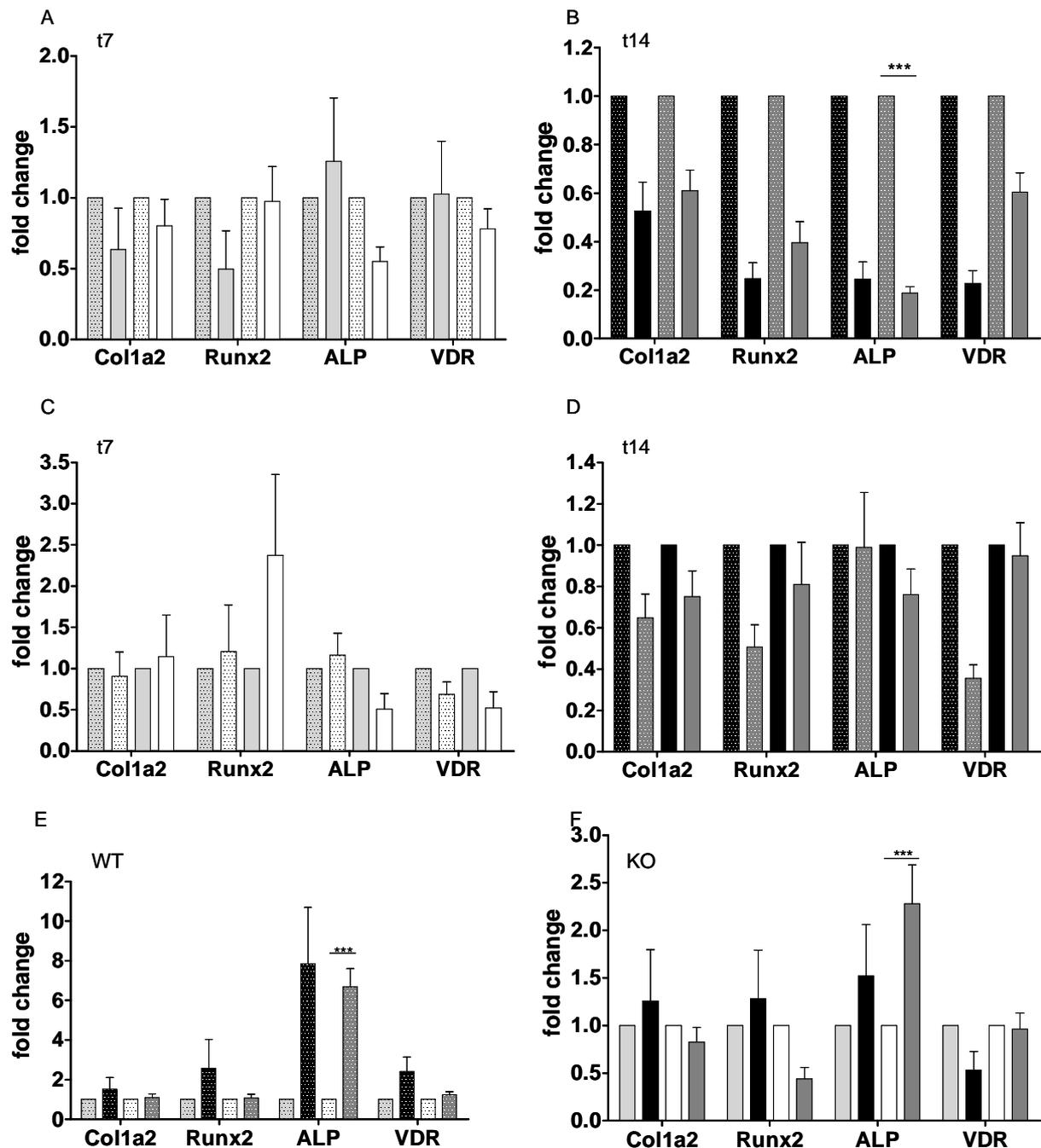


Abb. 4-5 Differentielle Genexpression in der murinen Micromass-Zellkultur. A+B: Einfluss *SepP*-Genotyp, C+D: Einfluss Se-Stimulation, E+D: Einfluss der Stimulationsdauer. Gepunktet: WT, Einfarbig: KO, hell: t7, dunkel: t14. Embryonale Chondroprogenitorzellen wurden aus WT- und KO-Tieren gewonnen und mit bzw. ohne 100 nM NaSe-Gabe für sieben oder 14 Tage inkubiert. Anschließend wurde die mRNA isoliert und die Expression verschiedener mRNAs mittels spezifischer Primer nachgewiesen. Signifikante Unterschiede traten in der Expression der ALP in nicht stimulierten Zellen auf. (n=3, REST (Pfaffl et al. 2002), * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001)

Es konnten keine großen Unterschiede in der Expression dieser Gene in Abhängigkeit vom Genotyp (Abb. 4-5 A,B), Selenstatus (Abb. 4-5 C,D) oder Dauer der Differenzierung (Abb. 4-5 E,F) beobachtet werden. Einzig die ALP wurde in KO-Zellen ohne Se-Supplementation

Ergebnisse

signifikant schwächer exprimiert als in den ebenfalls unstimulierten WT-Zellen. Ein reiner Se-Effekt konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 4-5 C,D). Jedoch wird in Abb. 4-5 E,F deutlich, dass die ALP relativ spät in der Differenzierung exprimiert wurde, war sie doch in beiden Zelltypen nach 14 Tagen signifikant stärker exprimiert.

4.1.2 Hepa1-6-Zellen

Bestimmte für das Wachstum und den VitD-Haushalt wichtige Gene, wie z.B. VDBP, Cyp27a1, IGFBP2 und IGF1 werden in der Leber exprimiert. Um zu untersuchen, inwiefern diese Gene durch Se-Stimulation reguliert werden, wurden aus der Maus gewonnen Leberzellen (Hepa1-6) mit unterschiedlichen Konzentrationen von NaSe und SeMet inkubiert und die Veränderung im Expressionsmuster der genannten Gene mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Die Ergebnisse für NaSe und SeMet sind in Abb. 4-6 dargestellt.

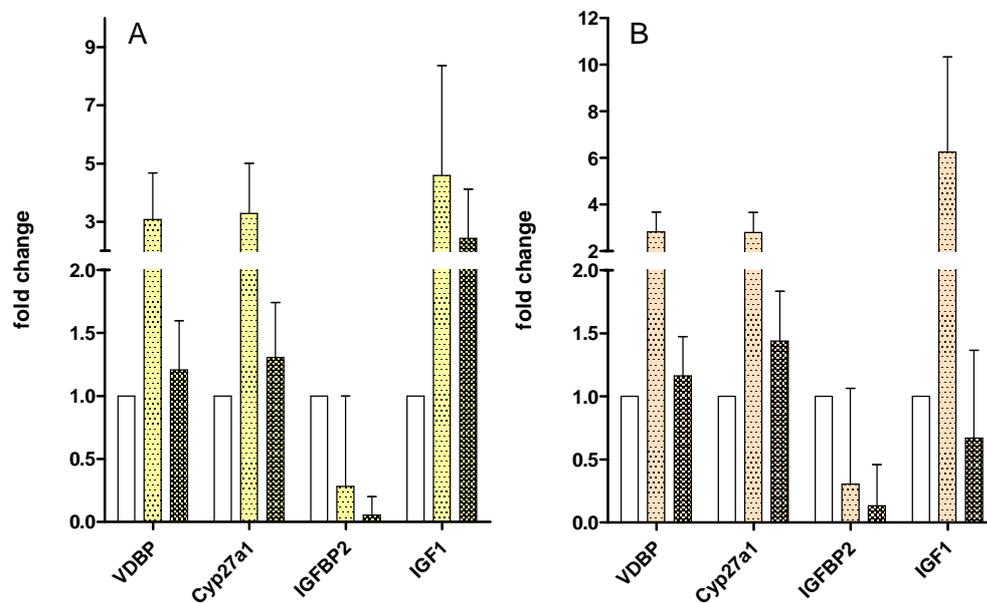


Abb. 4-6: Differentielle Genexpression der Knochen- bzw. Wachstumsspezifischer Gene in Hepa 1-6 Zellen in Abhängigkeit vom Se-Status. A: Stimulation mit NaSe, B: Stimulation mit SeMet. Die weißen Balken stellen die unstimulierten, nur mit PBS behandelten Kontrollzellen dar, die gepunkteten Balken Zellen mit 10 nM Se-Gabe und die schraffierten Balken Zellen mit 100 nM Se-Gabe. Die Expression von knochenrelevanten Genen in Hepa1-6 Zellen war nicht signifikant durch den Selenstatus reguliert. Die Gabe von 10 nM NaSe bzw 10 nM SeMet bewirkte tendenziell die größte Steigerung der Genexpression von VDBP, Cyp27a1 und IGF1. IGFBP2 wurde durch Se-Stimulation herunter reguliert, allerdings nicht signifikant. (n=6, REST (Pfaffl et al. 2002) * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

Es konnte keinerlei signifikante Regulation festgestellt werden. Interessanterweise schien eher die Supplementation mit 10M Se einen stimulierenden Einfluss auf die Expression der hier untersuchten Gene zu haben. So war für alle untersuchten Gene, außer IGFBP2 sowohl bei 10 nM NaSe also auch bei 10 nM SeMet eine, wenn auch nicht signifikante Zunahme um

Ergebnisse

Faktor drei bis 4 an Transkripten festzustellen. Bei einer Stimulation mit 100 nM Se fiel die Expressionssteigerung deutlich geringer aus. Im Falle von IGF1 führte die Se-Supplementation zu einer Abnahme der Expression auf knapp 10%, die bei höherer Se-Konzentration stärker ausfiel. Nachfolgend wurden die beiden Se-Formen auf ihre Wirkung untersucht. Der Vergleich des Einflusses von NaSe bzw. SeMet auf die Genexpression ist in Abb. 4-7 dargestellt.

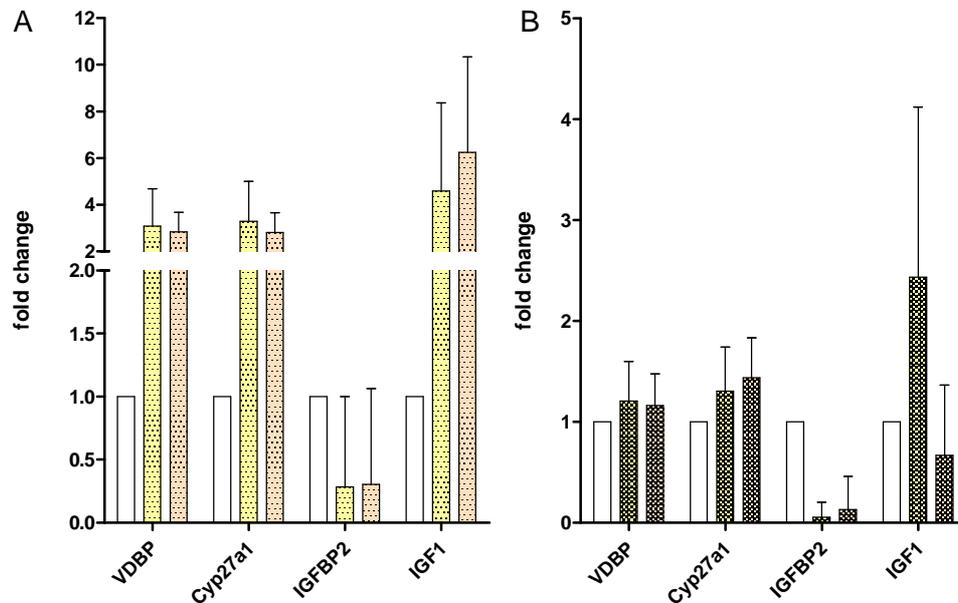


Abb. 4-7: Differentielle Genexpression Knochen- bzw. Wachstumsspezifischer Gene in Hepa 1-6 Zellen in Abhängigkeit der verwendeten Se-Formen. A Stimulation mit 10 nM Se, B. Stimulation 100 nM Se. Die weißen Balken stellen die unstimulierten, nur mit PBS behandelten Kontrollzellen dar. Gelb dargestellt sind die mit NaSe supplementierten Zellen, wohingegen die mit SeMet stimulierten Zellen durch die rosa Balken repräsentiert werden. Die Se-Form hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression. (n=6, REST (Pfaffl et al. 2002) * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

Se wird häufig in Form SeMet-haltiger Hefe oder als anorganisches NaSe supplementiert. Im Falle der Hepa1-6-Zellen machte es keinen Unterschied, mit welcher der beiden Se-Formen supplementiert wurde. Beide Se-Formen lösten eine verstärkte Expression von VDBP, Cyp27a1 und IGF1 aus und induzierten eine verringerte Expression der IGF2BP2-mRNA. Alle Regulationen erwiesen sich jedoch als nicht signifikant.

4.2 *In vivo* hat der Se-Status Einfluss auf die Knochenhomöostase

4.2.1 *SepP*-Knockout Mausmodell

In unserem Institut wurde die *SepP*-Knockout-Maus entwickelt und charakterisiert. Es konnte festgestellt werden, dass die homozygoten Knockout-Tiere deutlich kleiner waren, als ihre Wildtyp-Geschwister (Schomburg et al. 2003). Um die zugrunde liegende Ursache zu klären, wurden für eine erste Einschätzung micro-Computertomographie-Aufnahmen (μ CT-

Ergebnisse

Aufnahmen) der Unterschenkelknochen (Tibia) gemacht und quantitativ ausgewertet. Zusätzlich wurde die Genexpression bestimmter Gene des VitD-Stoffwechsels und einiger Selenoproteinen untersucht. Es wurden 34d alte Tiere, die RDA-Futter erhielten und damit als ausreichend mit Se-versorgt galten, analysiert.

4.2.1.1 Knochenmorphologie in Abhängigkeit vom Genotyp

Im Rahmen der microCT-Untersuchungen wurde die Knochendichte von je vier männlichen und weiblichen Tieren analysiert, wobei sowohl Wildtypen als auch Knockout-Tiere untersucht wurden. Es wurde die Knochendichte der Unterschenkelknochen, das Gesamt-, das Knochenvolumen und das Verhältnis aus beiden Volumina bestimmt. Abb. 4-8 gibt die Ergebnisse für den Vergleich von WT- und KO-Tieren für Männer und Weibchen wieder.

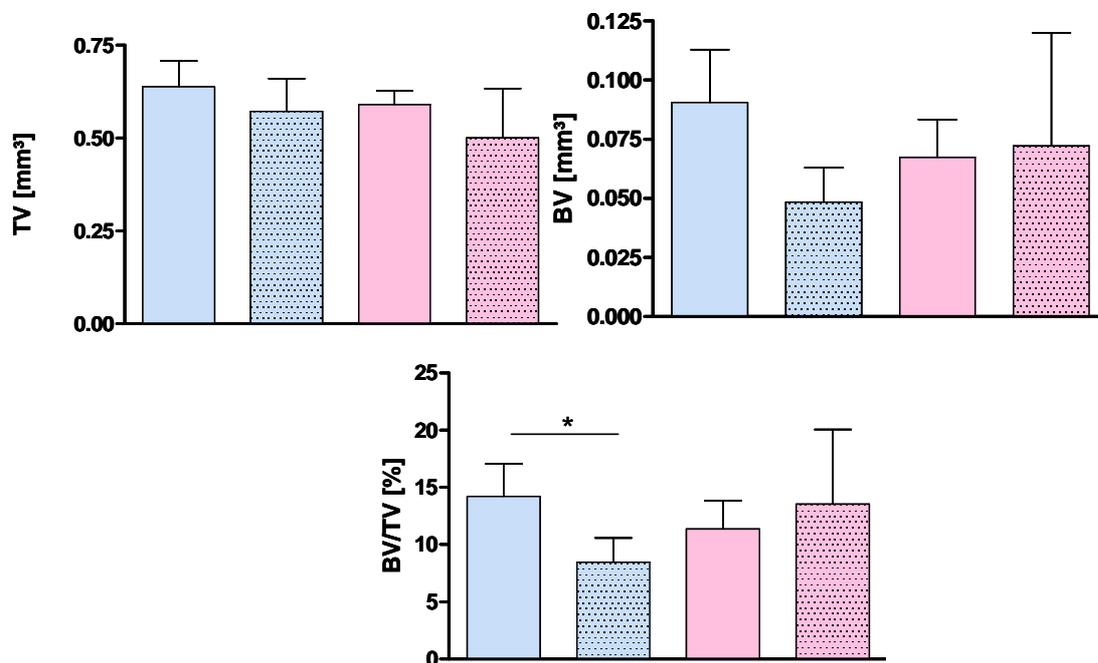


Abb. 4-8: MicroCT-Analyse der Unterschenkelknochen von P34 alten Tieren. Blau: Männchen, rosa: Weibchen. unschraffierte Balken: WT, schraffiert: KO. Es wurde eine 100 µm Zone 30 µm unterhalb der Wachstumsfuge analysiert. Die Auswertung erfolgte hinsichtlich des Gesamtvolumens (TV), des Knochenvolumens der Trabekel (BV) und dem Verhältnis, der so genannten Knochendichte (BV/TV). Es traten signifikante Unterschiede im BV/TV-Verhältnis zwischen KO- und WT-Männchen auf. (n=4, t-Test, * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001)

Es konnte ein signifikanter Unterschied im BV/TV-Verhältnis zwischen männlichen Wildtypen und KO-Tieren festgestellt werden. Dabei lag das BV/TV-Verhältnis der KO-Tiere knapp 30% unter dem der Wildtypen. Ob sich dies in Anzahl oder Dichte der Trabekel widerspiegelt, wird in Abb. 4-9 dargestellt.

Ergebnisse

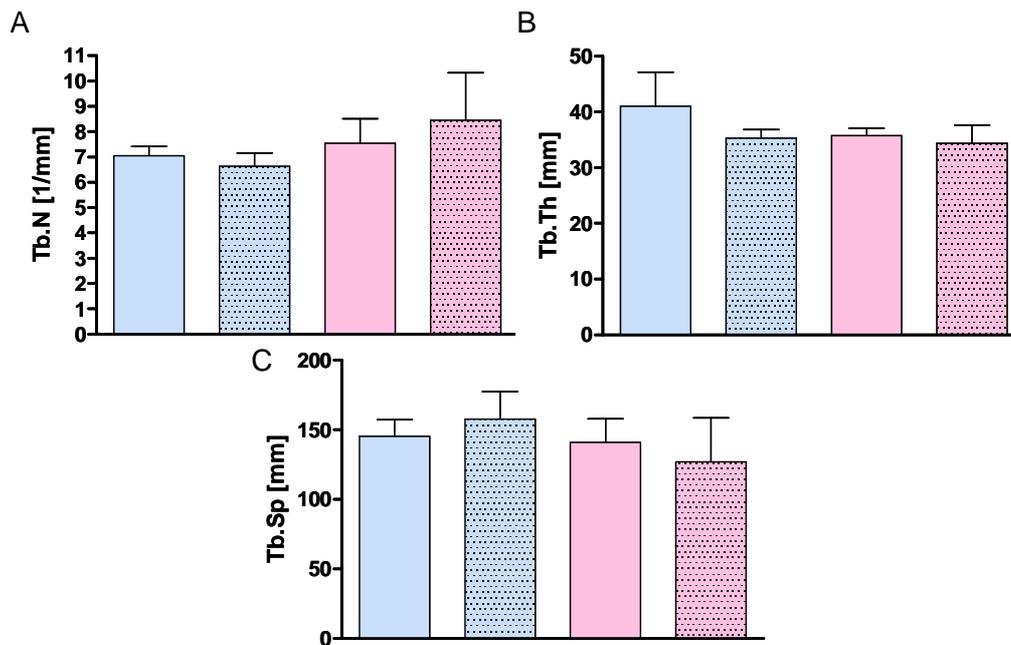


Abb. 4-9: MicroCT-Analysen der Trabekel von P34-Tieren auf RDA-Futter. Es sind in A. die Anzahl (Tb.N), in B. die Dicke (Tb.Th) und in C. die Dichte (Tb.Sp.) der Trabekel im Vergleich der beiden Geschlechter und Genotypen dargestellt. Blau: Männchen, rosa: Weibchen. unschraffierte Balken: WT, schraffiert: KO. Keinerlei signifikante Unterschiede wurden beobachtet. In den Männchen gab es einen leichten Trend zu einer veränderten Mikroarchitektur in den KO-Tieren ($n=4$, t-Test, * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$, *** = $p<0,001$).

Die unterschiedlichen Genotypen unterschieden sich nicht signifikant in Anzahl, Dicke und Dichte der Trabekel innerhalb der Tibia. Jedoch schien es einen leichten Trend zu einer geringeren Anzahl dünnerer Trabekel in den männlichen KO-Tieren im Vergleich zu den WT-Tieren zu geben. Zwischen Männchen und Weibchen gab es unabhängig vom Genotyp ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

4.2.1.2 Genexpressionsanalysen

Die Knochenphysiologie wird maßgeblich durch VitD und den Ca-Haushalt des Organismus mitbestimmt. Deshalb wurde die Genexpression wichtiger Enzyme der VitD Biosynthese untersucht, die 25'-Hydroxylasen Cyp27a1, Cyp2r3 und Cyp3a4, die 1-Hydroxylase (Cyp27b1) und die 24-Hydroxylase Cyp24a1. Ebenso wurde die Expression der beiden, für die Calcium-Homöostase wichtigen Hormone Parathormon (PTH) und Calcitonin (Calca) untersucht. Abb. 4-10 zeigt das Ergebnis der Genexpressionsanalysen für beide Geschlechter und Genotypen.

Ergebnisse

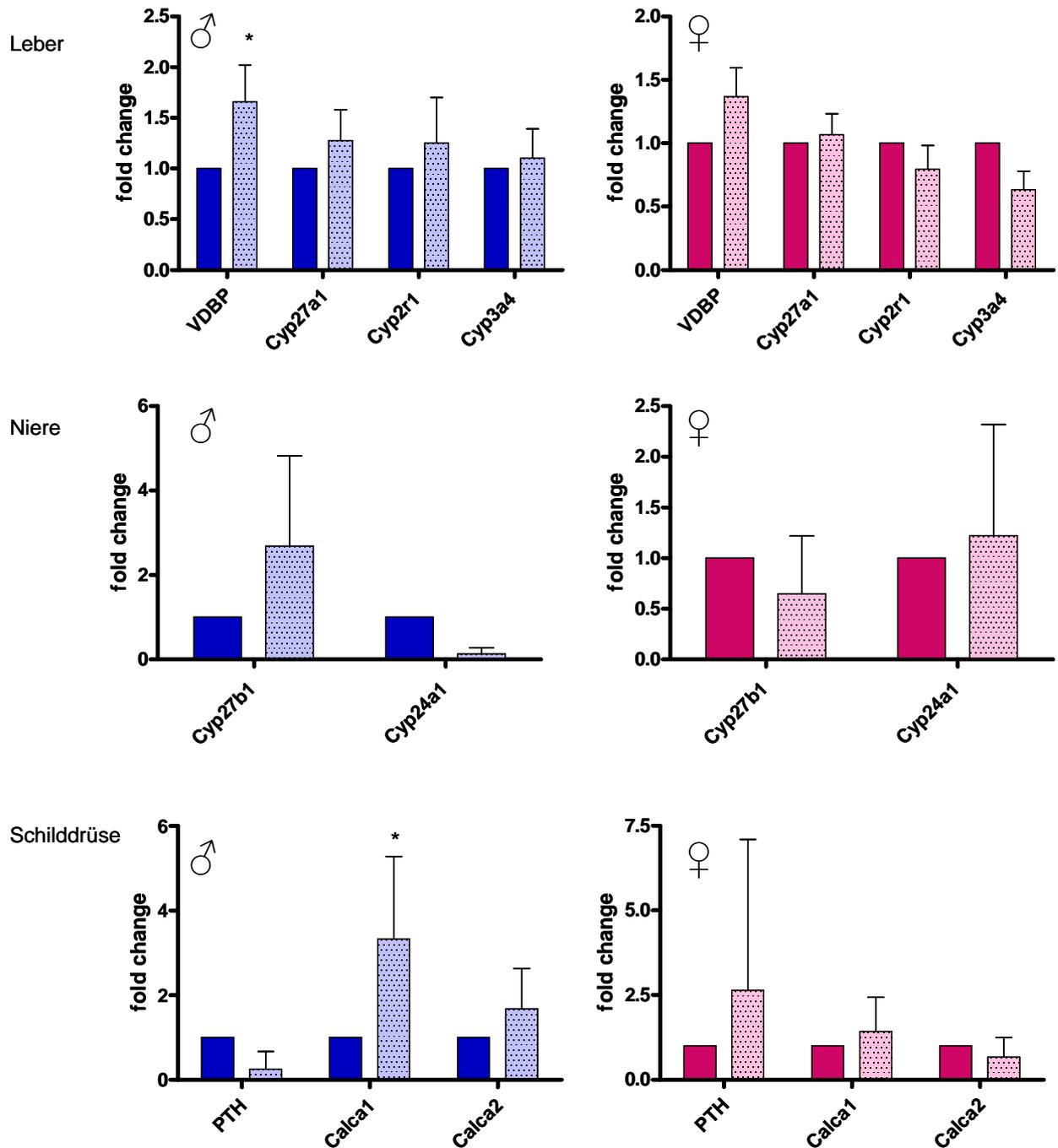


Abb. 4-10: Differentielle Genexpression in Leber, Niere und Schilddrüse in Abhängigkeit vom *SepP*-Genotyp. Blau, Männchen, rot, Weibchen. dunkel: WT, hell + gepunktet: KO. Im Männchen waren signifikante Unterschiede zwischen WT und KO in der Expression von VDBP und Calca1a zu beobachten. Beide Gene wurden in den KO-Tieren stärker exprimiert. Bei den Weibchen gab es Tendenzen, jedoch keinerlei signifikante Unterschiede. (n=6, statistische Auswertung mit REST (Pfaffli et al. 2002) * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001)

Nur in den Männchen waren signifikante Unterschiede festzustellen. So war in der Leber das VitD-Bindeprotein, welches für den Transport von VitD und seiner Metabolite im Blut benötigt wird, in den KO-Tieren signifikant um den Faktor 1,5 stärker exprimiert als in den Wildtypen. Zusätzlich war Calcitonin in der Schilddrüse von KO-Tieren stark erhöht: Die KO-Tiere

Ergebnisse

exprimierten knapp die vierfache Menge an Calcitonin. Zusätzlich schien es einen Trend zu verringerter Expression von PTH in der Schilddrüse der KO-Tiere und von Cyp24a1 in der Niere zu geben. Diese Reduktion auf ein Viertel bzw. ein Achtel war allerdings aufgrund der großen Streuung innerhalb der untersuchten Tiere nicht statistisch signifikant. Die Unterschiede in den Männchen waren im Großen und Ganzen jedoch sehr gering. In den Weibchen schien es einen leichten Trend zu einer erhöhten PTH-Expression in den Schilddrüsen der KO-Tieren, sowie einen Trend zu einer leicht erhöhten VDBP Expression in der Leber der KO-Weibchen zu geben. Doch auch hier, konnte aufgrund der großen Streuung innerhalb der Gruppe kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Da bestimmte Gene geschlechtsspezifisch reguliert werden, wurden die oben genannten Gene hinsichtlich ihrer geschlechtsspezifischen Expression untersucht. Das Ergebnis des Vergleichs der Genexpression in männlichen und weiblichen WT- bzw. KO-Tieren ist in Abb. 4-11 dargestellt.

Ergebnisse

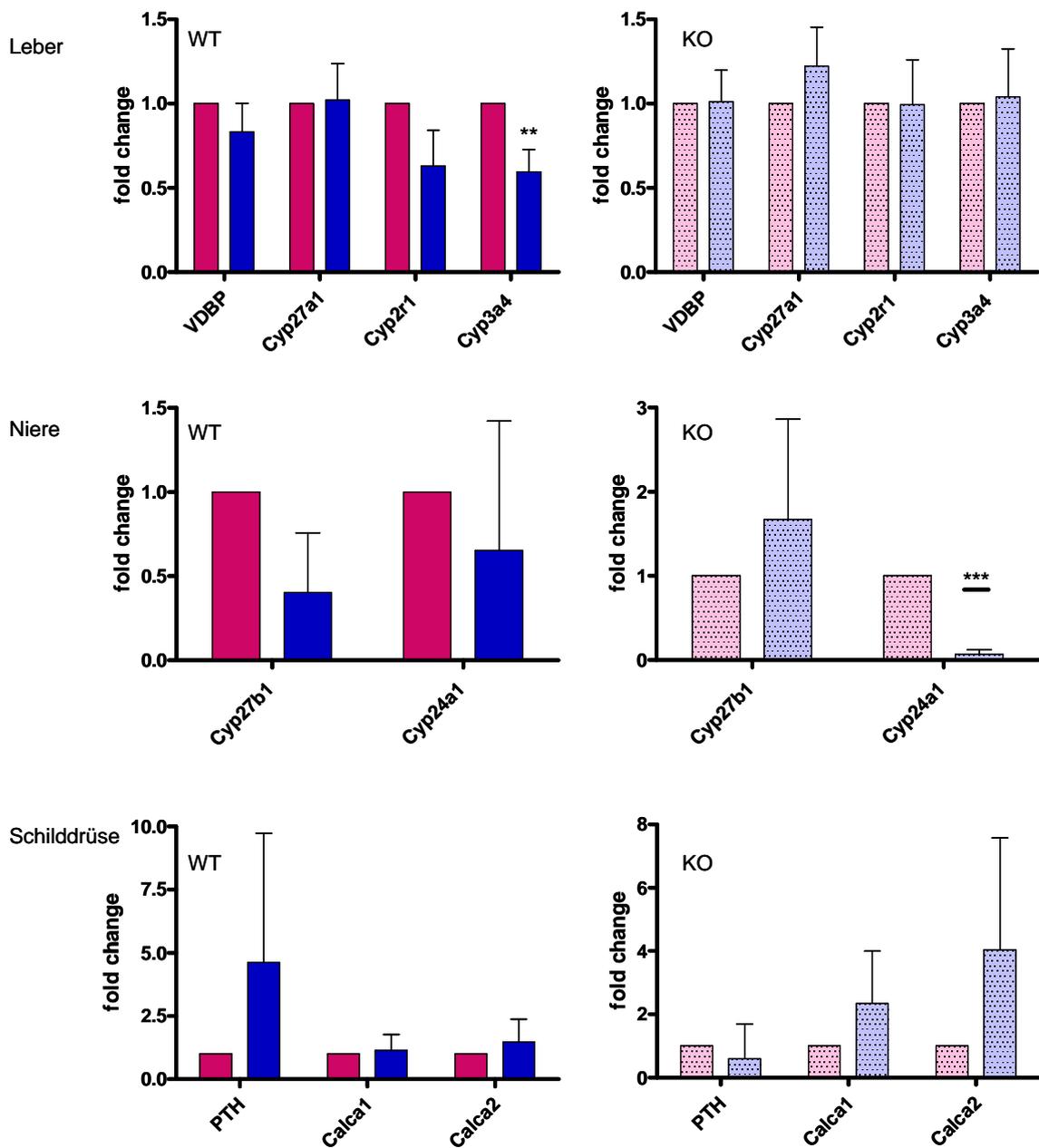


Abb. 4-11: Differentielle Genexpression in Mäusen in Abhängigkeit vom Geschlecht. Blau. Männchen, rot: Weibchen. dunkel: WT, hell + gepunktet: KO. Die Expression der 25'-Hydroxylase Cyp3a4 in der Leber war in den männlichen WT-Tieren signifikant erniedrigt im Vergleich zu den WT-Weibchen. Ebenso konnte ein Trend zu geringerer Expression von 1'-Hydroxylase (Cyp27b1) und 24'-Hydroxylase (Cyp24a1) in der Niere männlicher WT-Tiere beobachtet werden. Ebenso wie die tendenziell erhöhte PTH-Expression der WT-Männchen waren diese Unterschiede jedoch nicht statistisch signifikant. In den KO-Tieren war in den Männchen die 24'-Cyp24a1 signifikant herunterreguliert, im Vergleich zu den entsprechenden Weibchen. Der Trend zu einer erhöhten Calcitonin-Expression in den KO-Männchen war nicht statistisch signifikant. (n=6, statistische Auswertung mit REST (Pfaffl et al. 2002) * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001)

Ergebnisse

Einige Gene der VitD-Biosynthesemaschinerie waren geschlechtsspezifisch reguliert. Die 25-Hydroxylase (Cyp3a4) war in männlichen Wildtypen signifikant niedriger exprimiert als in den entsprechenden Weibchen. Ebenso schien es einen Trend zu verringerter Cyp27b1 (1-Hydroxylase)-Expression in den WT-Männchen zu geben. Jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Beide Enzyme führen Hydroxylgruppen in VitD-Vorstufen ein, wobei Cyp27b1 in der Niere die Bildung des aktiven $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{-VitD}$ katalysiert. In den männlichen WT schien im Vergleich zu den Weibchen aufgrund der Expressionsdaten eine verringerte Biosynthese des aktiven $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{-VitD}$ zu erfolgen. Da jedoch zusätzlich ein leichter Trend (statistisch nicht signifikant) zu einer verringerten 24-Hydroxylase-Expression (Cyp24a1) zu beobachten war, schien die gesamte VitD-Biosynthese in den WT-Männchen gehemmt zu sein. In den KO-Tieren zeigte sich ein gegenteiliges Bild. Dort waren in der Leber keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen festzustellen. Es schien, als ob die 25-Hydroxylase (Cyp27a1) in den Männchen stärker exprimiert würde, wohingegen die inaktivierende Cyp24a1 in der Niere statistisch signifikant stark erniedrigt war. In der Schilddrüse der KO-Männchen schien es wiederum einen Trend zu geringerer Expression von PTH und zu stärkerer Expression von Calcitonin zu geben, in beiden Fällen waren die beobachteten Unterschiede jedoch nicht statistisch signifikant.

4.2.2 Futtersuch

Um den Einfluss des Se-Status auf das Knochenwachstum, die Knocheneigenschaften und das Expressionsmuster interessanter Gene in Abhängigkeit aller *SepP*-Genotypen und vor allem in Abhängigkeit vom Alter zu untersuchen, wurden Tiere unterschiedlichen Genotyps auf RDA Futter gehalten und nach 14, 80 und 159 Tagen (d) getötet. Dabei befanden sich die 14d alten Tiere inmitten ihrer Wachstumsphase, die 80d alten Tiere hatten diese gerade abgeschlossen und bei den 159d alten Tieren konnte beobachtet werden, inwiefern der Knochenumsatz bzw. die Knochenhomöostase vom Se-Status beeinflusst wurde. Ihre Gewebe wurden auf Expression verschiedener Gene analysiert und die Knochen hinsichtlich ihrer Eigenschaften untersucht.

4.2.2.1 Knochenmorphologie in Abhängigkeit vom Geschlecht, Alter und Genotyp

Um einen ersten Überblick zu erhalten, wurde die Knochenlänge in Männchen und Weibchen mit unterschiedlichem *SepP*-Genotyp bestimmt. In Abb. 4-12 sind die untersuchten Knochen der 14d alten Tiere dargestellt.

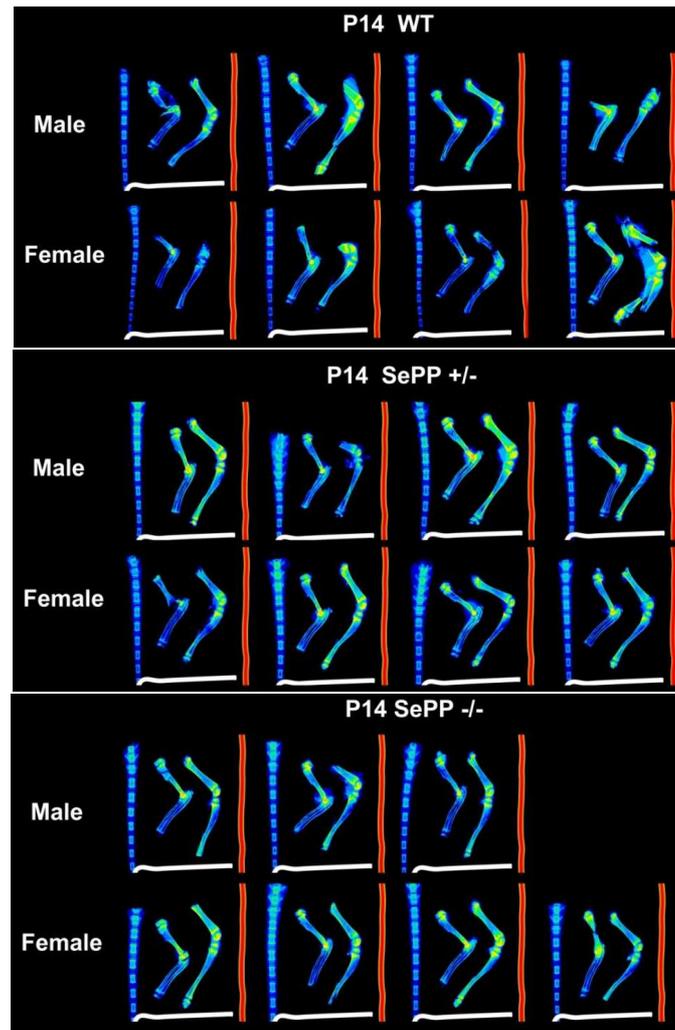


Abb. 4-12: Mineralisierung der Knochen der 14 Tage alten *SepP*-Tiere. Die gelben Bereiche weisen auf mineralisierte Substanz hin, die blauen Bereiche bestehen aus Knorpelgewebe. Es wurde jeweils die unteren Wirbel des Schwanzes, die linken Vorder- und Hinterextremitäten angefärbt und untersucht.

Es war ein geringer Unterschied in der Knochenlänge zwischen den Genotypen sichtbar, der in Abb. 4-13 noch einmal exemplarisch dargestellt wird.

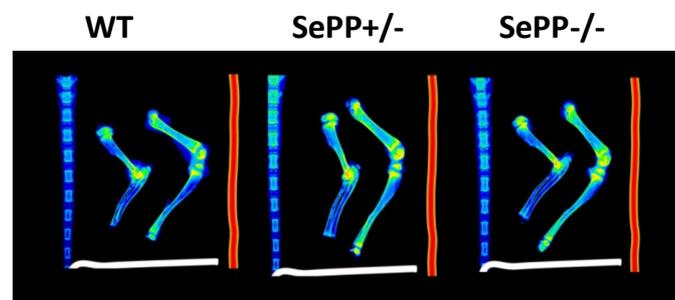


Abb. 4-13: Exemplarischer Vergleich der Knochen P14 alter Tiere unterschiedlichen *SepP*-Genotyps. Dargestellt sind gefärbte Knochen, wobei blaue Bereiche Knorpelgewebe und gelbe Bereiche Knochengewebe darstellen. Es zeigte sich ein Trend zu kürzeren Knochen in den WT-Tieren.

Ergebnisse

Es schien einen leichten Trend hin zu kürzeren Knochen bei Wildtyp-Tieren zu geben. Wertete man die Färbung bzgl. der Knochenlänge quantitativ aus, so ergab sich das in Abb. 4-14 dargestellte Resultat.

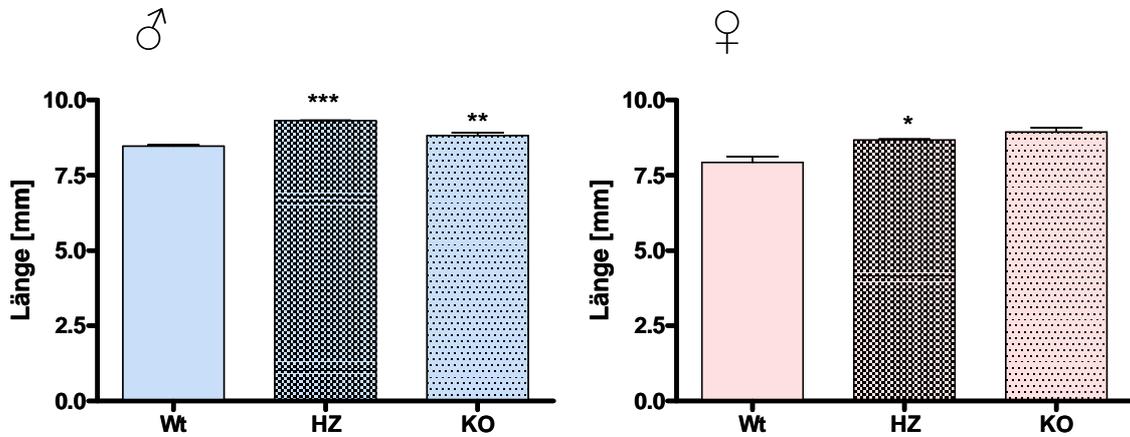


Abb. 4-14: Quantitative Auswertung von Mikroradiographieuntersuchungen zur Knochenlänge in Abhängigkeit vom *SepP*-Genotyp bei 14 Tage alten Mäusen (P14). WT: Wildtyp, HZ: Heterozygot, KO: Knockout. Die HZ-Männchen und Weibchen hatten statistisch signifikant längere Knochen als die entsprechenden WT-Tiere. Die KO-Männchen hatten im Vergleich zu den HZ-Tieren signifikant kürzere Knochen, unterschieden sich jedoch nicht von den WT-Männchen. (n=4, t-Test, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

Sowohl in den Männchen als auch in den Weibchen hatten die Wildtypen die kürzesten Knochen. Während in den Weibchen die KO-Tiere die längsten Knochen zu haben schienen, waren es bei den Männchen die heterozygoten Tiere. Man kann zusätzlich zur Knochenlänge auch die Cortexdicke der Röhrenknochen bestimmen. Dies kann Aufschluss über die Knocheneigenschaften geben. Die quantitative Auswertung der Cortexdickenbestimmung ist in Abb. 4-15 dargestellt.

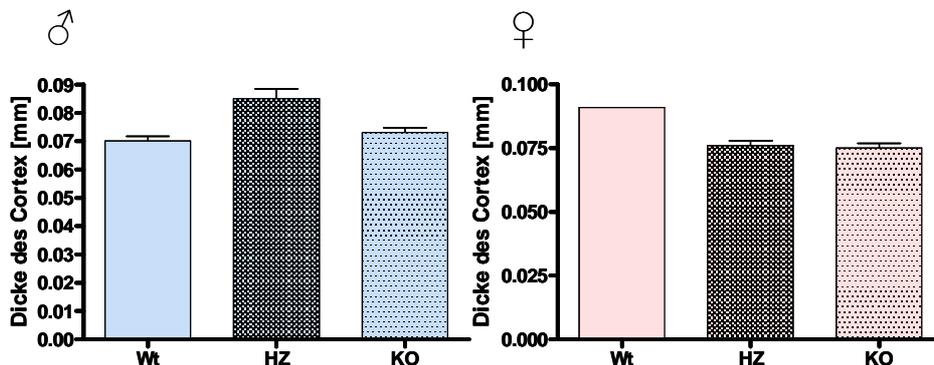


Abb. 4-15: Quantitative Auswertung der Mikroradiographieuntersuchungen zur Cortexdicke in Abhängigkeit vom *SepP*-Genotyp bei 14 Tage alten Mäusen (P14). WT: Wildtyp, HZ: Heterozygot, KO: Knockout. Es schien einen Trend in den Weibchen zu erhöhter Cortexdicke in den Wildtypen zu geben. Bei den Männchen schienen die heterozygoten Männchen die höchste Cortexdicke aufzuweisen. Keiner der beobachteten Unterschiede war jedoch signifikant. (n=4, t-Test, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

Ergebnisse

Im Gegensatz zur Knochenlänge konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen in Bezug auf die Cortexdicke ermittelt werden. In den Männchen entsprach das Pattern dem der Knochenlänge, wohingegen bei den Weibchen ein umgekehrter Trend zu beobachten war. Die Wildtypen schienen den dicksten Cortex zu haben, heterozygote und KO-Tiere unterschieden sich nicht voneinander, schienen aber einen dünneren Cortex als die Wildtypen zu haben.

Die bisher gezeigten Ergebnisse beschreiben die Knochen von 14d alten Tieren. Diese befinden sich mitten im (Knochen)Wachstum, welches aus verschiedenen Gründen unterschiedlich ablaufen kann. Um einen grundsätzlicheren Einblick in die Bedeutung von SepP für das Knochenwachstum zu erhalten, wurden zusätzlich die Knochen von Tieren, die sich gerade am Ende ihrer Wachstumsphase befinden (80 Tage alt, P80) und ausgewachsenen Tieren (159 Tage alt, P159) untersucht. Zusätzlich zur Knochenlänge, gibt der Mineralgehalt (*bone mineral content, BMC*) Aufschluss über den Knochenstoffwechsel eines Organismus. In Abb. 4-16 ist die graphische Auswertung einer mikroradiologischen BMC-Bestimmung der 80d alten Tiere dargestellt.

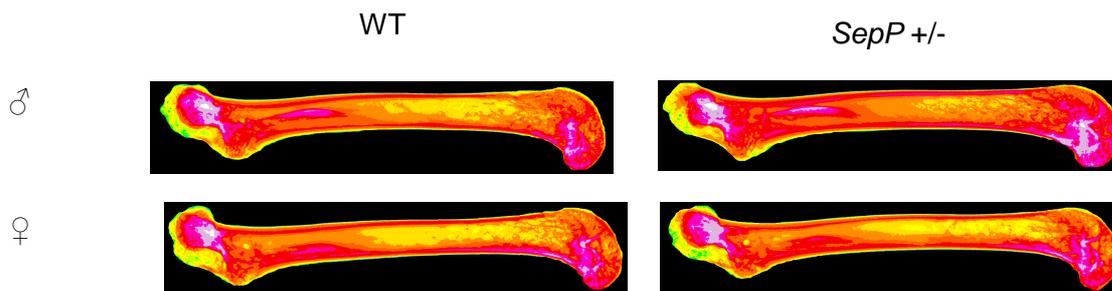


Abb. 4-16: Qualitative Auswertung von Mikroradiographieuntersuchungen in Bezug auf Knochendichte und -länge des Femurs 80 Tage alter Mäusen (P80). Abgebildet sind exemplarisch vier Oberschenkelknochen. Rote Bereiche sind Bereiche hoher und gelbe Bereiche sind Bereiche geringerer Knochendichte. Es waren keine Unterschiede zu beobachten.

Die Länge der Knochen zwischen den Geschlechtern variierte. Innerhalb eines Geschlechts gab es jedoch keinen Unterschied. Dies wird nach der in Abb. 4-17 dargestellten quantitativen Auswertung der mikroradiologischen Knochenlängenbestimmung deutlich.

Ergebnisse

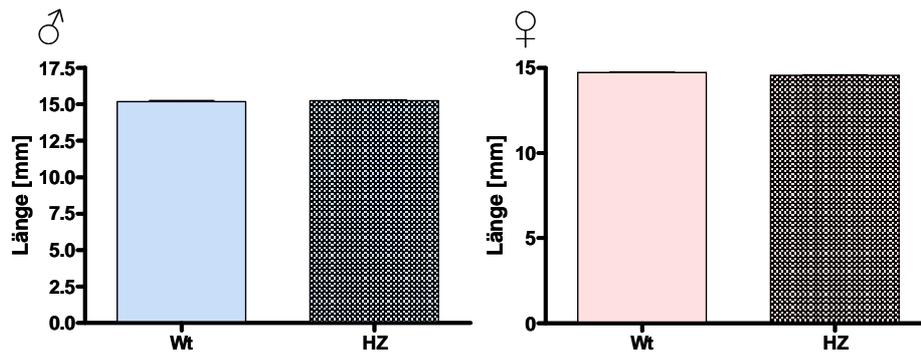


Abb. 4-17 Quantitative Auswertung von Mikroradiographieuntersuchungen zur Knochenlänge in Abhängigkeit vom *SepP*-Genotyp bei 80 Tage alten Mäusen (P80). WT: Wildtyp, HZ: Heterozygot. Weder in den Männchen noch in den Weibchen gab es einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den unterschiedlichen Genotypen hinsichtlich der Länge des Femurs. In den Weibchen schien es allerdings einen leichten Trend zu kürzeren Knochen in den heterozygoten Tieren zu geben. (n=4, t-Test, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

Die unterschiedlich starke Rotfärbung der Knochen in Abb. 4-16 ist ein Maß für die Mineraleichte der Knochen. Diese schien bei den heterozygoten Männchen erhöht gewesen zu sein (Stärkere Rotfärbung in Abb. 4-16). In den Weibchen war kein Unterschied feststellbar. Eine quantitative Auswertung der Knochendichte basierend auf einer Grauskala bestätigte dies und ist in Abb. 4-18 für Männchen und Weibchen dargestellt.

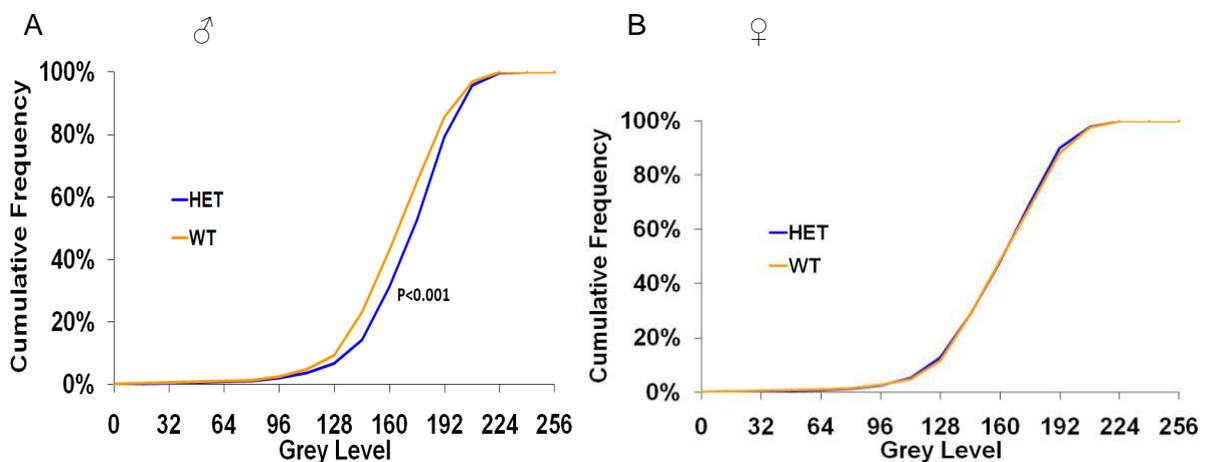


Abb. 4-18: Quantitative Auswertung von Mikroradiographieuntersuchungen zur Knochendichte in Abhängigkeit vom *SepP*-Genotyp bei 80 Tage alten Mäusen (P80). A: männliche Tiere. B: weibliche Tiere. Die heterozygoten Männchen hatten eine signifikant höhere Knochenmineraleichte als die Wildtypen. In den Weibchen war kein Unterschied zu beobachten. (n=4, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

WT- und HZ-Männchen unterschieden sich statistisch signifikant in ihrer Knochendichte ($p < 0,001$). Bei den Weibchen ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen.

Ergebnisse

Der Unterschied im BMC in den Männchen könnte durch eine unterschiedliche Cortexdicke in den Knochen der heterozygoten Tiere verursacht worden sein. Wertete man die Cortexdicke anhand der mikroradiologischen Daten quantitativ aus, so ergab sich das in Abb. 4-19 dargestellte Bild.

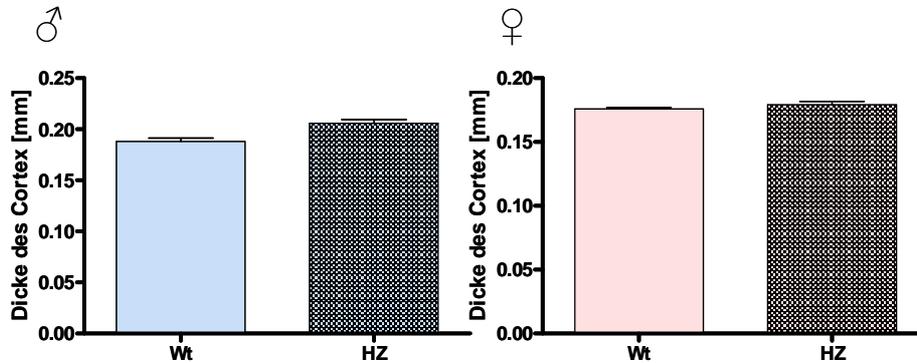


Abb. 4-19: Quantitative Auswertung der Mikroradiographieuntersuchungen zur Cortexdicke in Abhängigkeit vom *SepP*-Genotyp bei 80 Tage alten Mäusen (P80). Bei den Männchen zeigten die heterozygoten Tiere eine leicht erhöhte, wenn auch nicht signifikant höhere Cortexdicke. Bei den Weibchen gab es keinen Effekt des Genotyps auf die Cortexdicke. (n=4, t-Test, * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001)

Die unterschiedlichen Genotypen unterschieden sich nicht signifikant, obwohl ein leichter Trend zu einer höheren Cortexdicke in den HZ-Männchen zu beobachten war.

Analysierte man die Wirbelknochen des Schwanzes mikroradiologisch, so war optisch (Abb. 4-20) und auch nach quantitativer Auswertung (Abb. 4-21) kein Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen feststellbar.

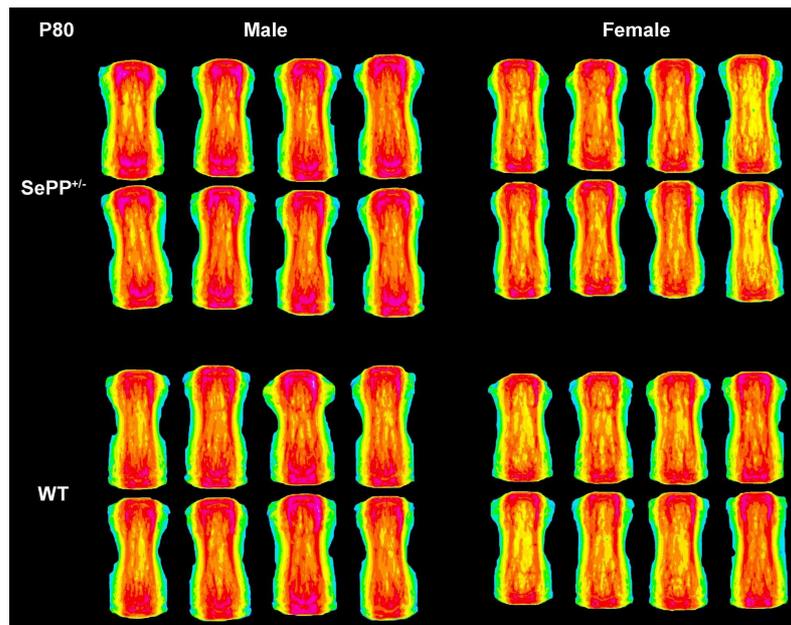


Abb. 4-20: Qualitative Auswertung von Mikroradiographieuntersuchungen in Bezug auf Knochendichte und -länge der Schwanzwirbelknochen 80 Tage alter Mäuse (P80). Rote Bereiche sind Bereiche hoher und gelbe Bereiche sind Bereiche geringerer Knochendichte. Je vier heterozygote (Sepp +/-) und Wildtyp (Sepp +/+) weibliche und männliche Tiere wurden hinsichtlich ihrer Knochendichte untersucht. Keine Unterschiede waren zu erkennen.

Auf den ersten Blick waren keinerlei Unterschiede offensichtlich. Die quantitative Auswertung der mikroradiologischen Daten bestätigte dies (Abb. 4-21).

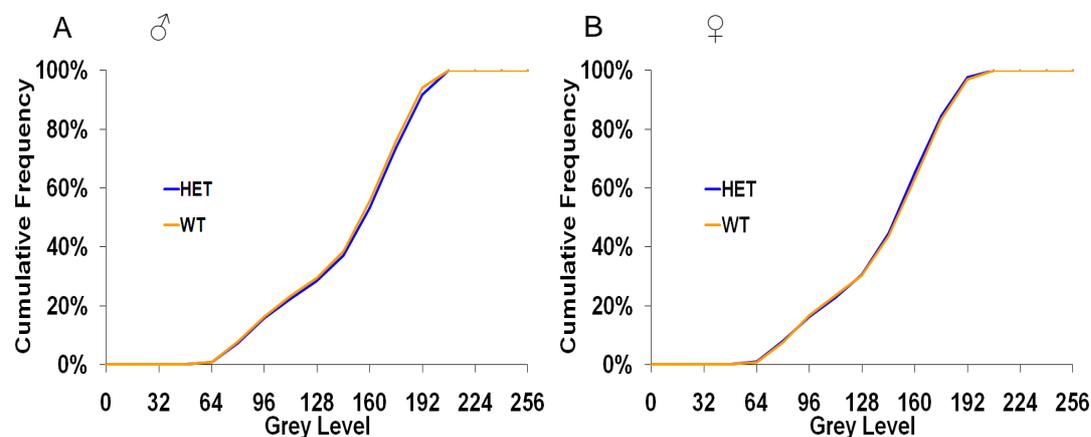


Abb. 4-21 Quantitative Auswertung von Mikroradiographieuntersuchungen in Bezug auf Knochendichte und -länge der Schwanzwirbelknochen 80 Tage alter Mäuse (P80). A. männliche Tiere. B. weibliche Tiere. Weder in den Männchen noch in den Weibchen konnte ein signifikanter Effekt des Genotyps auf die Knochendichte festgestellt werden. (n=4, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

Da es in den ersten 80 Lebenstagen einer Maus hauptsächlich Knochenwachstum gibt, ist es interessant zu untersuchen, in wieweit die Knochenhomöostase durch den Se-Status beeinflusst wird. Dazu wurden alle bisher dargestellten Analysen auch mit Knochen von

Ergebnisse

ausgewachsenen Tieren im Alter von P159 durchgeführt. Abb. 4-22 zeigt beispielhaft die untersuchten Femur-Knochen der P159 Tiere. Bei einigen Knochen wurde, aufgrund des fehlenden Femurkopfs ein „Consensus“-Femurkopf simuliert und die Analysen entsprechend durchgeführt.

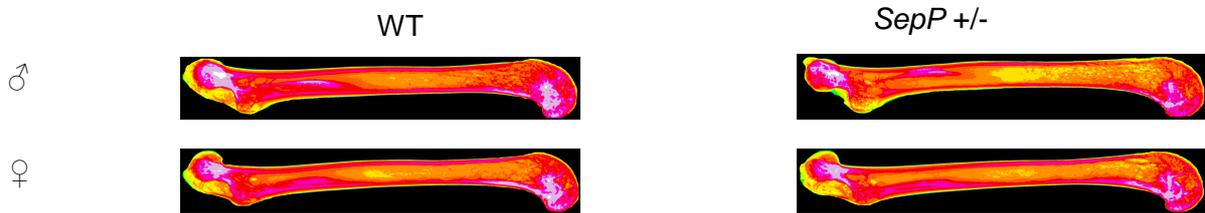


Abb. 4-22: Qualitative Auswertung von Mikroradiographieuntersuchungen in Bezug auf Knochendichte und -länge des Femurs 159 Tage alter Mäusen (P159). Abgebildet sind exemplarisch vier Oberschenkelknochen. Rote Bereiche sind Bereiche hoher und gelbe Bereiche sind Bereiche geringerer Knochendichte. Bei den Weibchen fielen keine nennenswerten Unterschiede in Länge oder Mineralisierungsgrad der Knochen ins Auge. In den Männchen schienen die heterozygoten Tiere eine erhöhte Knochendichte zu besitzen.

Auf den ersten Blick waren keinerlei Längenunterschiede heterozygoten und Wildtyp-Männchen zu beobachten. Allerdings schien es einen Trend zu kürzeren Knochen in heterozygoten Tieren zu geben. Um dies genauer zu erfassen, wurden die Daten quantitativ ausgewertet. In Abb. 4-23 ist die quantitative Auswertung der mikroradiologischen Längenbestimmung für Männchen und Weibchen dargestellt.

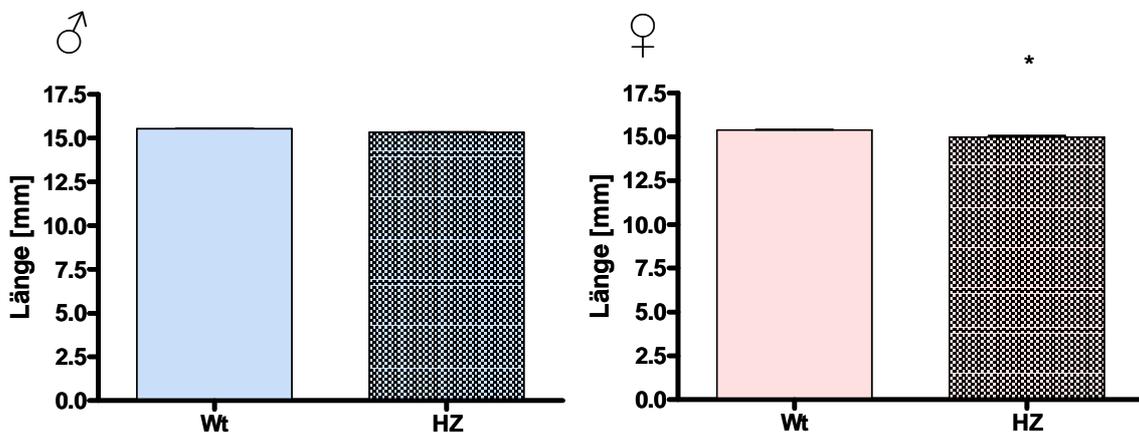


Abb. 4-23: Quantitative Auswertung von Mikroradiographieuntersuchungen zur Knochenlänge in Abhängigkeit vom *SepP*-Genotyp bei 159 Tage alten Mäusen (P159). In den Weibchen hatten die heterozygoten Tiere signifikant kürzere Knochen als ihre Wildtypgeschwister. Bei den Männchen ergab sich ein ähnliches, aber nicht signifikantes Bild, auch hier schienen die heterozygoten Tiere kürzere Röhrenknochen zu haben. (n=4, t-Test, * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001)

In den Weibchen hatten die heterozygoten Tiere signifikant kürzere Knochen als die Wildtypen (p<0,05). Zusammenhängend mit den Ergebnissen der 80 Tage alten Tiere schien mit zunehmendem Alter der Einfluss des Genotyps auf das Längenwachstum in den

Ergebnisse

Weibchen stärker zu sein als in den Männchen.

Es wurden zusätzlich die Daten aus der Knochendichtebestimmung quantitativ ausgewertet und in Abb. 4-24 dargestellt.

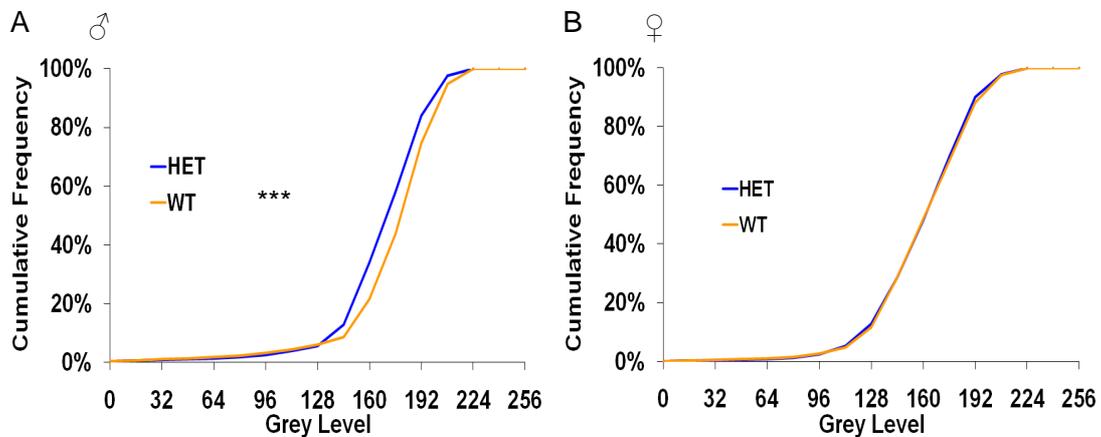


Abb. 4-24. Quantitative Auswertung von Mikroradiographieuntersuchungen in Bezug auf Knochendichte des Femurknochens 159 Tage alter Mäusen (P159). A. männliche Tiere. B. weibliche Tiere. Nur bei den Männchen konnte ein signifikanter Einfluss des Genotyps beobachtet werden. Die Wildtypen hatten eine signifikant erhöhte Knochendichte. In den Weibchen gab es keinerlei Unterschiede zwischen den Genotypen. (n=4, * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001)

Im Gegensatz zu den 80 Tage alten Tieren hatten die Wildtypen die höhere Knochendichte. Jedoch gab es nur in männlichen Tieren einen Unterschied zwischen den Genotypen. In den weiblichen Tieren hatte der Genotyp keinen Einfluss auf die Knochendichte. Der Unterschied in der Knochendichte könnte mit einem verstärkten Knochenabbau in den heterozygoten Männchen erklärt werden. Zusätzlich wurde die Cortexdicke bestimmt und die Auswertung der Daten ist in Abb. 4-25 graphisch dargestellt.

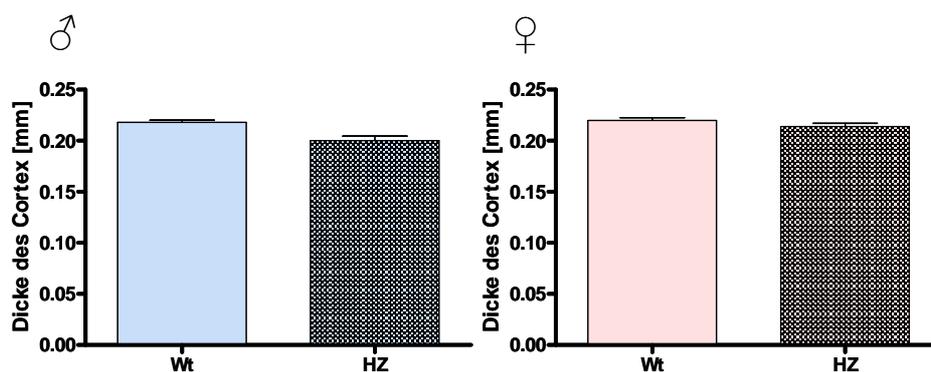


Abb. 4-25: Quantitative Auswertung der Mikroradiographieuntersuchungen zur Cortexdicke in Abhängigkeit vom *SepP*-Genotyps bei 159 Tage alten Mäusen (P159). Keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtypen und Heterozygoten Tieren waren zu beobachten. (n=4, t-Test, * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001)

Die Cortexdicke war in 159 Tage alten Mäusen unabhängig vom *SepP*-Genotyp, auch wenn

Ergebnisse

ein leichter Trend zu verringerter Cortexdicke in HZ-Tieren zu beobachten war.

Auch in den P159-Tieren wurden die Schwanzwirbelkörper untersucht. Die graphische Darstellung der Knochendichte der Schwanzwirbelkörper ist in Abb. 4-26 dargestellt.

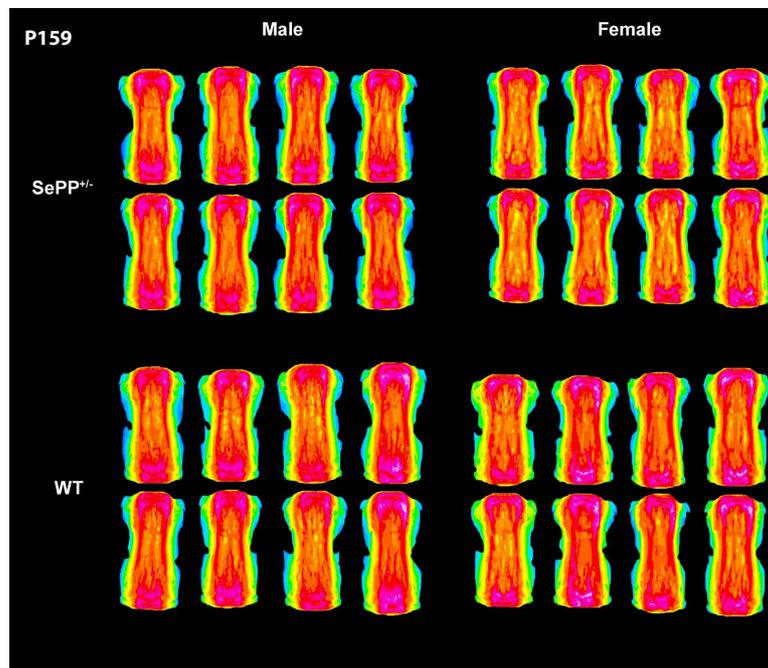


Abb. 4-26: Qualitative Auswertung von Mikroradiographieuntersuchungen in Bezug auf Knochendichte und -länge der Schwanzwirbelknochen 159 Tage alter Mäuse (P159). Es waren keine Unterschiede zwischen den Genotypen zu erkennen.

Es schien keinerlei offensichtliche Unterschiede zwischen den Genotypen zu geben. Dies wurde auch durch die quantitative Auswertung der mikroradiologischen Untersuchungen bestätigt und in Abb. 4-27 verdeutlicht.

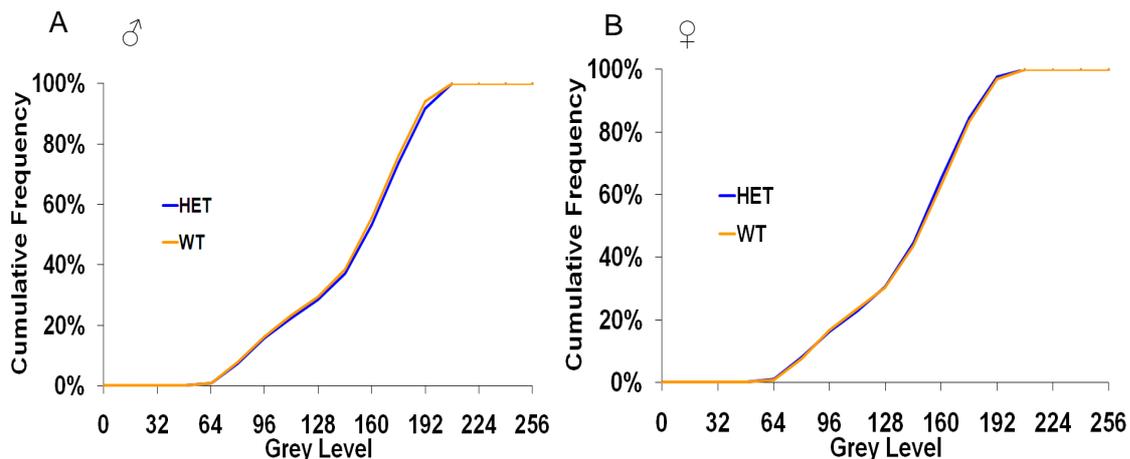


Abb. 4-27: Quantitative Auswertung von Mikroradiographieuntersuchungen in Bezug auf Knochendichte der Schwanzwirbelknochen 159 Tage alter Mäuse (P159). A. männlich. B weiblich. Es wurden keine Unterschiede festgestellt. (n=4, * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001)

Die Auswertung ergab keinerlei signifikanten Unterschied zwischen den *SepP*-Genotypen

Ergebnisse

hinsichtlich der Knochendichte der Schwanzwirbelkörper. Dieser Befund steht im Gegensatz zu dem der Oberschenkelknochen, wo bei den Männchen je nach Alter ein Effekt des Genotyps beobachtet werden konnte.

Die Wachstumsfuge der Röhrenknochen ist nach einem bestimmten Prinzip aufgebaut. Die Grundlage für das Längenwachstum, bilden Knorpelzellen (Chondrozyten). Diese unterlaufen einen Differentiationsprozess hin zur Hypertrophie und bilden die extrazelluläre Matrix, welche nach und nach durch Einlagerung von Hydroxyapatit mineralisiert. Um eine Änderung des Aufbaus der Wachstumsfuge durch den *SepP*-Genotyp ausschließen zu können, wurde die Wachstumsfuge der verschiedenen Genotypen einen Tag nach der Geburt mit Hämatoxylin/Eosin angefärbt. Abb. 4-28 zeigt exemplarisch die Wachstumsfuge von WT, HZ- und KO-Tieren.

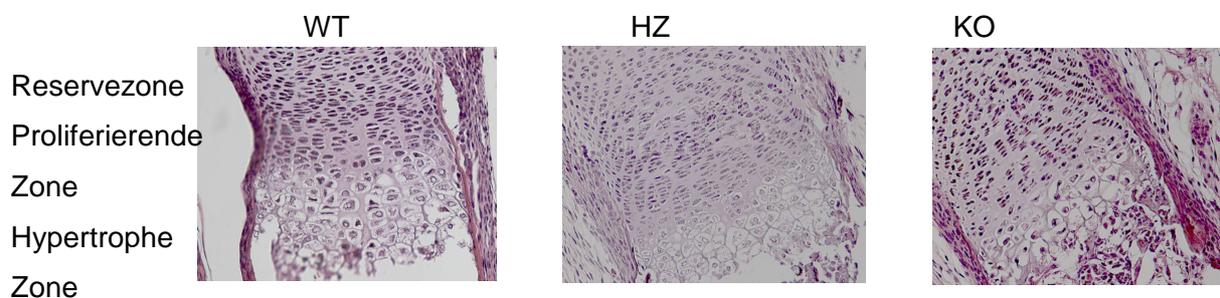


Abb. 4-28: H/E-Färbung der Wachstumsfuge in Abhängigkeit vom *SepP*-Genotyp. Dargestellt sind die Wachstumsfugen 1 Tag alter Tiere (P1), deren Mütter RDA-Futter erhielten. Es waren keine auffälligen Unterschiede in der Anordnung der Chondrozyten zu beobachten. Die Wachstumsfugen folgten in allen Genotypen dem normalen Muster von Reserve-, Proliferations- und Hypertrophiezone. Man konnte keinerlei Unterschiede zwischen den Genotypen erkennen. Die im fortgeschrittenen Alter auftretenden Unterschiede im Knochenbau waren demnach nicht in einer gestörten embryonalen Entwicklung begründet.

4.2.2.2 Genexpression in der Leber und Niere

Die Abhängigkeit der Expression verschiedener Gene vom Genotyp ist in Abb. 4-29 dargestellt. Es wurde die Expression von *SepP*, Enzymen der VitD-Biosynthese und den Wachstumshormonen *IGF1* und *IGFBP2* in der Leber untersucht.

Ergebnisse

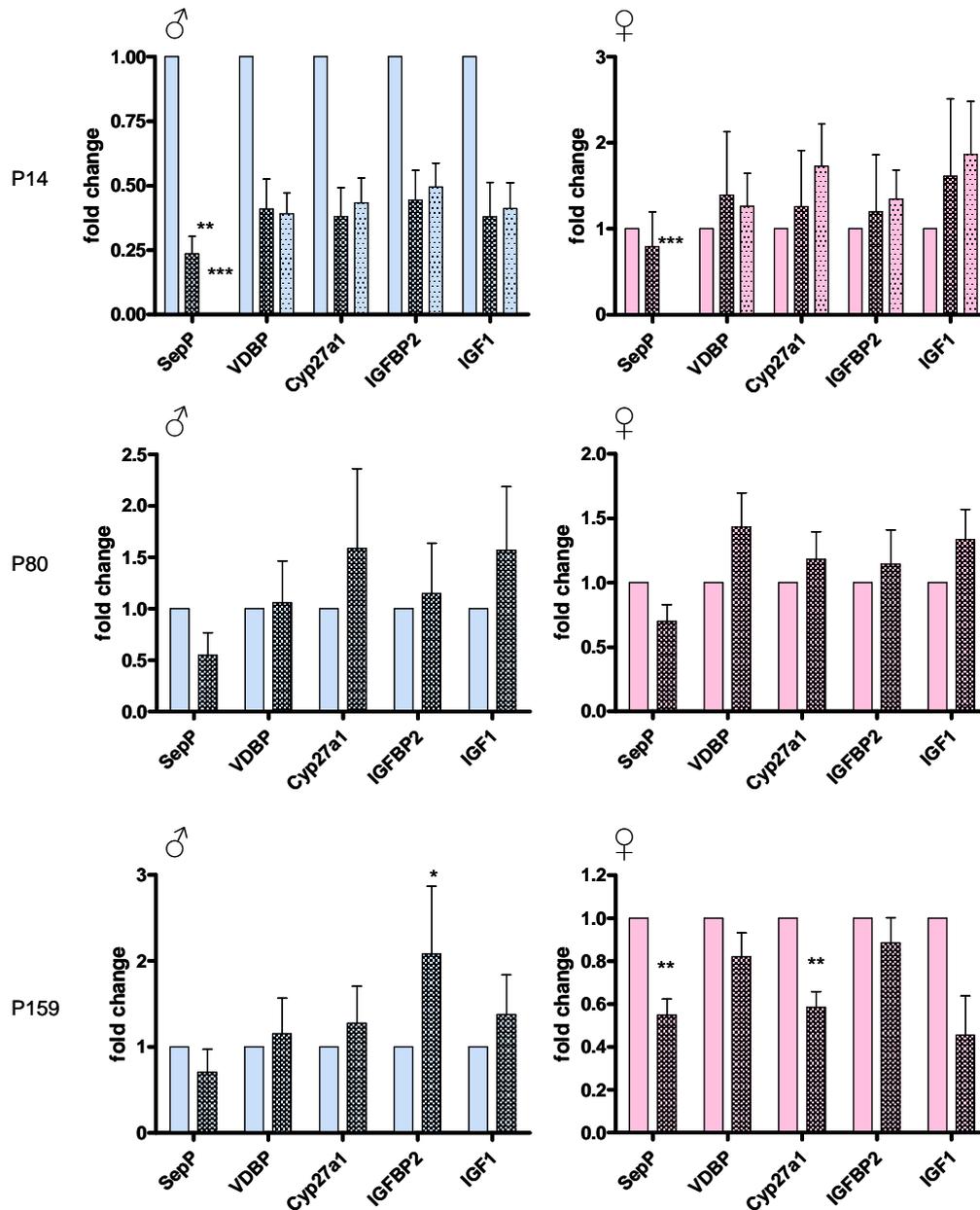


Abb. 4-29: Differentielle Genexpression knochenrelevanter Gene in der Leber in Abhängigkeit vom Genotyp. unschraffiert: WT, kariert: HZ, gepunktet: KO. *SepP* wurde in HZ und KO Tieren signifikant weniger exprimiert als in den WT Tieren. Ebenso wurde die *Cyp27a1* in den HZ P159 Weibchen signifikant schwächer exprimiert als in den WT. Zwischen den Expressionsniveaus der anderen Gene wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Der Genotyp hatte demnach in den Weibchen einen Einfluss auf die Expression von *SepP* und *Cyp27a1* in der Leber. (n=6, statistische Auswertung mit REST (Pfaffl et al. 2002), * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001)

Die Expression von *SepP* war in den heterozygoten und Knockout-Tieren verringert. Dieser Effekt trat im Alter von 14d am deutlichsten auf. Die Expression der *Cyp27a1* war in den P159 Tage alten heterozygoten Weibchen im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen signifikant reduziert. Alle anderen Gene waren in der Leber in ihrer Expression unabhängig vom Genotyp, egal welches Geschlecht analysiert wurde.

Ergebnisse

Um zu untersuchen, inwiefern sich die Expression der Gene im Alter änderte, wurde die Genexpression in allen drei Altersgruppen miteinander verglichen (Abb. 4-30).

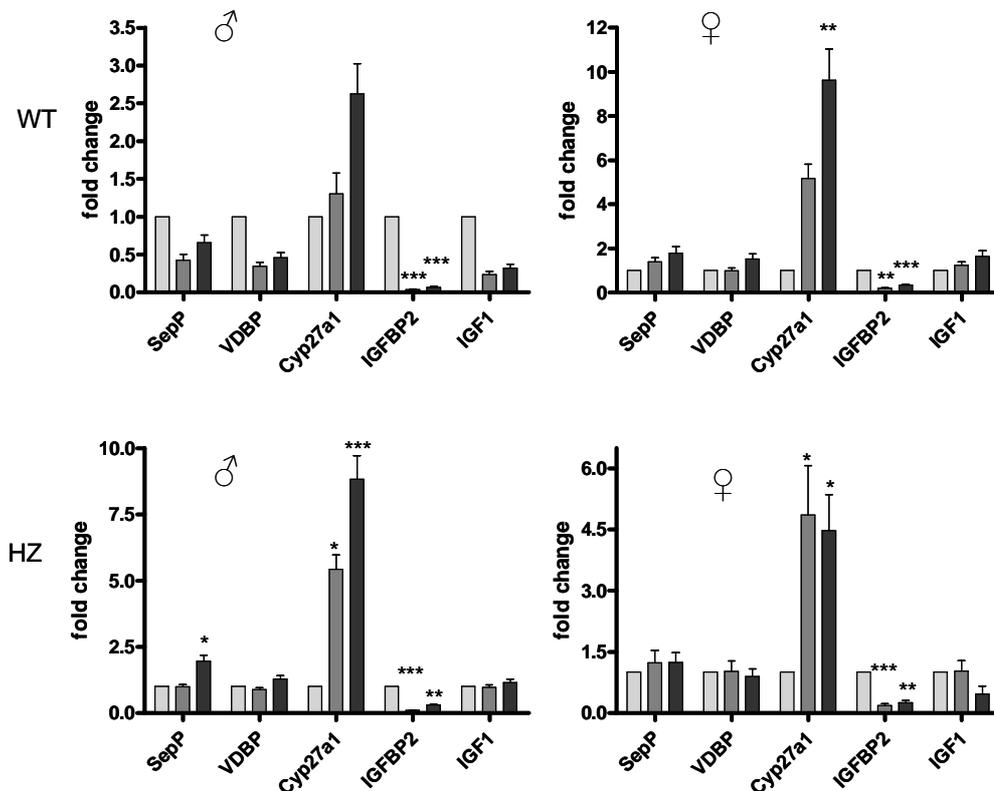


Abb. 4-30: Differentielle Genexpression knochenrelevanter Gene in der Leber in Abhängigkeit vom Alter. hellgrau P14, grau P80, dunkelgrau P159. *cGPx*, *TrxR* und *IGFBP2* werden in der Leber altersabhängig reguliert. (n=6, statistische Auswertung mit REST (Pfaffl et al. 2002), * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001)

Je nach Genotyp und Geschlecht wurden einige der untersuchten Gene altersabhängig reguliert. In beiden Geschlechtern kam es mit zunehmendem Alter (P80 und P159) zu einer statistisch signifikanten Abnahme der *IGFBP2*-Genexpression im Vergleich zu den P14 Tieren. Außerdem stieg die Expression der *Cyp27a1* in beiden Geschlechtern statistisch signifikant mit zunehmendem Alter, in den P159 Männchen war dies jedoch nur als Trend zu beobachten.

Zusätzlich wurden die Expressionsunterschiede zwischen den beiden Geschlechtern ausgewertet. Dies geschah für alle Genotypen und ist in Abb. 4-31 dargestellt.

Ergebnisse

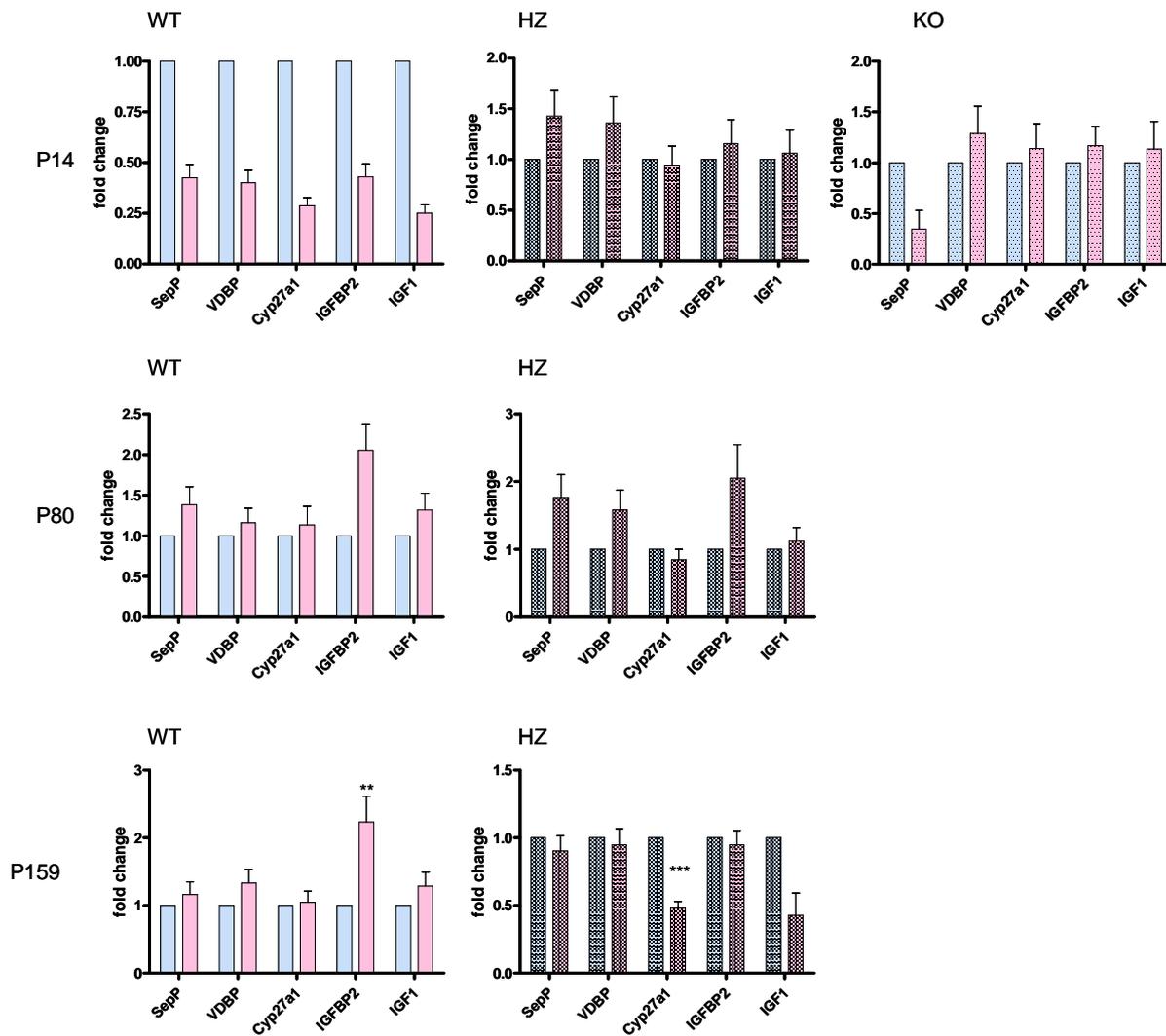


Abb. 4-31: Differentielle Genexpression knochenrelevanter Gene in der Leber in Abhängigkeit vom Geschlecht. blau: Männchen, rosa: Weibchen. Die Expression von *Cyp27a1* und *IGFBP2* in der Leber unterschied sich signifikant zwischen den Geschlechtern. Allerdings trat dieser Unterschied erst im Alter von 159 Tagen auf. (n=6, statistische Auswertung mit REST(Pfaffl et al. 2002)), * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001)

Obwohl es schien, als ob alle untersuchten Gene in den 14 Tage alten WT-Weibchen schwächer exprimiert waren als in den entsprechenden Männchen, konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Dabei war der *SepP*-Genotyp der Tiere unerheblich. Erst im Alter von P159 Tagen kam es zu einer signifikant höheren Expression von *IGFBP2* in WT-Weibchen und einer signifikanten Erniedrigung der *Cyp27a1*-Expression in den heterozygoten Weibchen jeweils im Vergleich zu den entsprechenden Männchen.

Ergebnisse

Betrachtet man die Expression in der Niere so ergab sich für den Einfluss des Genotyps das in Abb. 4-32 dargestellte Bild.

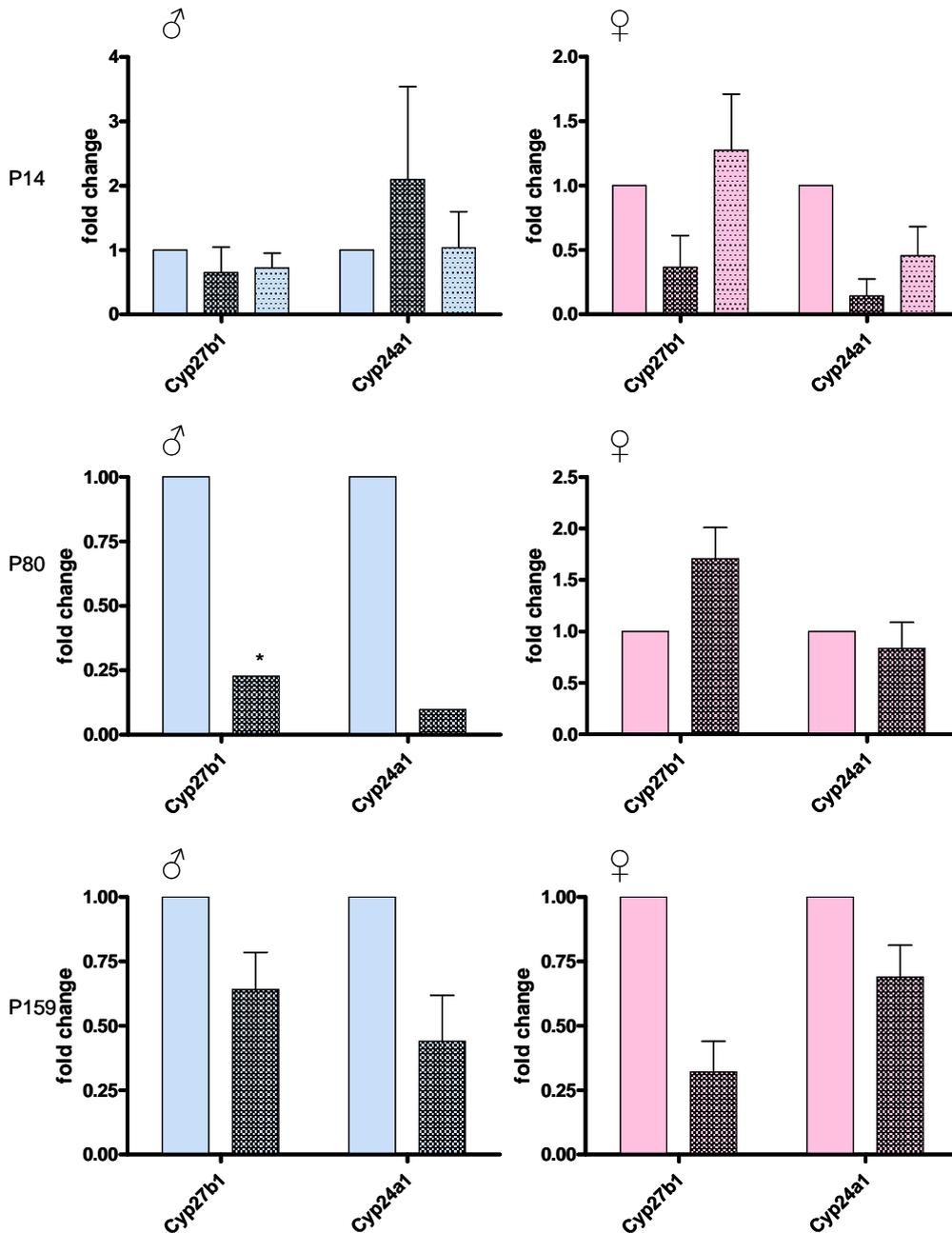


Abb. 4-32: Differentielle Genexpression von *Cyp27b1* und *Cyp24a1* in der Niere in Abhängigkeit vom Genotyp. unshraffiert: WT, kariert: hz, gepunktet: KO. Die *Cyp27b1* wurde in den Männchen in der Niere je nach Genotyp unterschiedlich stark exprimiert. Die stärkste Expression fand in den WT statt, in den P80 HZ war die Expression signifikant verringert. Die *Cyp24a1* war nicht signifikant reguliert, auch es in den HZ Tieren, unabhängig vom Geschlecht einen Trend zu einer verringerten Expression gab. (n=6, statistische Auswertung mit REST (Pfaffl et al. 2002), * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001)

Es ergab sich eine recht inhomogene Regulation, die signifikant nur im Männchen erfolgte. Insgesamt war die Regulation der beiden Hydroxylasen relativ schwach, die Induktion oder

Ergebnisse

Repression der Genexpression stieg nur selten über den Faktor zwei. In den jungen 14 Tage alten Tieren schienen beide Cyps in den HZ-Tieren schwächer exprimiert zu sein, als in den WT- bzw. KO-Tieren, die biostatistische Auswertung ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied. In den P80 Männchen war die *Cyp27b1* signifikant herunterreguliert im Vergleich zum Wildtyp. Bei den P159 alten Männchen traten für beide Gene keinerlei signifikanten Unterschiede in der Genexpression auf. Die WT-Weibchen im Alter von P14 und P159 wiesen eine höhere Genexpression der Cyps im Vergleich zu ihren heterozygoten oder KO-Geschwistern auf, doch waren diese Unterschiede nicht signifikant. Bei den P80 alten Weibchen gab es einen Trend zu stärkerer Expression der untersuchten Gene in den heterozygoten Tieren, doch auch hier waren die Unterschiede nicht signifikant.

Auch für die Niere wurde untersucht, inwiefern sich die Genexpression zwischen den verschiedenen Altersgruppen unterscheidet. Das Ergebnis der altersspezifischen Auswertung der Genexpression ist in Abb. 4-33 dargestellt.

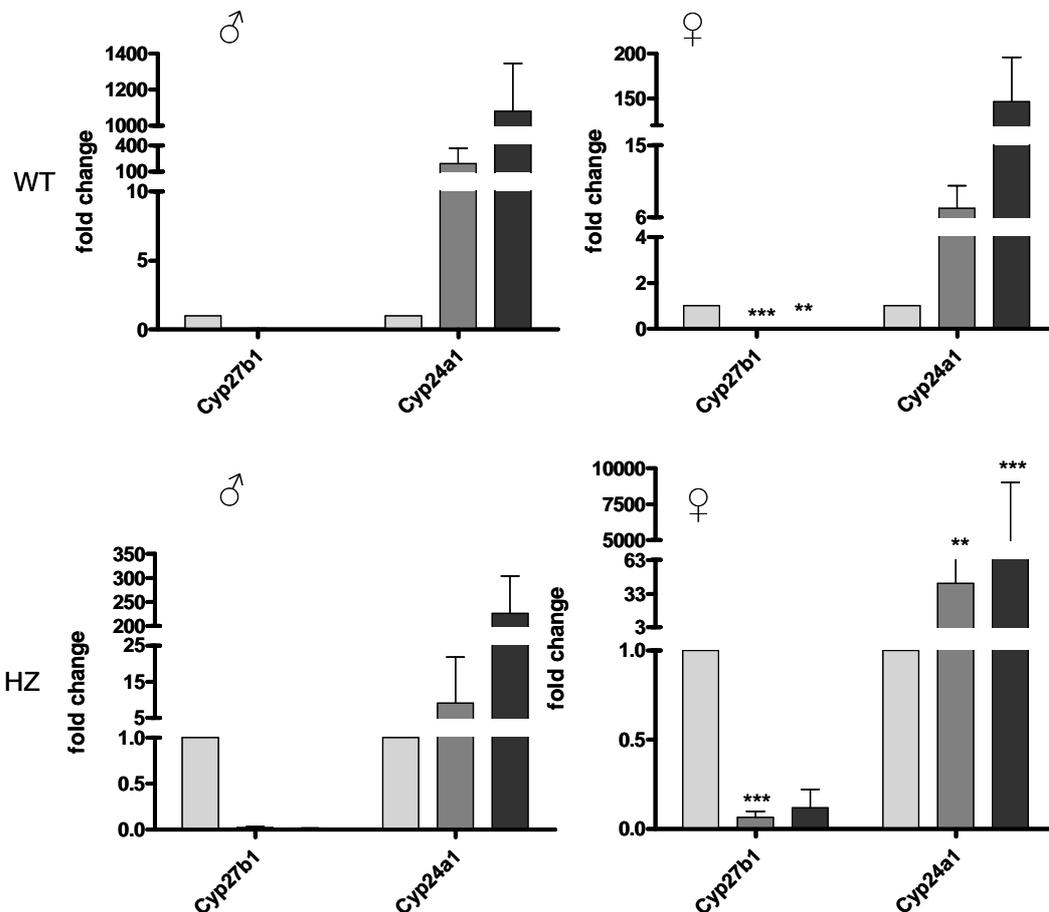


Abb. 4-33: Differentielle Genexpression knochenrelevanter Gene in der Niere in Abhängigkeit vom Alter. hellgrau P14, grau P80, dunkelgrau P159. Die *Cyp27b1* war in der Niere von adulten Tieren signifikant schwächer exprimiert im Gegensatz dazu war die *Cyp24a1* in adulten Tieren stärker exprimiert. Diese Effekte galten für beide Geschlechter. (n=6, statistische Auswertung mit REST (Pfaffl et al. 2002), * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001)

Ergebnisse

Die beiden Gene unterlagen einer gegensätzlichen altersspezifischen Regulation. Die Expression der *Cyp27b1* nahm in beiden Geschlechtern mit zunehmendem Alter ab. Im Falle der Weibchen war die Expression in den P80 und den P159 statistisch signifikant niedriger. Die *Cyp24a1* mRNA wurde hingegen in beiden Geschlechtern mit zunehmendem Alter stärker exprimiert. Statistisch signifikant war dieser Effekt jedoch nur für die HZ-Weibchen. Abb. 4-34 verdeutlicht die Auswertung der Expressionsanalysen hinsichtlich einer geschlechtsspezifischen Regulation der untersuchten Cyps.

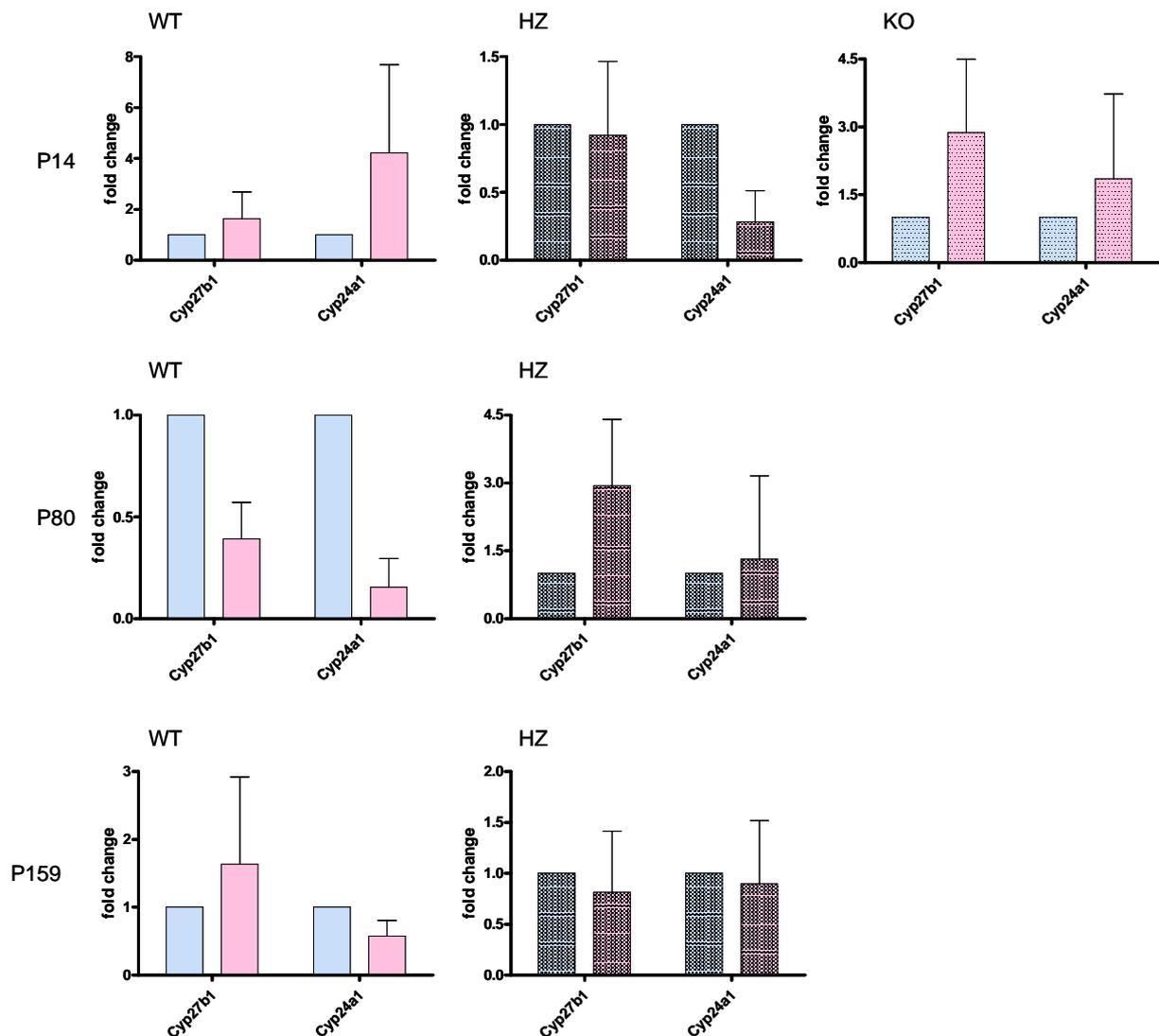


Abb. 4-34: Differentielle Genexpression knochenrelevanter Gene in der Niere in Abhängigkeit vom Geschlecht. blau: Männchen, rosa: Weibchen. Die untersuchten *Cyp27b1* und *Cyp24a1* unterlagen keiner geschlechtsspezifischen Regulation. (n=6, statistische Auswertung mit REST(Pfaffl et al. 2002), * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001)

Die analysierten Gene der VitD-Biosynthese waren in den hier untersuchten Mäusen nicht geschlechtsspezifisch reguliert. In den 14 Tage alten Weibchen schienen beide Cyps in den WT- und KO-Tieren stärker exprimiert zu sein, als in den entsprechenden Männchen. In den

KO-Tieren zeigte sich das entgegengesetzte Bild. Hier schienen die Männchen ein höheres Expressionsniveau von *Cyp24a1* und *Cyp27b1* zu haben. In den P80 Tieren wiesen die WT-Weibchen eine niedrigere Expression der beiden CyPs auf, die Hz-Weibchen wiederum zeigten eine stärkere Expression als die jeweiligen Männchen. In den 159 Tage alten Tieren waren nur minimale Unterschiede in der Genexpression zu beobachten. Insgesamt war jedoch keine der beobachteten Regulationen statistisch signifikant.

4.3 Der Se-Status ist im Menschen mit dem Knochenstoffwechsel assoziiert

4.3.1 Das OPUS-Kollektiv

Um zu testen, ob der in den Mäusen festgestellte Zusammenhang zwischen Selenstatus und Knochenparametern auch für den Menschen relevant ist, wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. G. Williams (Imperial College London) der Selenstatus des OPUS – Kollektivs (siehe Abschnitt 2.8.1) bestimmt und mit den dort erhobenen klinischen Daten assoziiert. Abb. 4-35 zeigt die Auswahlkriterien der 1144 Probandinnen, deren Se-Status bestimmt und mit Knochenparametern korreliert wurde.

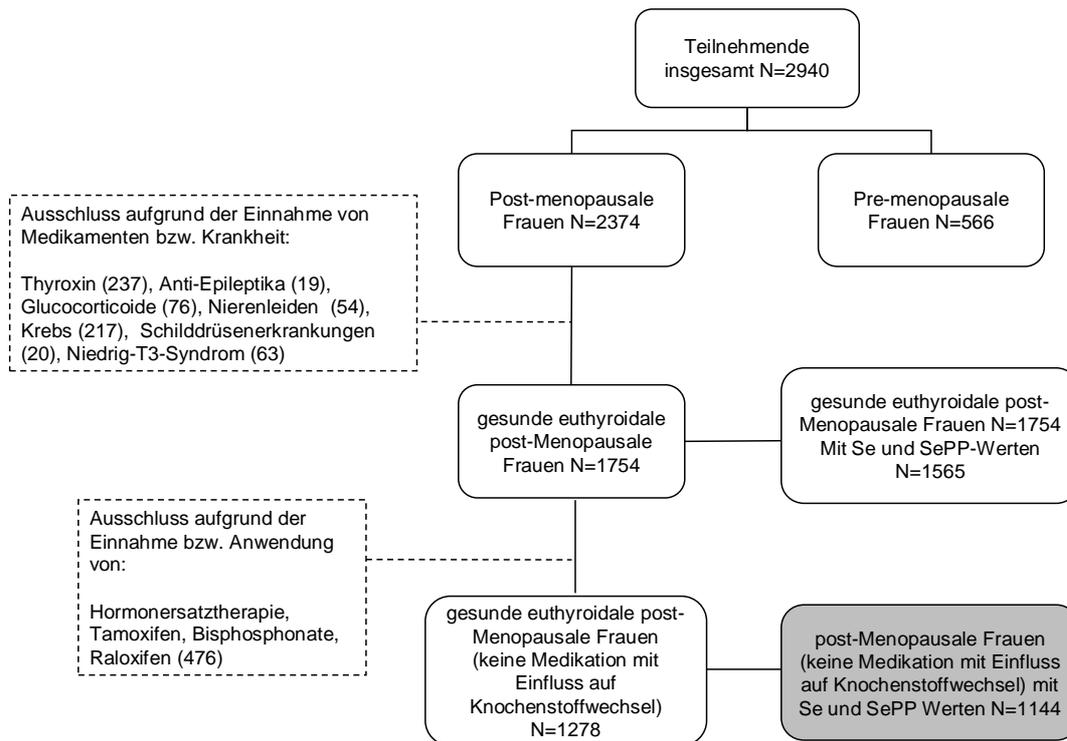


Abb. 4-35: OPUS-Kollektiv zur Bestimmung des Selenstatus. Ausgehend von einer Stichprobe von 2940 Frauen konnte nach Anwendung der Ausschlusskriterien (Krankheit, Einnahme von Medikamenten, die entweder den Schilddrüsen- oder Knochenstoffwechsel beeinflussen) von 1144 Frauen der Selenstatus bestimmt werden.

Ergebnisse

Von diesen 1144 Frauen wurde neben Alter, BMI, Selenstatus und Knochenparametern auch der Schilddrüsenstatus bestimmt. Dazu wurde sowohl freies T4 (fT4), freies T3 (fT3) als auch TSH im Serum von der Arbeitsgruppe um Prof. G. Williams gemessen. Nach Erhalt der Serumproben wurden in unserer Arbeitsgruppe die Serum-SePP-Konzentration mittels Immunoassay und die Serum-Se-Konzentration mittels TRFA-Technologie bestimmt. In Tab. 4-1 sind die gemessenen Werte dargestellt.

Tab. 4-1: Charakterisierung der Studienpopulation

Parameter	Mittelwert \pm SD
N	1144
Alter [Jahren]	67,8 \pm 7
BMI [kg/m ²]	27,1 \pm 4,8
Jahre nach Eintritt der Menopause	18,7 \pm 9,0
Se [μ g/L]	97,74 \pm 26,25
SePP [mg/L]	3,24 \pm 0,77
fT4	12,82 \pm 1,92
fT3	3,70 \pm 0,81
TSH	1,13 \pm 1,2
Lendenwirbelsäule BMD [mg/cm ²]	1021 \pm 175
Hüftknochen [mg/cm ²]	863 \pm 144
Osteocalcin [ng/ml]	26,2 \pm 10,7
Prokollagen I N-terminales Propeptid (PINP) [ng/ml]	55,3 \pm 20,3
Serum Kollagen I C-terminales Telopeptid (s β CTX) [ng/ml]	0,27 \pm 0,25
Urin Kollagen I N-terminales Telopeptid/ Kreatinin [nM/mM] (uNTX/Cr)	56, \pm 31,4

4.3.2 Se Status und Schilddrüsenstatus

Da vielfach diskutiert wird, ob der Se-Status altersabhängig ist, wurde in Tab. 4-2 der Se-Status verschiedener Altersgruppen aufgeschlüsselt.

Tab. 4-2: Se-Status variiert im Alter. Es wurden vier Altersgruppen gebildet und deren Se- und SePP-Werte bestimmt. (n=1144)

Parameter	jünger 55 Jahre	55-65 Jahre	66-75 Jahre	älter als 75 Jahre
Se [μ g/L]	57,10 – 160,86	58,73 – 160,76	55,41 – 153,71	57,43 – 177,58
SePP [mg/L]	1,98 – 4,85	2,02 – 4,85	2,03 – 4,84	1,99 – 4,80

Die statistische Auswertung ergab eine signifikante, wenn auch schwache Abnahme der Se-Konzentration im Serum mit zunehmendem Alter (Kruskal-Wallis (K-W) 8,79, p=0,012), die

Ergebnisse

SePP-Konzentration bleibt jedoch konstant (K-W 3,08, $p=0,214$). Se ist in Form der Aminosäure Sec Bestandteil von SePP, weshalb die Korrelation zwischen Se und SePP-Konzentration im Serum untersucht wurde. In Abb. 4-36 ist die Se-Konzentration gegen den SePP-Wert aufgetragen. Es war eine gute Korrelation und das Erreichen eines oberen maximalen SePP-Niveaus von ca. 5-6 mg SePP/L Serum zu beobachten (Spearman's rho 0,324; $p < 0,001$)

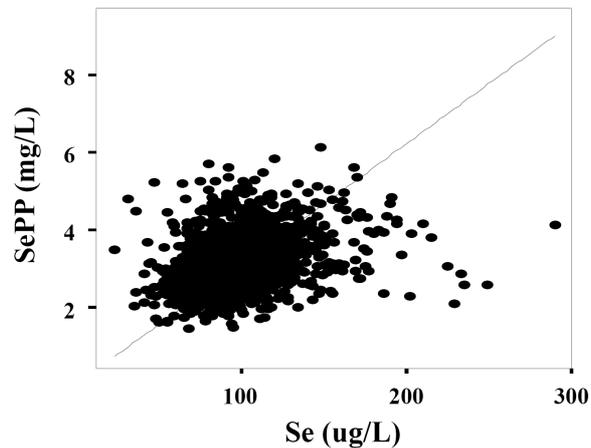


Abb. 4-36: Korrelation von Se- und SePP-Konzentrationen im Serum der Probandinnen des OPUS-Kollektivs. Die Se- und SePP-Werte der 1144 Frauen wurden gegeneinander aufgetragen. Die statistische Auswertung ergab eine signifikante Korrelation. ($n=1144$, Spearman's rho 0,324; $p < 0,001$)

Se als Bestandteil der Dejodasen steht in engem Zusammenhang mit dem Schilddrüsen-Status. Die Beziehung zwischen Schilddrüsenhormonen und dem Se-Status sind in Tab. 4-3 dargestellt.

Tab. 4-3: Assoziation der Schilddrüsenhormone mit dem Se-Status.

	fT4 (pMol)				fT3 (pMol)			
	Modell R ²	β -Koeffizient CI), (niedrigster Wert, höchster Wert)	(95% p		Modell R ²	β -Koeffizient CI), (niedrigster Wert, höchster Wert)	(95% p	
Se	0,012	-0,094 (-1,967, 0,604)	-	< 0,001	0,010	-0,087 (-4,353, 1,186)	-	0,001
SePP	0,017	-0,129 (-0,069, 0,030)	-	< 0,001	0,030	-0,172 (-0,199, 110)	-0,	< 0,001

Die Schilddrüsenhormone T3 und T4 waren in ihrer ungebundenen freien Form fT3 und fT4 negativ mit dem Selenstatus korreliert ($n=1144$, Schrittweise Regressionsanalyse). Dieser Zusammenhang war statistisch signifikant und galt sowohl für die SePP- als auch für die gesamte Se-Konzentration im Serum. Je geringer die Se-Konzentration, desto höher war die

Ergebnisse

Konzentration freier Schilddrüsenhormone. Der β -Koeffizient betrug für den Zusammenhang zwischen Se-Status und fT4-Konzentration im Falle der SePP-Konzentration $\beta = -0,129$, $p < 0,001$ und im Falle der Se-Konzentration $\beta = -0,094$, $p < 0,001$. Für die fT3-Konzentration ergaben sich für die Korrelation mit der Se-Konzentration ein β -Koeffizient von $\beta = -0,087$, $p = 0,001$ und für die SePP-Konzentration ein β -Koeffizient von $\beta = -0,172$, $p < 0,001$. Die Schilddrüsenhormonbiosynthese unterliegt einer strengen Regulation, u. A. durch TSH. Tab. 4-4 stellt den Zusammenhang zwischen Se-Status und der Konzentration an TSH und dem fT4/fT3-Verhältnis dar.

Tab. 4-4: Assoziation von Schilddrüsenparametern und dem Se-Status.

	TSH (mU/l)			fT4/fT3		
	Modell	β -Koeffizient (95% CI), (niedrigster Wert, höchster Wert)	p	Modell	β -Koeffizient (95% CI), (niedrigster Wert, höchster Wert)	p
Se	0,004	0,030 (-0,458, 1,889)	0,232	0,004	0,032 (-0,574, 2,658)	0,206
SePP	0,002	0,025 (-0,016, 0,050)	0,318	0,008	0,082 (0,029, 0,120)	0,001

TSH, als feedback-Regulator der SH-Synthese war nicht statistisch signifikant mit dem Se-Status assoziiert ($n=1144$, Schrittweise Regressionsanalyse), weder für die Se- noch für die SePP-Konzentration im Serum konnte eine statistisch signifikante Korrelation gefunden werden. Der β -Koeffizient betrug $\beta = 0,030$, $p = 0,232$ für die Se-Konzentration und $\beta = 0,025$, $p = 0,318$ für die SePP-Konzentration. Das Verhältnis aus freiem T4 und freiem T3 (fT4/fT3) war nicht mit der Se-Konzentration ($\beta = 0,032$, $p = 0,206$) aber statistisch signifikant (positiv) mit der SePP-Konzentration ($\beta = 0,082$, $p = 0,001$) assoziiert.

4.3.3 Se Status und Knochenparameter

PTH und VitD sind wichtige hormonelle Regulatoren des Knochenmetabolismus. Da im Rahmen der OPUS-Studie die Serum-VitD- und Serum-PTH-Konzentrationen der Probandinnen bereits erfasst wurden, konnte mit Hilfe der von uns gemessenen Se-Daten der Zusammenhang zwischen Se-Status und VitD bzw. PTH-Konzentration untersucht werden.

Ergebnisse

Tab. 4-5 gibt einen Überblick über die statistische Auswertung dieser Analysen.

Tab. 4-5: Assoziation von 25-OH-VitD bzw PTH und dem Se-Status.

	25-OH-VitD				PTH			
	Modell R ²	β-Koeffizient CI), (niedrigster Wert, höchster Wert)	(95% p		Modell R ²	β-Koeffizient CI), (niedrigster Wert, höchster Wert)	(95% p	
Se	0,016	0,110 (0,138, 0,446)	< 0,001		0,019	-0,125 (-0,206, 0,074)	< 0,001	
SePP	0,000	0,018 (0,003, 0,006)	0,554		0,005	0,074 (-0,004, 0,000)	0,015	

Eine höhere VitD-Konzentration war zwar mit einer höheren Se-Konzentration ($\beta = 0,110$, $p < 0,001$) nicht jedoch mit der SePP-Konzentration ($\beta = 0,018$, $p = 0,554$) assoziiert ($n=688$, Schrittweise Regressionsanalyse). Eine steigende PTH-Konzentration hingegen war sowohl mit einer sinkenden Se-Konzentration ($\beta = -0,125$, $p < 0,001$) als auch mit einer sinkenden SePP-Konzentration ($\beta = -0,074$, $p = 0,015$) assoziiert.

Betrachtet man den Zusammenhang zwischen Se-Status und der Knochendichte (*bone mineral density*, BMD) der Lendenwirbelsäule oder der Hüfte, so ergab sich, dass sowohl hohe Se- als auch hohe SePP-Werte mit einer erhöhten Knochendichte der Hüftknochen einhergehen.

Ergebnisse

Tab. 4-6 zeigt die statistische Auswertung für die Bestimmung der BMD von Lendenwirbelsäule und Hüftknochen zu Beginn und zum Ende der Studie.

Tab. 4-6: Assoziation von BMD der Hüft- bzw. Lendenwirbelknochen und dem Se-Status. Es sind die Mittelwerte \pm SD dargestellt.

	Se			SePP		
	Model R ²	β -Koeffizient (95% CI) (Extrema)	p	Model R ²	β -Koeffizient (95% CI) (Extrema)	p
Lendenwirbelsäule Studienbeginn	0,135	-0,002 (-0,400, -0,374)	0,948	0,142	0,088 (6,688, 33,383)	0,003
Lendenwirbelsäule Studienende	0.140	-0.005 (-0.579, 0.503)	0.890	0.145	0.068 (-1.640, 32.506)	0.076
Veränderung BMD Lendenwirbelsäule	0.117	-0.037 (-0.325, 0.113)	0.342	0.128	-0.115 (-17.311, 3.537)	0.003
Hüfte Studienbeginn	0.304	0.072 (0.123, 0.660)	0.004	0.312	0.113 (12.163, 30.364)	<0.001
Hüfte Studienende	0.307	0.036 (-0.130, 0.488)	0.255	0.317	0.106 (7.770, 28.691)	0.001
Veränderung BMD Hüfte	0.017	0.015 (-0.109, 0.167)	0.683	0.019	-0.055 (-8.211, 1.198)	0.144

Ein hoher Se-Status war mit einer erhöhter Knochendichte in der Hüfte assoziiert (n=1144, Schrittweise Regressionsanalyse). Frauen mit einem hohen Se-Status hatten zu Studienbeginn eine höhere Knochendichte in der Hüfte als Frauen mit einem niedrigen Se-Status. Dies galt sowohl für Se ($\beta=0,072$, $p=0,004$) als auch für SePP ($\beta=0,113$, $p<0,001$). Darüber hinaus zeigten Frauen mit einer hohen SePP-Konzentration auch nach 6 Jahren eine erhöhte BMD der Hüftknochen ($\beta=0,106$, $p=0,001$). Zwischen dem BMD der Lendenwirbel und dem Se-Status konnte in Bezug auf die Se-Konzentration kein statistisch signifikanter Zusammenhang gezeigt werden ($\beta=-0,02$, $p=0,948$). SePP war jedoch zu Studienbeginn statistisch signifikant positiv mit dem BMD assoziiert ($\beta=0,088$, $p=0,003$). Sechs Jahre später gab es sowohl für Se als auch für SePP keinerlei statistischen Zusammenhang zum BMD (Se: $\beta=-0,005$, $p=0,890$, SePP: $\beta=0,068$, $p=0,076$).

Für einen besseren Überblick wurden die Frauen entsprechend ihrer Se- bzw. SePP-Werte in Quintile eingeteilt und diese anschließend mit dem Kruskal-Wallis-Test hinsichtlich eines

Ergebnisse

Zusammenhangs zwischen Se-Status und BMD analysiert. In Abb. 4-37 werden sowohl die Knochendichte der Lendenwirbelsäule und der Hüfte als auch die Veränderung der Knochendichte für die einzelnen Quintile graphisch dargestellt.

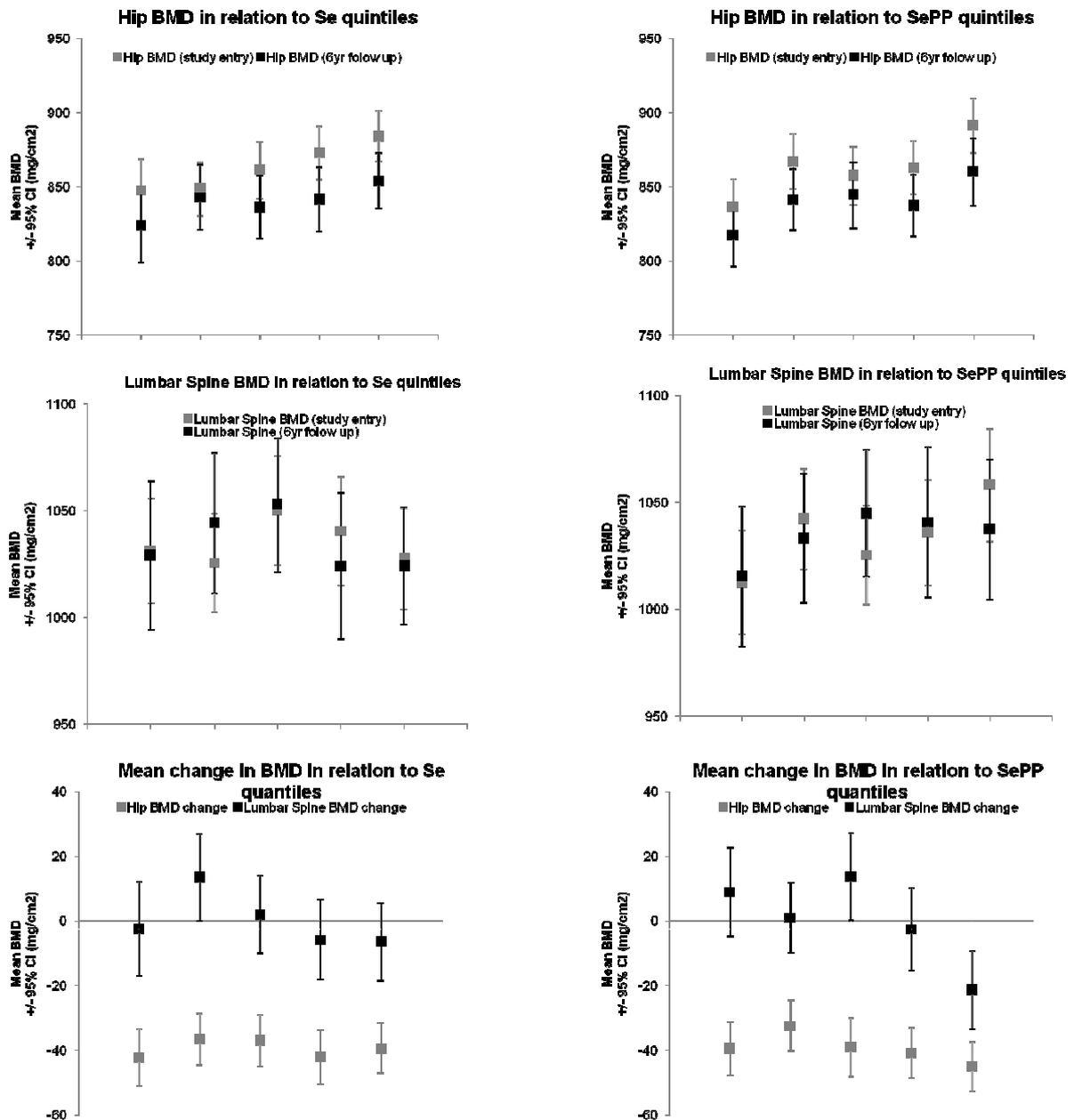


Abb. 4-37: Assoziation von BMD der Hüft- und Lendenwirbelknochen und Se-Status innerhalb der verschiedenen Se- bzw. SePP-Quintile. Die Frauen wurden entsprechend ihrer Se- bzw. SePP-Konzentration im Serum in fünf Quintile eingeteilt und die Knochenmineraldichte (BMD) von Lendenwirbelsäule und Hüfte entsprechend aufgetragen. Zusätzlich wurde die Veränderung des BMD innerhalb des Studienzeitraums von sechs Jahren untersucht. (n=1144, Kruskal-Wallis-Test)

Die Frauen im höchsten Se-Quintil hatten eine signifikant höhere Hüftknochendichte als Frauen mit einem niedrigeren Se-Wert (K-W = 10,99; p= 0,027). Auch die Frauen deren SePP-Werte im höchsten Quintil lagen, wiesen eine erhöhte Knochendichte in der Hüfte auf (K-W=13,52; p=0,009). In der Lendenwirbelsäule konnte keinerlei signifikanter

Ergebnisse

Zusammenhang zwischen Se-Status und Knochenmineraldichte nachgewiesen werden. Außerdem war dieser Zusammenhang in der Hüfte nur zu Studienbeginn zu beobachten, im Rahmen der sechs Jahre später durchgeführten Nachuntersuchungen konnte kein Zusammenhang mehr festgestellt werden. Wertete man die Knochendichte zu Beginn und am Ende der Studie für Frauen mit einem besonders niedrigen oder besonders hohen Se-Status aus, so konnte für Se keine Assoziation gefunden werden. In Frauen mit den höchsten SePP-Konzentrationen im Serum kam es innerhalb der sechs Jahre zu einer signifikanten Abnahme der Knochendichte in der Lendenwirbelsäule (K-W= 17,42; p=0,002). Die Absolutwerte für die niedrigsten und höchsten Quintile der Se- bzw. SePP-Konzentrationen sind in Tab. 4-7 dargestellt.

Tab. 4-7: Se-Status und BMD der Lendenwirbelsäule und der Hüfte

BMD [mg/cm ²]	Se [µg/L]		SePP [mg/L]	
	Niedrigstes Quintil	Höchstes Quintil	Niedrigstes Quintil	Höchstes Quintil
Lendenwirbelsäule Studienbeginn	1031±175	1028±170	1013±174	1058±186
Lendenwirbelsäule Studienende	1029±179	1027±160	1015±180	1040±185
Änderung BMD Lendenwirbelsäulen	-2.4±74.3	-6.6±68.9	9.0±75.9	-21.4±67.7
Hüfte Studienbeginn	848±162	884±132 *	837±145	891±139 *
Hüfte Studienende	824±142	854±120	817±128	860±141
Änderung BMD Hüfte	-42.4±49.7	-39.4±48.8	-39.5±50.0	-45.0±47.6

Nur für den BMD der Hüftknochen gibt es statistisch signifikante Unterschiede (n=1144, Mittelwerte ±SD, Kruskal-Wallis, * = p>0,05) zwischen den Frauen des ersten Quintils (niedrigste Se- bzw. SePP-Konzentration) und den Frauen des fünften Quintils (höchste Se- bzw. SePP-Konzentration). Je höher die Se- bzw. SePP-Konzentration desto höher der BMD (Se: 848±162 vs. 884±132, SePP: 837±145 vs. 891±139).

4.3.4 Se-Status als Biomarker für das Frakturrisiko

Die Se- oder auch die SePP-Konzentration im Serum gibt Hinweis auf den Gesundheitszustand eines Menschen und kann als Biomarker dienen. Die statistische Auswertung des Frakturrisikos im Zusammenhang mit dem Selenstatus zeigte, dass es in den von uns untersuchten postmenopausalen Frauen keinerlei Assoziation zwischen Se-Status und Frakturrisiko gibt. Tab. 4-8 zeigt die statistische Auswertung (Odd's Ratio bzw.

Ergebnisse

Hazard Ratio) für das Auftreten von Wirbelbrüche bzw. anderer Brüche im Zusammenhang mit dem Se-Status.

Tab. 4-8: Assoziation von Frakturrisiko und Se-Status.

		Logit-Modell		Cox—Regression	
		Odds Ratio (95% CI)	p	Hazard Ratio (95% CI)	p
Se	Grundwert	0,99 (0,99-1,01)	0,375		
	Wirbelbrüche				
	Anzahl Wirbelbrüche	0,99 (0,98-1,01)	0,361		
	Anzahl anderer Brüche			1,00 (0,99-1,01)	0,850
SePP	Grundwert	0,99 (0,79-1,23)	0,910		
	Wirbelbrüche				
	Anzahl Wirbelbrüche	0,86 (0,53-1,39)	0,537		
	Anzahl anderer Brüche			1,24 (0,93-1,70)	0,184
Se	Grundwert	1,00 (0,99-1,01)	0,771		
	Wirbelbrüche				
	Anzahl Wirbelbrüche	0,99 (0,98-1,01)	0,366		
	Anzahl anderer Brüche			1,00 (0,99-1,01)	0,688
SePP	Grundwert	1,07 (0,85-1,34)	0,581		
	Wirbelbrüche				
	Anzahl Wirbelbrüche	0,84 (0,51-1,39)	0,504		
	Anzahl anderer Brüche			1,32 (0,96-1,81)	0,092

Die statistische Auswertung (n=1144, Schrittweise Regressionsanalyse) ergab keinerlei Zusammenhang zwischen Frakturrisiko und der Se- bzw. SePP-Konzentration im Serum. Auch die hinsichtlich Alter, BMI und BMD bereinigte Auswertung zeigte keinerlei signifikanten Zusammenhänge zwischen Se-Staus und vertebrealen bzw. nicht-vertebralen Brüchen (nicht gezeigt). Da auch biochemische Marker Aussagen über die Knochenphysiologie geben können, wurden zusätzlich einige Marker für die Knochenumbau bestimmt. Es bestand bei nahezu allen untersuchten Parametern ein signifikanter Zusammenhang zum Se-Status.

Ergebnisse

Tab. 4-9 fasst die Ergebnisse zum Zusammenhang zwischen Osteocalcin, P1NP, s β CTX, uNTX/Cr und dem Se-Status zusammen.

Tab. 4-9: Se-Status und klinische Parameter des Knochenumsatzes und extraskeletale Parameter

	Se				SePP		
	Model R ²	β -Koeffizient (95% CI) (Extrema)		p	Model R ²	β -Koeffizient (95% CI) (Extrema)	p
Osteocalcin	0.042	-0.101 (-0.064, -0.017)		0.255	0.037	-0.077 (-1.876, -0.274)	0.009
P1NP	0.021	-0.074 (-0.102, -0.012)		0.013	0.018	-0.046 (-2.738, 0.333)	0.125
s β CTX	0.023	-0.058 (-0.001, 0.000)		0.050	0.025	-0.075 (-0.044, -0.006)	0.012
uNTX/Cr	0.025	-0.095 (-0.185, -0.043)		0.002	0.029	-0.110 (-6.929, -2.116)	<0.001
Studienbeginn							
Pulsrate	0.026	0.076 (0.007, 0.051)		0.011	0.028	0.089 (0.396, 1.902)	0.003
Griffstärke	0.100	-0.009 (-0.014, 0.010)		0.773	0.106	-0.078, (-0.956, -0.121)	0.011
Balance	0.109	0.041 (-0.001, 0.007)		0.151	0.108	-0.028 (-0.222, 0.073)	0.322

In unserer Studie waren die Knochenaufbaumarker Osteocalcin und P1NP negativ mit dem Se-Status assoziiert (n=1144, Schrittweise Regressionsanalyse), Osteocalcin, ein Marker des Knochenaufbaues, war nur mit der SePP-Konzentration statistisch signifikant assoziiert (β = -0.077, p=0.009). Der Se-Status und die Osteocalcinkonzentration hingen nicht voneinander ab (β = -0.101, p=0.255). P1NP (Prokollagen Typ I), der Hauptbestandteil der organischen Knochenmatrix, spiegelt die Aktivität der Knochenformation wider. Eine erhöhte P1NP-Konzentration der Probandinnen war statistisch signifikant mit einer niedrigen Se-Konzentration (β = -0.074, p=0.013) aber nicht mit der SePP-Konzentration assoziiert (β = -0.046, p=0.125).

Die Knochenabbaumarker s β CTX und uNTX/Cr waren in unserer Studie ebenfalls mit dem Se-Status assoziiert. s β CTX (*serum C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen*),

Ergebnisse

bezeichnet Abbaufragmente von Typ-1-Kollagen und ist ein Marker für Knochenabbauprozesse. Bei den von uns untersuchten Frauen war ein reduzierter s β CTX-Spiegel mit erhöhten Se- bzw. SePP-Konzentrationen im Serum statistisch signifikant assoziiert (Se: $\beta = -0.058$, $p = 0.050$, SePP: $\beta = -0.075$, $p = 0.012$). Ein weiterer Marker für den Knochenabbau stellt das Verhältnis von uNTX/Cr (Urin-N-Telopeptid bezogen auf Urin Creatinin) dar. Dieses Verhältnis war ebenfalls statistisch signifikant mit dem Se-Status assoziiert. Eine Abnahme von uNTX/Cr war sowohl mit einer steigenden Se-Konzentration ($\beta = -0.095$, $p = 0.002$) als auch mit einer steigenden SePP-Konzentration ($\beta = -0.110$, $p < 0.001$) insgesamt lässt dies auf einen verminderten Knochenumbau schließen.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Spurenelements Selen und der Expression funktionaler Selenoproteine auf den Knochenmetabolismus sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, d.h. sowohl im Mausmodell als auch anhand einer humanen epidemiologischen Kohortenstudie untersucht. Generell lässt sich resümieren, dass es in allen drei untersuchten Modellen einen deutlichen Effekt der Selenoproteine bzw. des Selenstatus auf die Chondrogenese bzw. eine signifikante Assoziation des Selenstatus mit Markern des Knochenumbaus gegeben hat. Inwieweit diese Beobachtungen von klinischer Relevanz sind, muss in entsprechenden Interventionsstudien analysiert werden. Hierbei ist unbedingt zu bedenken, dass Selen nicht nur ein essentielles sondern auch ein toxisches Spurenelement sein kann, je nachdem in welcher Konzentration es bereits vorliegt bzw. supplementiert wird. Ähnlich wie in der Diskussion zur Bedeutung von Selen bei Tumorerkrankungen ist davon auszugehen, dass es einen optimalen Selenstatus für die Knochenphysiologie gibt. Anhand der in dieser Arbeit gefundenen Zusammenhänge liegt es nahe, einen Selenstatus anzustreben, der eine optimale Expression des in der Zirkulation gut messbaren Selenbiomarkers Selenoprotein P vermittelt. Dieses Protein wird ab einer ausreichenden Selenkonzentration maximal exprimiert; eine übermäßige Zufuhr, die ggf. auch toxische Nebenwirkungen bedingt, liegt erst nach Erreichen der maximalen Selenoprotein P Konzentration vor und könnte anhand der Bestimmung dieses Biomarkers vermieden werden.

5.1 Zur Se-Abhängigkeit der Chondrogenese *in vitro*

In vitro Versuche sind generell gut geeignet, um direkte Effekte von Modulatoren eines physiologischen Stoffwechselweges bzw. endogenen Prozesses zu testen. Anhand des deutlichen Phänotyps der Kinder mit vererbten Mutationen in SBP2, die durchgehend durch eine starke Knochenreifungsverzögerung gekennzeichnet sind (Azevedo *et al.* 2010), lag es nahe, ein *in vitro* Modell der Chondrogenese und Osteogenese entsprechend zu untersuchen. Das *in vitro* Micromass Modell stellt ein solches Zellkultursystem dar, das bisher häufig für toxikologische Studien, aber inzwischen auch häufig in einer Reihe aufschlussreicher Studien zu Details der Chondro- und Osteogenese genutzt wurde (Daniels *et al.* 1996; Handschel *et al.* 2007; Piersma 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte ein großer Einfluss des Se-Status auf die Differenzierung muriner Knorpelvorläuferzellen gezeigt werden. Die Stimulation mit 100 nM NaSe führte zu einer deutlich beschleunigten Differenzierung zu Knorpelzellen, wie durch eine stärkere Anfärbung mit Alzian Blue gezeigt werden konnte (siehe Abb. 4-2). Dieser Effekt war in den WT-Zellen stärker als in den KO-Zellen. Der Einfluss einer Se-Supplementation war dabei stärker als der Effekt des *SepP*-

Genotyps. In bisherigen Studien wurde häufig der Einfluss von Se auf die Chondrogenese im Transplantationsmodell untersucht. Huang *et al.* konnten zeigen, dass mesenchymale Stammzellen aus Kaninchen durch Gabe von Se und anderen Faktoren *in vitro* zur Chondrogenese angeregt werden (Huang *et al.* 2005). Bovine, aus Knorpel gewonnene Chondrozyten stellten hingegen *in vitro* die Knorpelbildung nach Stimulation mit einer Insulin-Transferrin-Selenium (ITS)-Mischung fast vollständig ein (Yates *et al.* 2005). In der Gruppe von Hsieh-Bonassera *et al.*, konnten differenzierte Chondrozyten durch Gabe von IST redifferenziert und so für eine mögliche klinische Anwendung verfügbar gemacht werden (Hsieh-Bonassera *et al.* 2009).

Die murinen Knorpelvorläuferzellen wurden auch hinsichtlich ihrer Mineralisierungskapazität untersucht, indem sie auf ALP-Aktivität getestet wurden. Auch hier zeigte sich ein starker Einfluss einer Se-Supplementation. Die Stimulation mit 100 nM NaSe bewirkte in den WT-Zellen eine signifikante Steigerung der ALP-Aktivität. In den KO- und WT-extra-Zellen konnte keine signifikante Änderung festgestellt werden. Der Einfluss des Genotyps ist im Falle der ALP-Aktivität noch geringer als bei der Alzian Blau-Färbung.

Zudem konnte sowohl für die Chondrogenese (Alzian Blau-Färbung) als auch die Mineralisierungskapazität (ALP-Färbung) ein sehr schmales Zeitfenster der positiven Se-Wirkung beobachtet werden. Die ca 0,5 Tage älteren WT-extra-Zellen konnten durch Se-Gabe nicht in die Differenzierung gedrängt werden. Sie unterschieden sich aber in Alzian-Blau-Färbung und ALP-Aktivität signifikant von den jüngeren WT-Tieren (siehe Abb. 4-2 und Abb. 4-4)

Se wird in Form von SePP gespeichert und im Organismus transportiert. Eine Stimulation mit Se führt i. A. zu einer erhöhten SePP-Expression *in vitro* und *in vivo* (Hoefig *et al.* 2011; Stodter *et al.* 2010). Ob dies in Chondrozyten ebenso ist, muss in weiterführenden Analysen bestimmt werden. In der Arbeitsgruppe von Prof. L. Schomburg wird unter anderem untersucht, ob und in welchem Maße SePP in Knorpelvorläuferzellen und Knochengewebe exprimiert wird. Se könnte in Form von SePP Sec-Reste für die Synthese von Dejodasen in den Knorpelvorläuferzellen zur Verfügung stellen und die Konzentration der Schilddrüsenhormone regulieren. T3 ist ein wichtiger Faktor während der Chondrogenese. Mello *et al.* zeigten, dass vom Hühnchen stammende Knorpelvorläuferzellen durch T3 hypertroph werden (Mello *et al.* 2006). T3 spielt somit während der endochondralen Ossifikation eine wichtige Rolle, da hypertrophe Chondrozyten Kollagen TypX sezernieren und zur Mineralisierung der Matrix beitragen (Alini *et al.* 1996; Burdan *et al.* 2009; Wongdee *et al.* 2012). Bisher konnte in murinen Chondrozyten nur die Expression von Dio3 nachgewiesen werden (Williams *et al.* 2008). Dio3 inaktiviert die Schilddrüsenhormone T4 und T3. Williams *et al.* verglichen Chondrozyten von 3 Wochen alten Tieren mit Chondrozyten älterer Tiere und stellten eine Abnahme der Dio3-Expression

in den älteren Tieren fest (Williams *et al.* 2008). Somit könnte es durchaus sein, dass auch T3 während der endochondralen Ossifikation in einem engen Zeitfenster wirkt oder rhythmischen Schwankungen unterliegt. Ein Einfluss der Se-Supplementation auf die Dio3-Expression ist demzufolge nicht auszuschließen. In nachfolgenden Studien sollte daher verstärkt der Mechanismus der Se-Wirkung untersucht werden. Die Expression bestimmter Selenoproteine, wie SepP, Dejodasen und auch TrxR und GPx in Chondroprogenitorzellen und im Laufe der Differenzierung zu Knorpelgewebe müsste untersucht und wenn vorhanden später mit entsprechenden siRNAs ausgeschaltet werden. Dadurch könnte zum Einen untersucht werden, ob Se die Expression der genannten Proteine beeinflusst und in wiefern diese eine Rolle bei der endochondralen Knorpel- und Knochenbildung spielen. Sun *et al.* weisen darauf hin, dass miRNAs eine wichtige Rolle während der endochondralen Ossifikation spielen. Sie postulieren darüber hinaus eine miRNA-abhängige Regulation der Selenoproteinexpression während der endochondralen Ossifikation (Sun *et al.* 2011). Für SepP konnte von Dewing *et al.* bereits eine spezifische miRNA (miR-7) als Inhibitor der Expression bestimmt werden (Dewing *et al.* 2012). Obwohl sie die Regulation der *SepP*-Expression im Hirn untersuchten, ist es sehr wahrscheinlich, dass *SepP* auch im Knorpel- bzw. Knochengewebe einer Regulation durch miRNAs unterliegt.

Die Analyse der differentiellen Genexpression in der murinen Micromass-Kultur zeigte nur für die ALP einen signifikanten Unterschied. Die ALP wurde sowohl in WT- als auch in KO-Zellen nach 14-tägiger Stimulation signifikant stärker exprimiert als nach siebentägiger Stimulation mit Se (siehe Abb. 4-5). Die ALP ist ein Maß für die Mineralisierungskapazität der Zellen. Die späte Expression entspricht den Ergebnissen der Studie von Gerber *et al.* bei der die ALP-Aktivität ein Maximum nach zweiwöchiger Micromass-Kultur erreichte (Gerber *et al.* 2005).

VitD ist ein wichtiger Regulator des Ca^{2+} -Haushalts und hat wie in Abschnitt 1.4.2.3 beschrieben auch Auswirkungen auf den Knochen. Die Biosynthese von VitD ist komplex und läuft zum Teil in der Leber ab. Um die Se-Abhängigkeit der Biosynthese des Prohormons 25-OH-VitD zu untersuchen, wurden Hepa-1-6 Zellen mit 10 nM bzw. 100 nM NaSe oder SeMet stimuliert und anschließend die Genexpression von VDBP, Cyp27a1 analysiert. Weder NaSe noch SeMet hatte einen statistisch signifikanten Einfluss auf VDBP und Cyp27a1.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zur Se-Abhängigkeit der Chondrogenese *in vitro* geben erste Hinweise darauf, dass Se ein entscheidender Faktor in der embryonalen Knochenentwicklung sein könnte. Die hier dargestellten Ergebnisse müssen jedoch in Folgestudien verifiziert und reproduziert werden. Die Probenanzahl (n=3) der bisher durchgeführten Experimente war zu klein, um endgültige Aussagen treffen zu können. Sollte die Expression von SepP in den Zellen der Micromasskultur nicht nachgewiesen werden

können, gäbe es die Möglichkeit mit Hilfe der tg*SePP*-Mauslinie, die von Renko et al. entwickelt wurde (Renko *et al.* 2008), die humanes *SePP* transgen in der Leber exprimiert, zu überprüfen, ob *SePP* evtl. über das Blut zu den Chondroprogenitorzellen gelangt.

5.2 Zur Se-Abhängigkeit von Wachstum und Parametern des Knochenstoffwechsels im Tiermodell

In vitro Studien sind gut geeignet, um lokale Prozesse und molekulare Mechanismen zu charakterisieren und hypothetische Stoffwechselwege zu überprüfen. Der Säugermechanismus stellt allerdings ein komplexes Multiorgansystem dar. Die Signalübertragung innerhalb eines Organismus erfolgt deshalb schwerpunktmäßig über lösliche ins Blut sezernierte Faktoren, die Hormone. Zu den wichtigsten Hormonen mit Relevanz für den Knochenstoffwechsel, i.e., für Chondrogenese, Osteogenese, Osteoklasten-Aktivität und Calcium- und Phosphatstoffwechsel gehören neben Calcitonin aus der Schilddrüse das Parathormon der Nebenschilddrüse und Vitamin D, welches durch drei interagierende Organe aktiviert wird, i.e., die Haut, Leber und Niere. Geschwindigkeitsbestimmend für die Vitamin D Biosynthese sind die UV-katalysierte Spaltung des B-Rings in der Haut und die 1 α -Hydroxylierung in der Niere durch die 1- α -Hydroxylase, systematisch als CYP-27a1 bezeichnet. Der stabilere Vorläufer des aktiven Vitamin D, das 25-Hydroxy-Vitamin D, wird in der Leber durch 25-Hydroxylierung generiert, und als Biomarker des Vitamin D Status im Menschen in Serum bestimmt. Angesichts des deutlichen Wachstumsdefekts der *SepP*-Knockout Mäuse lag es nahe, die Expression dieser Enzyme auf RNA-Ebene zwischen den Geschlechtern und abhängig vom Genotyp und Alter zu vergleichen.

In einem ersten Versuch wurden WT und KO-Tiere im Alter von 34 Tagen getötet und die Expression von Enzymen der VitD-Biosynthese und weiteren, für die Knochenhomöostase wichtigen Hormonen (PTH, Calcitonin) untersucht (siehe Abschnitt 4.2.1.2).

Es konnte kein nennenswerter Einfluss des *SepP*-Genotyps beobachtet werden, die Expressionsraten waren in Männchen und Weibchen bei WT- und KO-Tieren ähnlich. Im Falle von VDBP und Calcitonin wiesen die KO-Männchen jedoch eine statistisch signifikant höhere Expression als die WT-Männchen auf ($p < 0,05$) (siehe Abb. 4-10). Der Vergleich von Männchen und Weibchen zeigte eine signifikant erniedrigte Expression der Cyp24a1 in den KO-Männchen (siehe Abb. 4-11). Diese zeigten auch im Vergleich mit den WT-Männchen eine stark erniedrigte Cyp24a1-Expression, allerdings war sie in diesem Fall nicht signifikant. Die Cyp24a1 katalysiert die Inaktivierung des aktiven 1 α , 25-(OH)₂-VitD₃ in 1 α , 24, 25-(OH)₃-VitD₃. KO-Männchen schienen demnach unter einem gestörten VitD-Stoffwechsel zu leiden, eine Serumanalytik hätte Aufschluss über die VitD-Konzentration geben können. Zu erwarten wäre eine stark erhöhte 1 α , 25-(OH)₂-VitD₃-Konzentration, ähnlich den Cyp24a1-KO-

Mäusen die St-Arnaud *et al.* beschrieben haben (St.-Arnaud 1996). Parallel zeigten die KO-Männchen eine leicht erniedrigte PTH-Expression. Dies würde allerdings eine gegenteilige Regulation der $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{-VitD}_3$ -Konzentration bewirken, da sinkende PTH-Konzentrationen, die Cyp24a1-Aktivität steigern (Henry *et al.* 1984). In meiner Arbeit habe mich auf die Untersuchung der mRNA konzentriert, so dass finale Aussagen über die Enzymaktivitäten nicht getroffen werden können. Zudem muss die Expression des funktionalen Proteins nicht im selben Maße reguliert sein, wie die entsprechende mRNA. Riese *et al.* konnten zeigen, dass die erhöhte Expression von Dio1-mRNA sich nicht in einer erhöhten Dio1-Aktivität niederschlug (Riese *et al.* 2006). Die veränderte VitD-Biosynthese der KO-Männchen schlug sich auch in der Knochenarchitektur nieder (siehe Abschnitt 4.2.1.1). Die KO-Männchen wiesen ein signifikant verringertes BV/TV-Verhältnis auf. Ihre Unterschenkel enthielten weniger Knochengewebe als die der Weibchen und WT-Männchen (siehe Abb. 4-8). Zwischen den Geschlechtern konnte in diesem Alter kein Unterschied festgestellt werden. Glatt *et al.* konnten allerdings zeigen, dass Veränderungen der Knochenarchitektur bei C57BL/6J-Mäusen nach 2 Monaten beginnen, wobei die Abnahme des BV/TV-Verhältnisses und der trabekulären Knochenmasse in Weibchen deutlich stärker ausfällt als in Männchen (Glatt *et al.* 2007). Ob diese Effekte durch einen nachteiligen *SepP*-Genotyp umgekehrt werden können, muss in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Einen ersten Hinweis können die in einem zweiten Versuch untersuchten *SepP*-Mäuse geben (siehe Abschnitt 4.2.2). Die Mäuse wurden auf Se-adäquatem Futter gehalten und nach 14, 80 oder 159 Tagen getötet. Ihre Extremitäten-Knochen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. G. Williams (Imperial College, London) analysiert (siehe Abschnitt 4.2.1.1). Zusätzlich erfolgte die Analyse der Genexpression der Enzyme der VitD-Biosynthese und von PTH und Calcitonin (siehe Abschnitt 4.2.2.2).

Mit zunehmendem Alter nahm die Knochenlänge und auch die Cortex-Dicke in beiden Geschlechtern zu. Zwischen den *SepP*-Genotypen war in den Männchen im Alter von 14 Tagen ein signifikanter Unterschied festzustellen. Die HZ-Tiere hatten signifikant längere Knochen. Die KO-Tiere unterschieden sich unterdessen nicht von den WT-Tieren. Der Einfluss des *SepP*-Genotyps nahm mit zunehmendem Alter ab. Die 80 und 159 Tage alten Tiere zeigten keine Genotyp-bedingten Längenunterschiede. In den Weibchen war der Genotyp-Effekt nicht nur auf junge Tiere beschränkt. Die 14 Tage alten HZ und KO-Weibchen hatten signifikant längere Knochen als die WT-Weibchen. Im Alter von P159 hatten die HZ-Weibchen dann jedoch signifikant kürzere Knochen als die WT-Weibchen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass in den HZ- und KO-Tieren ein verstärktes Längenwachstum im Jugendalter stattfindet. Eine von Azevedo *et al.* untersuchte Patientin mit einer SBP2-Mutation zeigte ein verzögertes Knochenwachstum (Azevedo *et al.* 2010).

Eine Mutation in SBP2 führt zu einem abnormalen Schilddrüsenhormonstatus und einer veränderten Selenoproteinsynthese (Dumitrescu *et al.* 2005). Schomburg *et al.* zeigten, dass die SePP-Konzentration in Patienten mit SBP2-Mutationen um mehr als 50% reduziert war (Schomburg *et al.* 2009). Dies entspricht ungefähr der Abnahme an SepP-mRNA in heterozygoten *SepP*-Mäusen (Schomburg *et al.* 2003). Die längeren Knochen der P14 HZ-Tiere und die kürzeren Knochen der P159-Weibchen ließen sich somit mit einem vorschnellen Schließen der Wachstumsfuge erklären. Die histologischen Untersuchungen der Wachstumsfuge neugeborener Mäuse (siehe Abb. 4-28) zeigten keine gravierenden Unterschiede in der Anordnung der Chondrozyten in der Wachstumsfuge. Histologische Analysen der Wachstumsfugen in Abhängigkeit vom *SepP*-Genotyp könnten genauere Erkenntnisse dazu liefern, inwiefern es während des Längenwachstums zu Veränderungen des Aufbaus der Wachstumsfuge kommt. Eine Reduktion der *SepP*-Expression in der Leber durch einen veränderten *SepP*-Genotyp verändert auch die Expression anderer Selenoproteine, unter Anderem der Dejodasen (Schomburg *et al.* 2003). Bassett *et al.* konnten zeigen, dass in hyperthyreoten Mäusen die reduzierte Schilddrüsenhormonkonzentration Ursache einer veränderten Knochenentwicklung war. Die Schilddrüsenkonzentration der von Bassett *et al.* untersuchten Pax8- KO- und hyt/hyt-Mäuse liegen unterhalb der Nachweisgrenze. Die Mäuse zeigten ein stark verzögertes Knochenwachstum und eine veränderte Trabekelanordnung (Bassett *et al.* 2008). Schomburg *et al.* konnten jedoch nachweisen, dass die Dejodasen in den *SepP*-KO-Tieren zu den bevorzugt mit Se versorgten Organen gehören und deshalb der Schilddrüsenhormonspiegel der Tiere sich nicht von WT-Tieren unterscheidet (Schomburg *et al.* 2006). Die von Glatt *et al.* beobachteten Geschlechtsunterschiede in der Knochenarchitektur in höherem Alter, konnten aufgrund fehlender Bestimmung des BV/TV oder der trabekulären Knochenmasse in den *SepP*-Mäusen nicht bestätigt werden. Betrachtet man die Cortexdicke, so nahm diese mit zunehmendem Alter eher zu und unterschied sich nicht zwischen den Geschlechtern (Ergebnisse nicht dargestellt). Glatt *et al.* konnten in ihren Untersuchung zeigen, dass in C57BL/6J-Mäusen zwischen dem 2. und 6. Monat ein starker Knochenschwund auftritt, der anschließend langsamer erfolgt und in Weibchen schneller von statten geht (Glatt *et al.* 2007). Eine weitergehende Analyse der Knochen mittels μ CT oder DXA könnte Aufschluss geben, ob sich in den *SepP*-Mäusen ein ähnlicher Verlauf findet.

Zusätzlich wurden die wichtigsten Enzyme der VitD-Biosynthese auf ihre Expression untersucht (siehe Abschnitt 4.2.1.2). Es zeigte sich, dass die VitD-Biosynthese auch durch den *SepP*-Genotyp und zwar sex-spezifisch reguliert wurde. Die HZ-Männchen zeigten eine reduzierte Expression der Cyp27a1, Cyp27b1 und der Cyp24a1. Die gesamte Biosynthese von VitD schien in diesen Tieren herunterreguliert zu sein. In den Weibchen war die

Cyp27a1-Expression in den jüngeren (P14, P80) HZ-Tieren erhöht und erst im Alter von P159 zeigten die HZ-Weibchen eine erniedrigte Cyp27a1-Expression. Die Cyp27b1 war in den HZ-Weibchen tendenziell herunterreguliert, die Expression der Cyp24a1 unterschied sich fast nicht von den WT-Weibchen. Die Daten weisen demnach darauf hin, dass in den Männchen. Die Cyp27a1 Expression war in jungen Männchen HZ-Männchen im Vergleich zu den HZ-Weibchen erniedrigt, ebenso wie die Cyp27b1. Beide Cyps sind wichtig für die Synthese des aktiven $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{-VitD}$. Das inaktivierende Enzym Cyp24a1 wird in einem feedback-Mechanismus vor allem durch $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{-VitD}$ induziert (Pike *et al.* 2012). Im Falle der Männchen könnte die beeinträchtigte Biosynthese von $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{-VitD}$ eine niedrigere $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{-VitD}$ -Konzentration und dadurch eine geringere Cyp24a1-Expression nach sich gezogen haben. Tang *et al.* postulierten zeigen, dass auch die Cyp27b1 durch ihr Substrat 25-OH-VitD inhibiert werden könnte (Tang *et al.* 2010). Eine im Vergleich zu den Weibchen erhöhte Cyp27a1-Expression der Männchen könnte zu einer erhöhten 25-OH-VitD-Konzentration und damit zu einer Inhibition der Cyp27b1-Expression geführt haben. Serumanalysen könnten nun zeigen, inwiefern sich die veränderte Genexpression der HZ-Männchen in einer erniedrigten VitD-Konzentration im Serum widerspiegelt.

Viele Humanstudien untersuchen den Einfluss einer Se-Supplementation auf Knochenentwicklungsstörungen, wie die Kashin-Beck-Krankheit. Die Gabe von Se konnte das verzögerte Längenwachstum in Kindern mit Kashin-Beck ausgleichen (Moreno-Reyes *et al.* 2003). Eine Se-Supplementation erhöht in unterversorgten Probanden die SePP-Konzentration (Meplan *et al.* 2009). In bereits gut mit Se versorgten Menschen, wie z.B. Amerikanern führt eine Se-Gabe nur zu einer Erhöhung des Serum-Se-Spiegels und nicht zu einer erhöhten SePP-Konzentration (Combs *et al.* 2012; Meplan *et al.* 2009). In den hier vorgestellten Mäusen wurde allein der Einfluss des *SepP*-Genotyps auf die Knochenentwicklung untersucht. Se könnte aber auch unmittelbare Effekte auf Knochen- und Knorpelzellen bzw. deren Vorläufer haben. Se könnte die antioxidative Kapazität der mesenchymalen Stammzellen während der endochondralen Knochenbildung erhöhen, wie für *in vitro* kultivierte mesenchymale Stammzellen von Ebert *et al.* beschrieben (Ebert *et al.* 2006). Zeng *et al.* postulieren, dass über die Nahrung aufgenommenes Se potentiell vor Arthrose und Osteoporose schützen könnte. Allerdings nur im Falle einer (sehr) guten Se-Versorgung, bei der dass nicht für die Biosynthese von Selenoproteinen benötigte überschüssige Se den Knochenabbau durch Inhibition der Osteoklasten verringern könnte (Zeng *et al.* 2013). Inwiefern Se direkt einen Einfluss auf Knochenentwicklung und Knochenhomöostase hat, darüber könnten weiterführende Analysen mit dem *SepP*-Mäusen, die unterschiedliche Se-Diäten erhalten, Aufschluss geben.

5.3 OPUS-Kollektiv

In dieser Arbeit wird zum ersten Mal eine große einheitliche Studienpopulation auf den Zusammenhang zwischen Se-Status und Knochenparametern untersucht. Bisher konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob Se-vermittelte Effekte auf den Knochen über direkte Mechanismen oder indirekt über Iodstatus und/oder Schilddrüsenhormonstatus vermittelt werden (Moreno-Reyes *et al.* 1998; Moreno-Reyes *et al.* 2001; Suetens *et al.* 2001). Bei den hier analysierten Probandinnen handelt es sich um postmenopausale Frauen, deren Schilddrüsenstatus genau charakterisiert ist. Da nur euthyreote Frauen mit einem normalen Schilddrüsenhormonstatus in die Analyse eingeschlossen wurden, konnten verzerrende Effekte eines gestörten Schilddrüsenhormon-Status ausgeschlossen werden. Unter diesen Bedingungen zeigt sich, dass BMD und Knochenhomöostase mit dem Se-Status verknüpft sind und zwar unabhängig von Schilddrüsenparametern.

Zusätzlich konnten wir neue Zusammenhänge zwischen dem Se-Status und dem kardiovaskulärem System bzw. dem Bewegungsapparat feststellen. Eine positive Korrelation von Serum-Se bzw. -SEPP mit der Pulsrate bzw. der Griffstärke konnte von uns erstmals über diese Studie gezeigt werden. Es ist nicht genau trennbar, ob dies direkte Effekte des Se sind oder ob der Se-Status hier exemplarisch für den Gesamternährungsstatus der Probandinnen zu sehen ist.

In unzureichend versorgten Individuen korreliert SePP positiv mit dem Se-Status, was seine Wahl als geeigneten Biomarker rechtfertigt (Hoefflich *et al.* 2010). Die in der OPUS-Studie dargelegte starke Korrelation zwischen Se und SePP zeigt, dass die Probandinnen nicht ausreichend mit Se versorgt sind. Dieses Ergebnis stimmt gut damit überein, dass Europa generell einen selenarmen Kontinent darstellt (Lit.). Zu diesem generellen Mangel an diätetischer Se-Versorgung kommen noch individuelle Parameter, die einen Einfluss auf die Se-Konzentration der Studienteilnehmer haben, wie z.B. der persönliche Genotyp, das Alter, der Gesundheitsstatus etc. Die in höherem Alter sinkende Se-Konzentration bei konstanter SePP-Konzentration konnte zumindest in Bezug auf Se von einer finnischen Gruppe bestätigt werden (Maenpaa *et al.* 1989). In dieser Studie wurden jedoch nur Männer untersucht. Die Ergebnisse weiterer Studien sind widersprüchlich. In einer Studie, die wir zusammen mit Combs *et al.* durchgeführt haben, gab es keinen Zusammenhang zwischen Serum Se-Status und Alter (Combs *et al.* 2011). In dieser Studie waren aber auch nur sehr gut mit Se versorgte US Amerikaner eingeschlossen, in denen es auch keinen Zusammenhang von Se und SePP aufgrund eines ausreichend hohen Se-Status gibt. Hill *et al.* zeigten 1996, dass in gesunden chinesischen Probanden sowohl die Se- als auch die SePP-Konzentration im Serum nach einem Anstieg im Jugendalter bei Erwachsenen weitgehend konstant bleibt (Hill *et al.* 1996). Studienpopulationen aus den USA und Europa wiesen dahingegen auf leicht steigende Se- und SePP-Konzentrationen im Laufe des

Lebens ((Benes et al. 2005; Hollenbach et al. 2008; Laclaustra et al. 2009; Lopes et al. 2004). In unserer Studie mit Rasmussen *et al.* zeigt sich diese Tendenz allerdings explizit nur für Frauen (Rasmussen *et al.* 2009). Die von mir in dieser Arbeit präsentierten Daten haben erstmals gesunde euthyreote Frauen in Bezug auf ihren Schilddrüsenhormon- und Se-Status untersucht. Da es bisher keinerlei weitere Studienergebnisse zu dieser Fragestellung oder Referenzwerte für den Se-Status postmenopausaler Frauen gibt, sind weitere Studien nötig, um unsere Aussagen über den Zusammenhang zwischen Se-Status und Alter innerhalb dieser Gruppe zu überprüfen. Die von uns gefundenen sinkenden Se-Spiegel im Blut könnten durch mehrere Faktoren zustande gekommen sein. Zum einen könnten veränderte Essgewohnheiten (z. B. weniger Fleisch und/oder Meeresfrüchte im Alter) ein Grund für eine geringere Se-Aufnahme sein, die sich nicht sofort in einer Abnahme der SePP-Konzentration niederschlägt. Eine veränderte Nahrungsaufnahme in den letzten Dekaden könnte auch einen Einfluss auf den altersabhängigen Trend des Se-Status in den Probandinnen haben, da die Nahrungsmittel heutzutage zunehmend global gehandelt und aus aller Welt bezogen werden, so dass ihr Se-Gehalt abhängig vom Herkunftsland mit den Ernährungsmoden und -mustern stark schwanken kann (Combs *et al.* 2011). Wahrscheinlicher scheint aber eine veränderte Se-Transportkapazität im Alter für den beobachteten Trend. Die Expression von SePP resultiert normalerweise in einem 357 AS langen Glykoprotein, das zehn Sec-Reste enthält. Daneben kommt es aber auch zur Expression verkürzter SePP-Varianten, bei denen ein Translationsstopp nach dem zweiten, dritten oder siebten Sec-Rest erfolgen kann (Ma *et al.* 2002). Dadurch ist insgesamt weniger Se im SePP enthalten, die gemessene SePP-Konzentration bleibt jedoch recht konstant, da der von uns verwendete Assay die Länge und damit volle Se-Beladung des SePP nicht zu diskriminieren vermag (Hollenbach *et al.* 2008).

In den hier dargestellten Ergebnissen sind der Serum Se- und auch der Serum SePP-Spiegel negativ mit freien Schilddrüsenhormonen und positiv mit dem T4/T3-Ratio korreliert. Obwohl der Zusammenhang zwischen Se-Status und Schilddrüsenstatus in vielen Studien untersucht wurde, konnte bisher kein konsistenter Effekt von Se auf den Schilddrüsenstatus gefunden werden (Hess 2010). Angstwurm *et al.* zeigten 2004, dass die Se-Gabe selbst bei Se-unterversorgten Sepsispatienten keinen signifikanten Einfluss auf die Schilddrüsenhormone hatte (Angstwurm *et al.* 2004). Jedoch wurde eine negative Korrelation von Se-Status und freien Schilddrüsenhormonen ebenfalls von Dabbaghmanesh *et al.* bei iranischen Kindern beschrieben (Dabbaghmanesh *et al.* 2007). Der potentielle Zusammenhang von Se-Status und Schilddrüsenhormonen kann insofern noch nicht abschließend beurteilt werden, da zu wenig entsprechende Studien und Daten vorliegen, und zu viele Parameter wie Alter, basaler Se-Status, Geschlecht und Gesundheitsstatus diese Interaktion entscheidend beeinflussen können. Hier gilt es weitere entsprechende

Diskussion

Studien abzuwarten, und eine genauere Differenzierung der Probandengruppen vorzunehmen.

Der Se-Status war aber signifikant in den von uns untersuchten Frauen positiv mit der Knochenmineraldichte (BMD) und negativ mit dem Knochenumsatz (*bone turnover*) korreliert. Diese Zusammenhänge sind neu und waren unerwartet.

Im Versuchstier erzielte Moreno-Reyes in seinem Rattenmodell ähnliche Ergebnisse (Moreno-Reyes *et al.* 2001).

Bisher gibt es nur fünf kleinere Humanstudien, die sich unter anderem mit dem Einfluss des Se-Status auf den BMD befassen. Alle Studien weisen in Bezug auf die Ausschlusskriterien und Charakterisierung ihrer Probandinnen schwerwiegende Limitationen auf. So werden Probandinnen mit pathologisch veränderter Schilddrüsenfunktion und/oder nur unzureichend oder gar unbekanntem Schilddrüsenstatus nicht ausgeschlossen. Auch ist die Anzahl der untersuchten Probandinnen nicht durch biostatistische Vorüberlegungen berechnet und durchgehend recht klein.

In einer 2012 in Spanien veröffentlichten Studie mit 98 postmenopausalen spanischen Frauen konnte eine positive Korrelation zwischen BMD und der nahrungsbedingten Se- und Vit C-Aufnahme festgestellt werden (Rivas *et al.* 2012). Dagegen war in einer chinesischen Studie mit 281 postmenopausalen Se-defizienten Probandinnen kein Zusammenhang zwischen Se-Status und BMD in der Kontroll- oder Osteoporosegruppe festzustellen (Liu *et al.* 2009). Auch die Untersuchung von 107 türkischen postmenopausalen Frauen, die ebenfalls einen niedrigen Se-Spiegel aufwiesen, ergab keine signifikanten Korrelationen zwischen Se-Status und BMD in den untersuchten Subgruppen (Arikan *et al.* 2011).

Odabasi *et al.* stellten in 77 postmenopausalen Se-defizienten Frauen mit Osteoporose einen negativen Zusammenhang zwischen Se-Status und BMD im Vergleich zur Kontrollgruppe fest (Odabasi *et al.* 2008). Auch eine weitere spanische Gruppe stellte in den von ihnen analysierten 335 postmenopausalen Frauen einen negativen Zusammenhang zwischen Knochenstatus und Se-Status fest. Dies galt jedoch nur für Frauen mit einer täglichen Ca-Aufnahme von < 800 mg/d. (Pedrera-Zamorano *et al.* 2012).

Bis zum jetzigen Zeitpunkt gab es keinerlei Studien, die den Zusammenhang von Se-Status und Knochenumsatz untersuchen. Die hier präsentierten Ergebnisse weisen somit erstmals auf eine Korrelation von geringem Se- bzw. SePP-Spiegel und einem erhöhten Knochenumsatz bzw. verringertem BMD in gesunden postmenopausalen Frauen hin.

Der Zusammenhang zwischen höherem Se-Status und höherer Knochendichte macht eine erhöhte Knochenfrakturwahrscheinlichkeit bei Se-Mangel wahrscheinlich. Dies konnte in den von uns untersuchten Frauen jedoch nicht bestätigt werden, es gab keinen Zusammenhang zwischen Frakturrisiko und Se-Status. Da die von uns untersuchten Frauen verglichen mit ausreichend Se-versorgten amerikanischen Frauen nur einen leichten Se-Mangel aufwiesen

(Rayman 2008) und insgesamt nur sehr wenige Brüche im relativ kurzen Beobachtungszeitraum auftraten, lässt unsere Studie allerdings keine endgültige Aussage zu. Eine Studie die Se-defiziente Frauen über einen längeren Zeitraum mit insgesamt mehr Knochenbrüchen hin analysiert, könnte zu einem eindeutigeren Ergebnis kommen. Ebenso kann gehofft werden, dass eine Weiterverfolgung der von uns in OPUS eingeschlossenen Probandinnen zu einem späteren Zeitpunkt hier anhand der höheren Ereignisanzahl Knochenbruch eine statistisch besser gesicherte Aussage erlauben wird.

Bisher gibt es wenige Studien, die sich mit dem Mechanismus des Zusammenhangs zwischen Se-Status und Knochenmetabolismus und BMD beschäftigen. Es ist bekannt das Se einen Einfluss auf die Expression pro-inflammatorischer Zytokine hat, die wiederum eine große Rolle für Entstehung und Verlauf von Osteoporose haben (Manolagas 1998). Ein guter Se-Status wirkt anti-inflammatorisch, indem unter anderem die Expression von IL-6 und anderen Zytokine inhibiert wird (Duntas 2009; Stoedter *et al.* 2010). Somit könnte molekular die Se-abhängige Expression und Sezernierung pro-inflammatorischer Zytokine aus den Immunzellen zum beobachteten Zusammenhang von Se-Status und Knochenstoffwechsel beitragen. Überdies entstehen während des Knochenabbaus durch Osteoklasten lokal verstärkt reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Diese können Osteoblasten und andere Knochenzellen schädigen, die extrazelluläre Matrix angreifen und somit einen gestörten Knochenstoffwechsel verursachen, es sei denn sie werden durch antioxidative Enzyme entsorgt (Manolagas 1998). GPx und TrxR können den physiologisch geregelten und damit schadensbegrenzenden Abbau von ROS katalysieren und stellen somit eine weitere Verbindung zwischen Se-Status und Knochenhomöostase dar (Weeks *et al.* 2012). Auch die Differentiation zu reifen Osteoklasten wird durch ROS vermittelt (Nakanishi *et al.* 2013) und kann dementsprechend von GPx und TrxR kontrolliert und reguliert werden.

Neuere Studien zu Osteoporose weisen vermehrt auf den Einfluss von ROS auf die Entstehung von Osteoporose hin (Manolagas 2010). In einem Alzheimer-Mausmodell konnten Xia *et al.* durch Gabe des Antioxidans N-Acetylcysteine die dort normalerweise auftretende Osteoporose verhindern (Xia *et al.* 2013). Die Expression von Selenproteinen in Osteoblasten und Osteoklasten deutet darauf hin, dass der Se-Status und die ausreichende Expression funktionaler Selenoproteine einen am Ende limitierenden Faktor für die erfolgreiche Beseitigung überschüssiger ROS darstellen (Jakob *et al.* 2002; Moon *et al.* 2012).

Da die in dieser Arbeit analysierten Blutproben ursprünglich aus der OPUS-Studie stammten (Gluer *et al.* 2004), die ursprünglich nicht für die Frage nach der Bedeutung des Se-Status konzipiert war, ergaben sich für unsere Fragestellung einige Limitationen. Wir bestimmten sowohl die Serum Se- als auch die Serum-SePP-Konzentrationen. Dies erlaubt laut Xia *et al.* und Hoeflich *et al.* eine solide Aussage bezüglich des Se-Status der Probandinnen (Hoeflich

et al. 2010; Xia *et al.* 2010). Um eine spezifische Aussage über die antioxidative Kapazität in den Blutproben treffen zu können, wäre zusätzlich eine Messung der GPx1 und/oder der GPx3 von Vorteil gewesen (Combs *et al.* 2011). Da uns nur Serumproben vorlagen, war eine Bestimmung der zellulären GPx1-Aktivität nicht möglich. Auch die plasmatische GPx3-Aktivität konnte nicht mehr bestimmt werden, da die Proben in den vorangegangenen Studien wiederholt eingefroren und aufgetaut wurden (Murphy *et al.* 2010) und dieses Prozedere eine genaue Aktivitätsbestimmung unmöglich macht (Murias *et al.* 2005).

Da ursprünglich die Bedeutung von Ultraschallmessungen für die Osteoporosediagnose untersucht werden sollte, liegen keine Angaben zu den Ernährungsgewohnheiten der Probandinnen vor. Der Se-Status hängt jedoch stark mit der zugeführten Nahrung zusammen, wenn auch nicht immer direkt von der Nahrung auf den Se-Status geschlossen werden kann (Combs *et al.* 2011). Trotz allem könnte der beobachtete Zusammenhang zwischen Se-Status und Knochenmetabolismus auch auf einen sich ebenfalls im Se-Status niederschlagenden aber im Prinzip vom Knochenstoffwechsel unabhängigen Nahrungseffekt zurück zu führen sein. Wie bereits von Murphy diskutiert, sollten tageszeitabhängige Nahrungseffekte und Hormonschwankungen weitgehend durch die zur selben Tageszeit stattfindenden Blutentnahmen vermieden werden. Allerdings fand die Blutabnahme nicht im nüchternen Zustand statt, so dass auch der Vergleich mit anderen Studien zu Knochenparametern erschwert ist, da in diesen im nüchternen Zustand gewonnene Blutproben verwendet wurden (Murphy *et al.* 2010). Darüber hinaus sind keine Informationen zu Se-Supplementation der Probandinnen vorhanden. Um daraus folgende störende Effekte aus zu schließen, wurden vorsichtshalber alle sieben Probandinnen mit mehr als 250 µg/l Serum-Se ausgeschlossen, da solche Se-Werte im Serum durch eine normale Ernährung in Europa nicht erzielt werden können.

Bei den von uns untersuchten Frauen handelte es sich ausnahmslos um postmenopausale Frauen. Weitere Studien mit anderen Einschlusskriterien müssen zeigen, ob die hier präsentierten Ergebnisse auch auf andere Subpopulationen, i.e., Männer, Kinder und Jugendliche oder jüngere Frauen, zutreffen. Dennoch stellen gerade postmenopausale Frauen die größte Risikogruppe für einen Mineralisierungsmangel und daraus folgende Frakturneigung da, so dass derzeit mit den beteiligten Klinikern eine gezielte Supplementation zur Verringerung des im Se-Mangel erhöhten Knochenumbaus diskutiert wird, um so eine bessere Stabilisierung des Knochens und Verlangsamung des altersbedingten Knochenabbaus zu erreichen.

5.4 Fazit und Ausblick

Mit den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen zum Zusammenhang zwischen Se-Status und Knochenparametern im Zellkultur- und Mausmodell und bei postmenopausalen Frauen lassen sich erste Rückschlüsse auf die Bedeutung von Se und Selenoproteinen für den Knochen und Mineralmetabolismus schließen.

Die vorgestellten Arbeiten zur *SepP*-KO Maus untersuchen erstmals den Einfluss des *SepP*-Genotyps auf die Knochenentwicklung. Dabei zeigte sich *in vitro* und *in vivo* ein großer Einfluss des *SepP*-Genotyps auf die Knochenentwicklung, Knochenwachstum und die Regulation der VitD-Biosynthese. In weiterführenden *in vitro*-Untersuchungen müssen die Effekte des Genotyps und einer zusätzlichen Se-Stimulation im murinen Micromass-Modell mechanistisch untersucht werden. Eine Analyse des Einflusses spezifischer Selenoproteine, wie Dejodasen, TrxR und GPx könnte durch siRNA-Knockdowns der entsprechenden mRNAs gelingen. *In vivo* könnte durch Haltung der *SepP*-Mäuse auf Se-armen bzw. Se-reichem Futter der Einfluss einer zusätzlichen Se-Supplementation untersucht werden. Durch Kreuzung der kürzlich generierten, für das humane *SePP* transgene Mauslinie tg-h*SePP*-Maus (Renko *et al.* 2008), mit der *SepP*-KO-Maus, könnte die Rolle lokal exprimierten *SepPs* genauer bestimmt werden.

Se könnte an zwei Punkten die Knochenbildung regulieren. Im embryonalen Stadium regt es die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Chondrozyten an. Abb. 5.1

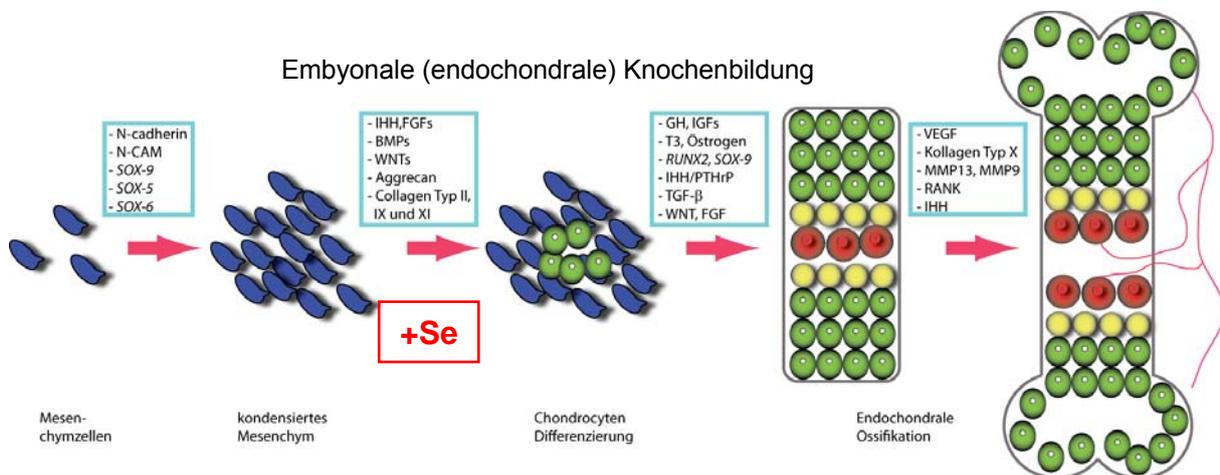


Abb. 5.1: Möglicher Wirkungsort bzw. Wirkungszeitpunkt von Se während der endochondralen Knochenbildung. Se bewirkt innerhalb eines schmalen Zeitfensters die verstärkte Differenzierung mesenchymaler Chondroprogenitorzellen hin zu Chondrozyten. Dieses Zeitfenster ist in der Maus auf das Embryonalstadium E10,5 beschränkt.

Diskussion

Im adulten Knochen könnte Se in Form antioxidativ wirkender Selenoproteine wie Gpx oder TrxR den Knochenabbau minimieren und somit zur Aufrechterhaltung der Knochenmasse beitragen.

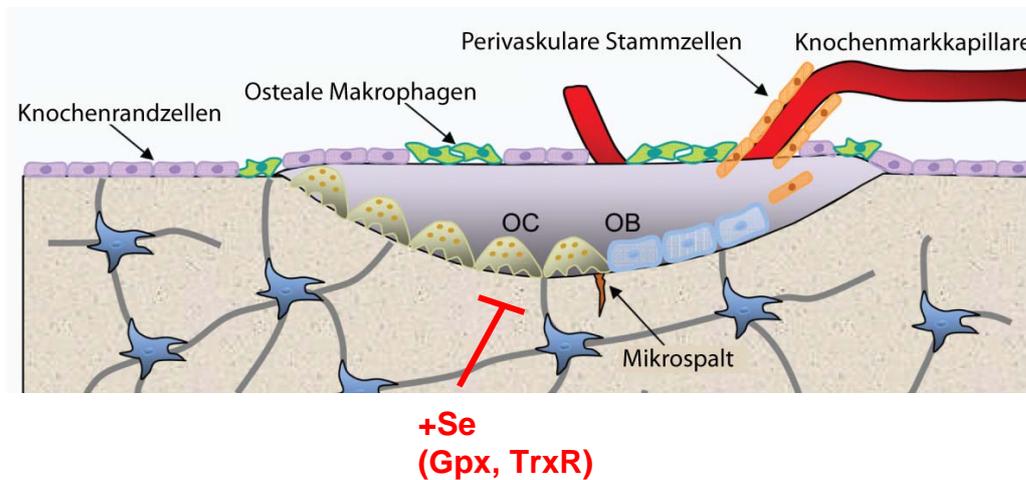


Abb. 5.2: Möglicher Wirkungsort von Se während des adulten Knochenbaus. Se könnte in Form von Gpx und TrxR den Knochenabbau reduzieren, indem es die Differenzierung von Osteoclasten (OC) und deren Aktivität inhibiert.

In den Probandinnen der OPUS-Studie ließ sich ein positiver Zusammenhang zwischen Se-Status und BMD und ein inverser Zusammenhang zwischen Se-Status und Knochenumsatz feststellen. Diese Ergebnisse waren unabhängig vom Schilddrüsenstatus. Der zuvor in der OPUS Studie beobachtete Zusammenhang zwischen Schilddrüsenhormonstatus, BMD und Knochenbruchrisiko (Murphy *et al.* 2010) ist unabhängig vom Se-Status und somit nicht in erster Linie auf die Se-Abhängigkeit der Dejodasen zurückzuführen.

Nachfolgende Studien könnten den therapeutischen Einfluss einer Se-Supplementation untersuchen. Dafür wäre eine kontrollierte randomisierte longitudinale Studie zu Se-Supplementation in postmenopausalen Frauen mit einer Bestimmung des Knochenumsatzes sinnvoll. Es ist, basierend auf den z. T. widersprüchlichen Ergebnissen einiger Krebspräventionsstudien mit Se, zu erwarten, dass auch hier nur die Subgruppen mit initialem Se-Defizit von den positiven Auswirkungen einer Se-Supplementation profitieren. So sollten zukünftige Studien immer den Ausgangs-Se-Status, Alter, Geschlecht und evtl. auch die als funktional beschriebenen SNPs von Selenoproteingenen berücksichtigen und während einer solchen Studie bestimmen (Nicastro *et al.* 2013).

Im Gegenzug könnte eine längerfristige Se – Supplementation in Individuen mit einem bereits relativ erhöhten Se-Status evtl. auch negative Nebenwirkungen bedingen, wie z.B. ein Erhöhtes Risiko für Typ 2 Diabetes mellitus (Rayman 2012).

Einige Krankheitsbilder sind bereits hinsichtlich ihrer Geschlechtsspezifität untersucht worden. So sind die Risiken für Autoimmunerkrankungen wie der Systemische Lupus Erythematoses, die Schilddrüsenerkrankungen Morbus Basedow oder Hashimoto

Thyreoiditis oder Erkrankungen des Rheumatischen Formenkreises für Frauen wesentlich höher als für Männer (Whitacre 2001). Für Knochenerkrankungen ist bekannt, dass eine unzureichende Mineralisierung des Knochens im Alter und damit das Osteoporoserisiko unter Anderem durch niedrige Östrogenkonzentration, wie sie in postmenopausalen Frauen vorliegen, hervorgerufen werden kann. Eine Studie von Zhou et al. konnte diesbezüglich zeigen, dass in Ratten Östrogene den Se-Status über eine Regulation der SePP-Expression steuern (Zhou *et al.* 2012). Die Untersuchung einer männlichen Studienkohorte wäre deshalb von besonderem Wert, da diese weitere Erkenntnisse zu einer östrogenunabhängigen Wirkung des Se-Status bzw. einer gezielten Se-Supplementation auf den Knochen beitragen könnte.

Zusammenfassend sprechen aber die in dieser Arbeit vorgestellten Daten für eine direkte Bedeutung eines ausreichenden Se-Status für die maximale Expression von Selenoproteinen als wichtigen Parameter der Knochenentwicklung, Knochenhomöostase und Knochenmineralisierung und tragen damit zu der Erkenntnis der Essentialität von Selen im Säugerorganismus bei. Jedoch werden erst gezielte prospektive und gut kontrollierte Supplementationsstudien von unzureichend mit Se versorgten Probanden hier die letztliche Klärung der Möglichkeit einer effektiven therapeutischen Intervention mit diesem Spurenelement klären können. Diese Studien bleiben vorerst abzuwarten, ehe allgemeine Empfehlungen getätigt werden können. Dennoch lässt sich bereits jetzt festhalten, dass auch aus Sicht der Osteologie ein starkes Se-Defizit vermieden werden sollte.

6 Zusammenfassung

Selen (Se) rückt als essentielles Spurenelement und Nahrungssupplement zunehmend in den Fokus von Grundlagenforschung und klinischen Studien. Einige tierexperimentelle und humane Studien deuten auf einen positiven Einfluss einer Se-Supplementation auf degenerative Knochenerkrankungen wie die Kashin-Beck-Krankheit oder Osteoarthrose. Se könnte zudem eine wichtige Rolle in der embryonalen Knochenentwicklung einnehmen. In dieser Arbeit wurde deshalb die Hypothese getestet, dass eine schlechte Versorgung mit Se über die Nahrung und/oder eine nachteilige genetische Disposition sich in vitro oder im Versuchstier nachteilig auf Knochenentwicklung und Wachstum auswirkt. Als Tiermodell und für Versuche mit primären Zellen wurde die Selenoprotein P knockout Maus (*SepP*-KO-Maus) gewählt, da diese Tiere ein exzellentes Modell für einen genetisch-bedingten Selenmangel darstellen. In einem Translationsansatz wurde zusätzlich geprüft, ausgehend von gut charakterisierten Serumproben, ob dieser Zusammenhang sich auch im gesunden aber unzureichend versorgten Menschen abbildet.

Es wurden embryonale Zellen aus den Extremitätenknospen von *SepP*-KO und *SepP*-Wildtyp (WT) Tieren gewonnen, mit Natriumselenit stimuliert und ihre Differenzierung zu Knorpelzellen analysiert. Der *SepP*-Genotyp erwies sich als wichtiger Faktor für die Chondrogenese. *SepP*-KO-Zellen erreichten nicht annähernd den Differenzierungsgrad der WT-Zellen. Die Gabe von Natriumselenit wirkte sich in beiden Genotypen positiv auf die Knorpelbildung aus. Es konnte ein enges Zeitfenster für die Wirksamkeit einer Se-Stimulation beobachtet werden. Zellen im Embryonalstadium E11,5 reagierten stark auf die Se-Gabe, Zellen im Embryonalstadium E12,5 reagierten kaum noch.

Im *SepP*-KO Mausmodell wurde der Einfluss des *SepP*-Genotyps auf das juvenile Knochenwachstum und den adulten Knochen untersucht. Es zeigte sich ein sexspezifischer Unterschied bei einem genetisch bedingten Se-Versorgungsmangel. *SepP*-KO Männchen waren stärker betroffen als Weibchen. Sie hatten eine veränderte Knochenarchitektur (signifikant niedrigeres Knochenvolumen) und eine beeinträchtigte Vitamin D-Biosynthese (geringe Expression der entsprechenden Enzyme).

In Kooperation mit Prof. G. Williams, Imperial College London, konnten wir die gut charakterisierten Serumproben der OPUS-Studie hinsichtlich ihres Se-Status untersuchen und somit Daten für den Zusammenhang zwischen Se-Status und Knochenparametern im Menschen gewinnen. Es zeigten sich ein positiver Zusammenhang zwischen Se-Status und Knochenmineraldichte (BMD) und ein inverser Zusammenhang zwischen Se-Status und Knochenumsatz in euthyreoten postmenopausalen Frauen.

Zusammenfassung

Zusammengenommen unterstreichen diese Ergebnisse, dass der Selenstatus und die Selenoproteine eine wichtige und direkte Bedeutung für Knochenentwicklung, Knochenhomöostase und Knochenmineralisierung haben. Gerade die Analyse der Humanproben belegt die Relevanz für unzureichend versorgte Europäerinnen. In diesem Zusammenhang könnten beschriebene Polymorphismen im Gen des humanen Selenoprotein P von krankheitsrelevanter Bedeutung sein. Weitere Studien sind nun nötig und in der Planungsphase, um die Bedeutung des genotyps und die Effektivität einer gezielten Intervention durch ein Selensupplement zur Verbesserung der Knochenstabilität und Vermeidung des beschleunigtem Knochenabbaus im Alter zu überprüfen.

Summary

The trace element and dietary supplement Selenium (Se) is increasingly recognized for its important biological role by clinical studies and basic research. Several animal experiments and human studies indicate positive effects of Se supplementation on degenerative bone diseases like e.g. Kashin-Beck osteoarthropathy and osteoarthritis. Se is moreover described to elicit an important role during bone development. This PhD thesis was testing the hypothesis that an insufficient Se supply and/or an unfavourable selenoprotein genotype negatively affect osteogenesis and bone growth. To this end, selenoprotein P knockout (*SepP-KO*) mice and cells derived thereof were chosen as an excellent model of genetically-impaired selenoprotein biosynthesis. In addition, a number of well-characterized serum samples from healthy but insufficiently supplied subjects were analysed in an attempt to translate the experimental data into clinical science testing their relevance for humans.

Micromass cell culture experiments were performed with mesenchymal limb bud cells from *SepP-KO* and *SepP-WT* mice. Sodium selenite efficiently induced chondrogenic differentiation; notably, this effect was strongly dependent on the *SepP* genotype and strongly delayed and reduced in cells from *SepP-KO* as compared to cells from *SepP-WT* mice. Selenite was effective during a narrow time frame of development eliciting a major effect at embryonic day E11.5 and only minor effects at E12.5.

Next, male and female *SepP-KO* mice were compared with respect to osteogenesis and quality of bone in the adults. Male *SepP-KO* mice displayed strongly altered bone microarchitecture with significantly reduced bone volume and a considerable dys-regulation of key enzymes needed for vitamin D biosynthesis as compared to female *SepP-KO* littermates. *SepP* genotype is thus eliciting a sexual dimorphic effect on bone differentiation, development and growth in mice.

In cooperation with Prof. G. Williams, Imperial College London, the Se status of a large cohort of healthy euthyroid postmenopausal women were determined and associated with markers of bone quality, turnover and other health-relevant parameters. A positive correlation of Se status and bone mineral density (BMD) along with an inverse relationship between Se status and markers of bone turnover was observed in this group of insufficiently supplied female adults.

These results support the notion that Se and selenoproteins play an important and direct role for bone development, homeostasis and mineralization. The serum data indicate that the Se status is of importance for bone quality in poorly supplied European women. The well-

Zusammenfassung

described functional polymorphisms in the human gene encoding SePP are thus likely of clinical relevance for bone turnover and mineralization. Additional studies are needed and the respective plans are under way in order to test the osteological importance of SePP genotype and whether an intervention by Se supplementation is able to improve bone quality decelerating degradation processes in the elderly.

8 Literatur

- Abdulla, M., Behbehani, A., *et al.* (1989). "Dietary intake and bioavailability of trace elements." Biol Trace Elem Res **21**: 173-8.
- Alabi, N. S., Beilstein, M. A., *et al.* (2000). "Chemical forms of selenium present in rat and ram spermatozoa." Biol Trace Elem Res **76**(2): 161-73.
- Albrandt, K., Brady, E. M., *et al.* (1995). "Molecular cloning and functional expression of a third isoform of the human calcitonin receptor and partial characterization of the calcitonin receptor gene." Endocrinology **136**(12): 5377-84.
- Alini, M., Kofsky, Y., *et al.* (1996). "In serum-free culture thyroid hormones can induce full expression of chondrocyte hypertrophy leading to matrix calcification." J Bone Miner Res **11**(1): 105-13.
- Allain, T. J., Chambers, T. J., *et al.* (1992). "Tri-iodothyronine stimulates rat osteoclastic bone resorption by an indirect effect." J Endocrinol **133**(3): 327-31.
- Allen, J. R., Humphries, I. R., *et al.* (1994). "Decreased bone mineral density in children with phenylketonuria." Am J Clin Nutr **59**(2): 419-22.
- Allmang, C. and Krol, A. (2006). "Selenoprotein synthesis: UGA does not end the story." Biochimie **88**(11): 1561-71.
- Alzahrani, A. S., Zou, M., *et al.* (2010). "A novel G102E mutation of CYP27B1 in a large family with vitamin D-dependent rickets type 1." J Clin Endocrinol Metab **95**(9): 4176-83.
- Amizuka, N., Hasegawa, T., *et al.* (2012). "Histology of epiphyseal cartilage calcification and endochondral ossification." Front Biosci (Elite Ed) **4**: 2085-100.
- Angstwurm, M. W., Schopohl, J., *et al.* (2004). "Selenium substitution has no direct effect on thyroid hormone metabolism in critically ill patients." Eur J Endocrinol **151**(1): 47-54.
- Arikan, D. C., Coskun, A., *et al.* (2011). "Plasma selenium, zinc, copper and lipid levels in postmenopausal Turkish women and their relation with osteoporosis." Biol Trace Elem Res **144**(1-3): 407-17.
- Atkins, G. J., Anderson, P. H., *et al.* (2007). "Metabolism of vitamin D3 in human osteoblasts: evidence for autocrine and paracrine activities of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3." Bone **40**(6): 1517-28.
- Azevedo, M. F., Barra, G. B., *et al.* (2010). "Selenoprotein-related disease in a young girl caused by nonsense mutations in the SBP2 gene." J Clin Endocrinol Metab **95**(8): 4066-71.
- Ballock, R. T. and O'Keefe, R. J. (2003). "The biology of the growth plate." J Bone Joint Surg Am **85-A**(4): 715-26.
- Barceloux, D. G. (1999). "Selenium." J Toxicol Clin Toxicol **37**(2): 145-72.

Literatur

- Bassett, J. H., O'Shea, P. J., *et al.* (2007). "Thyroid hormone excess rather than thyrotropin deficiency induces osteoporosis in hyperthyroidism." Mol Endocrinol **21**(5): 1095-107.
- Bassett, J. H., Williams, A. J., *et al.* (2008). "A lack of thyroid hormones rather than excess thyrotropin causes abnormal skeletal development in hypothyroidism." Mol Endocrinol **22**(2): 501-12.
- Beck, M. A. (2001). "Antioxidants and viral infections: host immune response and viral pathogenicity." J Am Coll Nutr **20**(5 Suppl): 384S-388S; discussion 396S-397S.
- Beck, M. A., Williams-Toone, D., *et al.* (2003). "Coxsackievirus B3-resistant mice become susceptible in Se/vitamin E deficiency." Free Radic Biol Med **34**(10): 1263-70.
- Benes, B., Spevackova, V., *et al.* (2005). "Effects of age, BMI, smoking and contraception on levels of Cu, Se and Zn in the blood of the population in the Czech Republic." Cent Eur J Public Health **13**(4): 202-7.
- Berry, M. J., Banu, L., *et al.* (1993). "Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine insertion at UGA codons." Embo J **12**(8): 3315-22.
- Bieglmayer, C., Prager, G., *et al.* (2002). "Kinetic analyses of parathyroid hormone clearance as measured by three rapid immunoassays during parathyroidectomy." Clin Chem **48**(10): 1731-8.
- Blumer, M. J., Longato, S., *et al.* (2008). "Structure, formation and role of cartilage canals in the developing bone." Ann Anat **190**(4): 305-15.
- Boersma, B., Otten, B. J., *et al.* (1996). "Catch-up growth after prolonged hypothyroidism." Eur J Pediatr **155**(5): 362-7.
- Boyle, W. J., Simonet, W. S., *et al.* (2003). "Osteoclast differentiation and activation." Nature **423**(6937): 337-42.
- Brenza, H. L. and DeLuca, H. F. (2000). "Regulation of 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene expression by parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D3." Arch Biochem Biophys **381**(1): 143-52.
- Burdan, F., Szumilo, J., *et al.* (2009). "Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate." Folia Histochem Cytobiol **47**(1): 5-16.
- Burk, R. F. and Hill, K. E. (1994). "Selenoprotein P. A selenium-rich extracellular glycoprotein." J Nutr **124**(10): 1891-7.
- Burk, R. F., Hill, K. E., *et al.* (2001). "Plasma selenium in specific and non-specific forms." Biofactors **14**(1-4): 107-14.
- Burk, R. F., Hill, K. E., *et al.* (1991). "Response of rat selenoprotein P to selenium administration and fate of its selenium." Am J Physiol **261**(1 Pt 1): E26-30.
- Cao, J., Li, S., *et al.* (2008). "Articular cartilage metabolism in patients with Kashin-Beck Disease: an endemic osteoarthropathy in China." Osteoarthritis Cartilage **16**(6): 680-

8.

- Cao, J. J., Gregoire, B. R., *et al.* (2012). "Selenium deficiency decreases antioxidative capacity and is detrimental to bone microarchitecture in mice." J Nutr **142**(8): 1526-31.
- Carlson, B. A., Novoselov, S. V., *et al.* (2004). "Specific excision of the selenocysteine tRNA[Ser]Sec (Trsp) gene in mouse liver demonstrates an essential role of selenoproteins in liver function." J Biol Chem **279**(9): 8011-7.
- Carney, S. and Thompson, L. (1981). "Acute effect of calcitonin on rat renal electrolyte transport." Am J Physiol **240**(1): F12-6.
- Chambers, T. J. and Fuller, K. (1985). "Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact." J Cell Sci **76**: 155-65.
- Cheng, J. B., Motola, D. L., *et al.* (2003). "De-orphanization of cytochrome P450 2R1: a microsomal vitamin D 25-hydroxylase." J Biol Chem **278**(39): 38084-93.
- Cheng, S. Y., Leonard, J. L., *et al.* (2010). "Molecular aspects of thyroid hormone actions." Endocr Rev **31**(2): 139-70.
- Clark, L. C., Combs, G. F., Jr., *et al.* (1996). "Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group." Jama **276**(24): 1957-63.
- Combs, G. F., Jr., Jackson, M. I., *et al.* (2012). "Differential responses to selenomethionine supplementation by sex and genotype in healthy adults." Br J Nutr **107**(10): 1514-25.
- Combs, G. F., Jr., Watts, J. C., *et al.* (2011). "Determinants of selenium status in healthy adults." Nutr J **10**: 75.
- Cooper, C. W., Hirsch, P. F., *et al.* (1970). "Importance of endogenous thyrocalcitonin for protection against hypercalcemia in the rat." Endocrinology **86**(2): 406-15.
- Copp, D. H., Cameron, E. C., *et al.* (1962). "Evidence for calcitonin--a new hormone from the parathyroid that lowers blood calcium." Endocrinology **70**: 638-49.
- Dabbaghmanesh, M. H., Sadegholvaad, A., *et al.* (2007). "Low serum selenium concentration as a possible factor for persistent goiter in Iranian school children." Biofactors **29**(2-3): 77-82.
- Daniels, K., Reiter, R., *et al.* (1996). "Micromass cultures of limb and other mesenchyme." Methods Cell Biol **51**: 237-47.
- Daniels, L. A. (1996). "Selenium metabolism and bioavailability." Biol Trace Elem Res **54**(3): 185-99.
- Datta, H. K., Ng, W. F., *et al.* (2008). "The cell biology of bone metabolism." J Clin Pathol **61**(5): 577-87.
- de Groot, T., Lee, K., *et al.* (2009). "Parathyroid hormone activates TRPV5 via PKA-dependent phosphorylation." J Am Soc Nephrol **20**(8): 1693-704.

Literatur

- DeLise, A. M., Stringa, E., *et al.* (2000). "Embryonic limb mesenchyme micromass culture as an in vitro model for chondrogenesis and cartilage maturation." Methods Mol Biol **137**: 359-75.
- Dewing, A. S., Rueli, R. H., *et al.* (2012). "Expression and regulation of mouse selenoprotein P transcript variants differing in non-coding RNA." RNA Biol **9**(11): 1361-9.
- DGE Die Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr - Selen.
- Downey, C. M., Horton, C. R., *et al.* (2009). "Osteo-chondroprogenitor-specific deletion of the selenocysteine tRNA gene, *Trsp*, leads to chondronecrosis and abnormal skeletal development: a putative model for Kashin-Beck disease." PLoS Genet **5**(8): e1000616.
- Dreher, I., Schutze, N., *et al.* (1998). "Selenoproteins are expressed in fetal human osteoblast-like cells." Biochem Biophys Res Commun **245**(1): 101-7.
- Dumitrescu, A. M., Liao, X. H., *et al.* (2005). "Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism." Nat Genet **37**(11): 1247-52.
- Duntas, L. H. (2009). "Selenium and inflammation: underlying anti-inflammatory mechanisms." Horm Metab Res **41**(6): 443-7.
- Ebert, R., Ulmer, M., *et al.* (2006). "Selenium supplementation restores the antioxidative capacity and prevents cell damage in bone marrow stromal cells in vitro." Stem Cells **24**(5): 1226-35.
- Eriksen, E. F., Mosekilde, L., *et al.* (1986). "Kinetics of trabecular bone resorption and formation in hypothyroidism: evidence for a positive balance per remodeling cycle." Bone **7**(2): 101-8.
- Everts, V., Delaisse, J. M., *et al.* (2002). "The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation." J Bone Miner Res **17**(1): 77-90.
- Fairweather-Tait, S. J., Bao, Y., *et al.* (2011). "Selenium in human health and disease." Antioxid Redox Signal **14**(7): 1337-83.
- Flohe, L., Gunzler, W. A., *et al.* (1973). "Glutathione peroxidase: a selenoenzyme." FEBS Lett **32**(1): 132-4.
- Foresta, C., Strapazon, G., *et al.* (2011). "Bone mineral density and testicular failure: evidence for a role of vitamin D 25-hydroxylase in human testis." J Clin Endocrinol Metab **96**(4): E646-52.
- Forrest, C. R., O'Donovan, D. A., *et al.* (2002). "Efficacy of radioprotection in the prevention of radiation-induced craniofacial bone growth inhibition." Plast Reconstr Surg **109**(4): 1311-23; discussion 1324.
- Forster, I. C., Hernando, N., *et al.* (2006). "Proximal tubular handling of phosphate: A molecular perspective." Kidney Int **70**(9): 1548-59.
- Foster, L. H. and Sumar, S. (1997). "Selenium in health and disease: a review." Crit Rev

- Food Sci Nutr **37**(3): 211-28.
- Frenkel, B., Hong, A., *et al.* (2010). "Regulation of adult bone turnover by sex steroids." J Cell Physiol **224**(2): 305-10.
- Frolik, C. A., Black, E. C., *et al.* (2003). "Anabolic and catabolic bone effects of human parathyroid hormone (1-34) are predicted by duration of hormone exposure." Bone **33**(3): 372-9.
- Fudge, N. J. and Kovacs, C. S. (2004). "Physiological studies in heterozygous calcium sensing receptor (CaSR) gene-ablated mice confirm that the CaSR regulates calcitonin release in vivo." BMC Physiol **4**: 5.
- Geibel, J. P. and Hebert, S. C. (2009). "The functions and roles of the extracellular Ca²⁺-sensing receptor along the gastrointestinal tract." Annu Rev Physiol **71**: 205-17.
- Gerber, I., ap Gwynn, I., *et al.* (2005). "Stimulatory effects of creatine on metabolic activity, differentiation and mineralization of primary osteoblast-like cells in monolayer and micromass cell cultures." Eur Cell Mater **10**: 8-22.
- Gladyshev, V. N. and Hatfield, D. L. (1999). "Selenocysteine-containing proteins in mammals." J Biomed Sci **6**(3): 151-60.
- Glatt, V., Canalis, E., *et al.* (2007). "Age-related changes in trabecular architecture differ in female and male C57BL/6J mice." J Bone Miner Res **22**(8): 1197-207.
- Gluer, C. C., Eastell, R., *et al.* (2004). "Association of five quantitative ultrasound devices and bone densitometry with osteoporotic vertebral fractures in a population-based sample: the OPUS Study." J Bone Miner Res **19**(5): 782-93.
- Goldring, M. B., Tsuchimochi, K., *et al.* (2006). "The control of chondrogenesis." J Cell Biochem **97**(1): 33-44.
- Gouveia, C. H., Christoffolete, M. A., *et al.* (2005). "Type 2 iodothyronine selenodeiodinase is expressed throughout the mouse skeleton and in the MC3T3-E1 mouse osteoblastic cell line during differentiation." Endocrinology **146**(1): 195-200.
- Gouveia, C. H., Schultz, J. J., *et al.* (2001). "Thyroid hormone stimulation of osteocalcin gene expression in ROS 17/2.8 cells is mediated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms." J Endocrinol **170**(3): 667-75.
- Guemouri, L., Artur, Y., *et al.* (1991). "Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood." Clin Chem **37**(11): 1932-7.
- Guo, P., Xu, J., *et al.* (1997). "[Inhibition of hydrogen peroxide production on chondrocytes induced by fulvic acid by ginger volatile oil]." Zhongguo Zhong Yao Za Zhi **22**(9): 559-61 inside back cover.
- H. H. Mitchell, T. S. H., ; F. R. Steggerda,; and H. W. Bean. (1945). "THE CHEMICAL COMPOSITION OF THE ADULT HUMAN BODY AND ITS BEARING ON THE BIOCHEMISTRY OF GROWTH." J. Biol. Chem. **158**: 625-637.

Literatur

- Ha, E. J. and Smith, A. M. (2003). "Plasma selenium and plasma and erythrocyte glutathione peroxidase activity increase with estrogen during the menstrual cycle." J Am Coll Nutr **22**(1): 43-51.
- Hadjidakis, D. J. and Androulakis, II (2006). "Bone remodeling." Ann N Y Acad Sci **1092**: 385-96.
- Handschel, J. G., Depprich, R. A., *et al.* (2007). "Prospects of micromass culture technology in tissue engineering." Head Face Med **3**: 4.
- Hatfield, D. L., Carlson, B. A., *et al.* (2006). "Selenocysteine incorporation machinery and the role of selenoproteins in development and health." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **81**: 97-142.
- Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N. (2002). "How selenium has altered our understanding of the genetic code." Mol Cell Biol **22**(11): 3565-76.
- Hatfield, J. T., Anderson, P. J., *et al.* (2013). "Retinol-binding protein 4 is expressed in chondrocytes of developing mouse long bones: implications for a local role in formation of the secondary ossification center." Histochem Cell Biol **139**(5): 727-34.
- Haubruge, E., Chasseur, C., *et al.* (2001). "The prevalence of mycotoxins in Kashin-Beck disease." Int Orthop **25**(3): 159-61.
- Hauge, E. M., Qvesel, D., *et al.* (2001). "Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers." J Bone Miner Res **16**(9): 1575-82.
- Hendy, G. N., Kronenberg, H. M., *et al.* (1981). "Nucleotide sequence of cloned cDNAs encoding human preproparathyroid hormone." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7365-9.
- Henry, H. L. and Norman, A. W. (1984). "Vitamin D: metabolism and biological actions." Annu Rev Nutr **4**: 493-520.
- Hess, S. Y. (2010). "The impact of common micronutrient deficiencies on iodine and thyroid metabolism: the evidence from human studies." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **24**(1): 117-32.
- Hill, K. E., Lloyd, R. S., *et al.* (1991). "The cDNA for rat selenoprotein P contains 10 TGA codons in the open reading frame." J Biol Chem **266**(16): 10050-3.
- Hill, K. E., Xia, Y., *et al.* (1996). "Selenoprotein P concentration in plasma is an index of selenium status in selenium-deficient and selenium-supplemented Chinese subjects." J Nutr **126**(1): 138-45.
- Hill, K. E., Zhou, J., *et al.* (2003). "Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse." J Biol Chem **278**(16): 13640-6.
- Hinsenkamp, M. (2001). "Kashin-Beck disease." Int Orthop **25**(3): 133.
- Hirsch, P. F., Gauthier, G. F., *et al.* (1963). "Thyroid Hypocalcemic Principle and Recurrent

- Laryngeal Nerve Injury as Factors Affecting the Response to Parathyroidectomy in Rats." Endocrinology **73**: 244-52.
- Hoefig, C. S., Renko, K., *et al.* "Comparison of different selenocompounds with respect to nutritional value vs. toxicity using liver cells in culture." J Nutr Biochem **22**(10): 945-55.
- Hoefig, C. S., Renko, K., *et al.* (2011). "Comparison of different selenocompounds with respect to nutritional value vs. toxicity using liver cells in culture." J Nutr Biochem **22**(10): 945-55.
- Hoeflich, J., Hollenbach, B., *et al.* (2010). "The choice of biomarkers determines the selenium status in young German vegans and vegetarians." Br J Nutr **104**(11): 1601-4.
- Hollenbach, B., Morgenthaler, N. G., *et al.* (2008). "New assay for the measurement of selenoprotein P as a sepsis biomarker from serum." J Trace Elem Med Biol **22**(1): 24-32.
- Hollis, B. W., Johnson, D., *et al.* (2011). "Vitamin D supplementation during pregnancy: double-blind, randomized clinical trial of safety and effectiveness." J Bone Miner Res **26**(10): 2341-57.
- Holtrop, M. E., Raisz, L. G., *et al.* (1974). "The effects of parathyroid hormone, colchicine, and calcitonin on the ultrastructure and the activity of osteoclasts in organ culture." J Cell Biol **60**(2): 346-55.
- Hsieh-Bonassera, N. D., Wu, I., *et al.* (2009). "Expansion and redifferentiation of chondrocytes from osteoarthritic cartilage: cells for human cartilage tissue engineering." Tissue Eng Part A **15**(11): 3513-23.
- Huang, D., Liang, C., *et al.* (2005). "[Study on chondrogenesis of rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells by centrifuge-tube culture in vitro]." Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi **19**(4): 168-9, 172.
- Huang, J. C., Sakata, T., *et al.* (2004). "PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG." J Bone Miner Res **19**(2): 235-44.
- Huebner, A. K., Keller, J., *et al.* (2008). "The role of calcitonin and alpha-calcitonin gene-related peptide in bone formation." Arch Biochem Biophys **473**(2): 210-7.
- Jacob, C., Giles, G. I., *et al.* (2003). "Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function." Angew Chem Int Ed Engl **42**(39): 4742-58.
- Jakob, F., Becker, K., *et al.* (2002). "Expression and regulation of thioredoxin reductases and other selenoproteins in bone." Methods Enzymol **347**: 168-79.
- Javid, M. K., Crozier, S. R., *et al.* (2006). "Maternal vitamin D status during pregnancy and childhood bone mass at age 9 years: a longitudinal study." Lancet **367**(9504): 36-43.
- Jilka, R. L., O'Brien, C. A., *et al.* (2009). "Intermittent PTH stimulates periosteal bone formation by actions on post-mitotic preosteoblasts." Bone **44**(2): 275-86.

- Johansson, L., Gafvelin, G., *et al.* (2005). "Selenocysteine in proteins-properties and biotechnological use." Biochim Biophys Acta **1726**(1): 1-13.
- Juppner, H., Abou-Samra, A. B., *et al.* (1991). "A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide." Science **254**(5034): 1024-6.
- Kanatani, M., Sugimoto, T., *et al.* (2004). "Thyroid hormone stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of RANKL-RANK interaction." J Cell Physiol **201**(1): 17-25.
- Kasaikina, M. V., Fomenko, D. E., *et al.* (2011). "Roles of the 15-kDa selenoprotein (Sep15) in redox homeostasis and cataract development revealed by the analysis of Sep 15 knockout mice." J Biol Chem **286**(38): 33203-12.
- Kemper, B., Habener, J. F., *et al.* (1974). "Pre-proparathyroid hormone: a direct translation product of parathyroid messenger RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(9): 3731-5.
- Kennedy, O. D. and Schaffler, M. B. (2012). "The roles of osteocyte signaling in bone." J Am Acad Orthop Surg **20**(10): 670-1.
- Khosla, S., Westendorf, J. J., *et al.* (2010). "Concise review: Insights from normal bone remodeling and stem cell-based therapies for bone repair." Stem Cells **28**(12): 2124-8.
- Kitanaka, S., Takeyama, K., *et al.* (1998). "Inactivating mutations in the 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene in patients with pseudovitamin D-deficiency rickets." N Engl J Med **338**(10): 653-61.
- Kopic, S. and Geibel, J. P. (2013). "Gastric acid, calcium absorption, and their impact on bone health." Physiol Rev **93**(1): 189-268.
- Koshihara, Y., Hoshi, K., *et al.* (1996). "Vitamin K2 promotes 1alpha,25(OH)₂ vitamin D3-induced mineralization in human periosteal osteoblasts." Calcif Tissue Int **59**(6): 466-73.
- Kousteni, S., Chen, J. R., *et al.* (2002). "Reversal of bone loss in mice by nongenotropic signaling of sex steroids." Science **298**(5594): 843-6.
- Kryukov, G. V., Castellano, S., *et al.* (2003). "Characterization of mammalian selenoproteomes." Science **300**(5624): 1439-43.
- Lacey, D. L., Boyle, W. J., *et al.* (2012). "Bench to bedside: elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab." Nat Rev Drug Discov **11**(5): 401-19.
- Laclaustra, M., Navas-Acien, A., *et al.* (2009). "Serum selenium concentrations and diabetes in U.S. adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2004." Environ Health Perspect **117**(9): 1409-13.
- Lambers, T. T., Bindels, R. J., *et al.* (2006). "Coordinated control of renal Ca²⁺ handling." Kidney Int **69**(4): 650-4.

Literatur

- Lamy, O. (2012). "[Bone anabolic treatment with Teriparatide]." Ther Umsch **69**(3): 187-91.
- Las Heras, F., Gahunia, H. K., *et al.* (2012). "Articular cartilage development: a molecular perspective." Orthop Clin North Am **43**(2): 155-71, v.
- Levander, O. A. and Beck, M. A. (1997). "Interacting nutritional and infectious etiologies of Keshan disease. Insights from coxsackie virus B-induced myocarditis in mice deficient in selenium or vitamin E." Biol Trace Elem Res **56**(1): 5-21.
- Li, Y. C., Amling, M., *et al.* (1998). "Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D receptor-ablated mice." Endocrinology **139**(10): 4391-6.
- Lieben, L., Masuyama, R., *et al.* (2012). "Normocalcemia is maintained in mice under conditions of calcium malabsorption by vitamin D-induced inhibition of bone mineralization." J Clin Invest **122**(5): 1803-15.
- Lin, H. Y., Harris, T. L., *et al.* (1991). "Expression cloning of an adenylate cyclase-coupled calcitonin receptor." Science **254**(5034): 1022-4.
- Lisboa, P. C., Curty, F. H., *et al.* (2001). "Sex steroids modulate rat anterior pituitary and liver iodothyronine deiodinase activities." Horm Metab Res **33**(9): 532-5.
- Liu, S. Z., Yan, H., *et al.* (2009). "Correlation analysis between bone mineral density and serum element contents of postmenopausal women in Xi'an urban area." Biol Trace Elem Res **131**(3): 205-14.
- Lopes, P. A., Santos, M. C., *et al.* (2004). "Trace element status (Se, Cu, Zn) in healthy Portuguese subjects of Lisbon population: a reference study." Biol Trace Elem Res **101**(1): 1-17.
- Ma, S., Hill, K. E., *et al.* (2002). "Mass spectrometric characterization of full-length rat selenoprotein P and three isoforms shortened at the C terminus. Evidence that three UGA codons in the mRNA open reading frame have alternative functions of specifying selenocysteine insertion or translation termination." J Biol Chem **277**(15): 12749-54.
- MacFarquhar, J. K., Broussard, D. L., *et al.* (2010). "Acute selenium toxicity associated with a dietary supplement." Arch Intern Med **170**(3): 256-61.
- Mackie, E. J., Ahmed, Y. A., *et al.* (2008). "Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton." Int J Biochem Cell Biol **40**(1): 46-62.
- Mackie, E. J., Tatarczuch, L., *et al.* (2011). "The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification." J Endocrinol **211**(2): 109-21.
- Maenpaa, P. H., Pirhonen, A., *et al.* (1989). "Biochemical indicators related to antioxidant status and bone metabolic activity in Finnish elderly men." Int J Vitam Nutr Res **59**(1): 14-9.

- Mahalingam, T. R., Vijayalakshmi, S., *et al.* (1997). "Studies on some trace and minor elements in blood. A survey of the Kalpakkam (India) population. Part III: Studies on dietary intake and its correlation to blood levels." Biol Trace Elem Res **57**(3): 223-38.
- Makihira, S., Yan, W., *et al.* (2003). "Thyroid hormone enhances aggrecanase-2/ADAM-TS5 expression and proteoglycan degradation in growth plate cartilage." Endocrinology **144**(6): 2480-8.
- Makin, G., Lohnes, D., *et al.* (1989). "Target cell metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 to calcitric acid. Evidence for a pathway in kidney and bone involving 24-oxidation." Biochem J **262**(1): 173-80.
- Manolagas, S. C. (1998). "The role of IL-6 type cytokines and their receptors in bone." Ann N Y Acad Sci **840**: 194-204.
- Manolagas, S. C. (2010). "From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis." Endocr Rev **31**(3): 266-300.
- Manolagas, S. C. (2013). "Steroids and osteoporosis: the quest for mechanisms." J Clin Invest **123**(5): 1919-21.
- Marassi, M. P., Fortunato, R. S., *et al.* (2007). "Sexual dimorphism in thyroid function and type 1 iodothyronine deiodinase activity in pre-pubertal and adult rats." J Endocrinol **192**(1): 121-30.
- Martin-Romero, F. J., Kryukov, G. V., *et al.* (2001). "Selenium metabolism in Drosophila: selenoproteins, selenoprotein mRNA expression, fertility, and mortality." J Biol Chem **276**(32): 29798-804.
- Massafra, C., Gioia, D., *et al.* (2002). "Gender-related differences in erythrocyte glutathione peroxidase activity in healthy subjects." Clin Endocrinol (Oxf) **57**(5): 663-7.
- Mayahara, K., Yamaguchi, A., *et al.* (2012). "Osteoblasts stimulate osteoclastogenesis via RANKL expression more strongly than periodontal ligament cells do in response to PGE(2)." Arch Oral Biol **57**(10): 1377-84.
- Mello, M. A. and Tuan, R. S. (2006). "Effects of TGF-beta1 and triiodothyronine on cartilage maturation: in vitro analysis using long-term high-density micromass cultures of chick embryonic limb mesenchymal cells." J Orthop Res **24**(11): 2095-105.
- Meplan, C., Nicol, F., *et al.* (2009). "Relative abundance of selenoprotein P isoforms in human plasma depends on genotype, se intake, and cancer status." Antioxid Redox Signal **11**(11): 2631-40.
- Milne, M., Quail, J. M., *et al.* (2001). "Insulin-like growth factor binding proteins in femoral and vertebral bone marrow stromal cells: expression and regulation by thyroid hormone and dexamethasone." J Cell Biochem **81**(2): 229-40.
- Moon, H. J., Ko, W. K., *et al.* (2012). "Antioxidants, like coenzyme Q10, selenite, and curcumin, inhibited osteoclast differentiation by suppressing reactive oxygen species

- generation." Biochem Biophys Res Commun **418**(2): 247-53.
- Moreno-Reyes, R., Egrise, D., *et al.* (2001). "Selenium deficiency-induced growth retardation is associated with an impaired bone metabolism and osteopenia." J Bone Miner Res **16**(8): 1556-63.
- Moreno-Reyes, R., Mathieu, F., *et al.* (2003). "Selenium and iodine supplementation of rural Tibetan children affected by Kashin-Beck osteoarthropathy." Am J Clin Nutr **78**(1): 137-44.
- Moreno-Reyes, R., Suetens, C., *et al.* (1998). "Kashin-Beck osteoarthropathy in rural Tibet in relation to selenium and iodine status." N Engl J Med **339**(16): 1112-20.
- Moreno-Reyes, R., Suetens, C., *et al.* (2001). "Kashin-Beck disease and iodine deficiency in Tibet." Int Orthop **25**(3): 164-6.
- Mosekilde, L., Eriksen, E. F., *et al.* (1990). "Effects of thyroid hormones on bone and mineral metabolism." Endocrinol Metab Clin North Am **19**(1): 35-63.
- Mosekilde, L., Sogaard, C. H., *et al.* (1991). "The anabolic effects of human parathyroid hormone (hPTH) on rat vertebral body mass are also reflected in the quality of bone, assessed by biomechanical testing: a comparison study between hPTH-(1-34) and hPTH-(1-84)." Endocrinology **129**(1): 421-8.
- Moser-Veillon, P. B., Mangels, A. R., *et al.* (1992). "Utilization of two different chemical forms of selenium during lactation using stable isotope tracers: an example of speciation in nutrition." Analyst **117**(3): 559-62.
- Moustafa, M. E. and Antar, H. A. (2012). "A bioinformatics approach to characterize mammalian selenoprotein T." Biochem Genet **50**(9-10): 736-47.
- Mundy, G. R., Shapiro, J. L., *et al.* (1976). "Direct stimulation of bone resorption by thyroid hormones." J Clin Invest **58**(3): 529-34.
- Murias, M., Rachtan, M., *et al.* (2005). "Effect of multiple freeze-thaw cycles of cytoplasm samples on the activity of antioxidant enzymes." J Pharmacol Toxicol Methods **52**(2): 302-5.
- Murphy, E., Gluer, C. C., *et al.* (2010). "Thyroid function within the upper normal range is associated with reduced bone mineral density and an increased risk of nonvertebral fractures in healthy euthyroid postmenopausal women." J Clin Endocrinol Metab **95**(7): 3173-81.
- Murphy, E. and Williams, G. R. (2004). "The thyroid and the skeleton." Clin Endocrinol (Oxf) **61**(3): 285-98.
- Nakanishi, A., Hie, M., *et al.* (2013). "A crucial role for reactive oxygen species in macrophage colony-stimulating factor-induced RANK expression in osteoclastic differentiation." Int J Mol Med **31**(4): 874-80.
- Ng, K. W., Romas, E., *et al.* (1997). "Bone biology." Baillieres Clin Endocrinol Metab **11**(1): 1-

22.

- Nguyen, T. M., Lieberherr, M., *et al.* (2004). "The rapid effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 require the vitamin D receptor and influence 24-hydroxylase activity: studies in human skin fibroblasts bearing vitamin D receptor mutations." J Biol Chem **279**(9): 7591-7.
- Nicastro, H. L. and Dunn, B. K. (2013). "Selenium and prostate cancer prevention: insights from the selenium and vitamin E cancer prevention trial (SELECT)." Nutrients **5**(4): 1122-48.
- O'Toole, D. and Raisbeck, M. F. (1995). "Pathology of experimentally induced chronic selenosis (alkali disease) in yearling cattle." J Vet Diagn Invest **7**(3): 364-73.
- Odabasi, E., Turan, M., *et al.* (2008). "Magnesium, zinc, copper, manganese, and selenium levels in postmenopausal women with osteoporosis. Can magnesium play a key role in osteoporosis?" Ann Acad Med Singapore **37**(7): 564-7.
- Ohnishi, M. and Razzaque, M. S. (2013). "Osteo-Renal Cross-Talk and Phosphate Metabolism by the FGF23-Klotho System." Contrib Nephrol **180**: 1-13.
- Ohyama, Y. and Yamasaki, T. (2004). "Eight cytochrome P450s catalyze vitamin D metabolism." Front Biosci **9**: 3007-18.
- Oikawa, T., Kuroda, Y., *et al.* (2013). "Regulation of osteoclasts by membrane-derived lipid mediators." Cell Mol Life Sci.
- Olson, G. E., Winfrey, V. P., *et al.* (2008). "Megalin mediates selenoprotein P uptake by kidney proximal tubule epithelial cells." J Biol Chem **283**(11): 6854-60.
- Olson, G. E., Winfrey, V. P., *et al.* (2005). "Selenoprotein P is required for mouse sperm development." Biol Reprod **73**(1): 201-11.
- Orimo, H. (2012). "The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease." J Nippon Med Sch **77**(1): 4-12.
- Owen, T. A., Aronow, M. S., *et al.* (1991). "Pleiotropic effects of vitamin D on osteoblast gene expression are related to the proliferative and differentiated state of the bone cell phenotype: dependency upon basal levels of gene expression, duration of exposure, and bone matrix competency in normal rat osteoblast cultures." Endocrinology **128**(3): 1496-504.
- Paillard, F., Ardaillou, R., *et al.* (1972). "Renal effects of salmon calcitonin in man." J Lab Clin Med **80**(2): 200-16.
- Panda, D. K., Miao, D., *et al.* (2004). "Inactivation of the 25-hydroxyvitamin D 1alpha-hydroxylase and vitamin D receptor demonstrates independent and interdependent effects of calcium and vitamin D on skeletal and mineral homeostasis." J Biol Chem **279**(16): 16754-66.
- Panee, J., Stoytcheva, Z. R., *et al.* (2007). "Selenoprotein H is a redox-sensing high mobility group family DNA-binding protein that up-regulates genes involved in glutathione

- synthesis and phase II detoxification." J Biol Chem **282**(33): 23759-65.
- Papp, L. V., Lu, J., *et al.* (2007). "From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health." Antioxid Redox Signal **9**(7): 775-806.
- Parfitt, A. M. (1995). "Bone remodeling, normal and abnormal: a biological basis for the understanding of cancer-related bone disease and its treatment." Can J Oncol **5 Suppl 1**: 1-10.
- Park, Y. H., Jeon, Y. H., *et al.* (2012). "Selenoprotein W promotes cell cycle recovery from G2 arrest through the activation of CDC25B." Biochim Biophys Acta **1823**(12): 2217-26.
- Pedrerá-Zamorano, J. D., Calderon-Garcia, J. F., *et al.* (2012). "The protective effect of calcium on bone mass in postmenopausal women with high selenium intake." J Nutr Health Aging **16**(9): 743-8.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., *et al.* (2002). "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." Nucleic Acids Res **30**(9): e36.
- Pfister, M. F., Lederer, E., *et al.* (1997). "Parathyroid hormone-dependent degradation of type II Na⁺/Pi cotransporters." J Biol Chem **272**(32): 20125-30.
- Piersma, A. H. (2004). "Validation of alternative methods for developmental toxicity testing." Toxicol Lett **149**(1-3): 147-53.
- Pike, J. W. and Meyer, M. B. (2012). "Regulation of mouse Cyp24a1 expression via promoter-proximal and downstream-distal enhancers highlights new concepts of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) action." Arch Biochem Biophys **523**(1): 2-8.
- Porat, A., Sagiv, Y., *et al.* (2000). "A 56-kDa selenium-binding protein participates in intra-Golgi protein transport." J Biol Chem **275**(19): 14457-65.
- Prosser, D. E. and Jones, G. (2004). "Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D." Trends Biochem Sci **29**(12): 664-73.
- Raggatt, L. J. and Partridge, N. C. (2010). "Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling." J Biol Chem **285**(33): 25103-8.
- Ralston, S. H. and de Crombrugge, B. (2006). "Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis." Genes Dev **20**(18): 2492-506.
- Rasmussen, L. B., Hollenbach, B., *et al.* (2009). "Serum selenium and selenoprotein P status in adult Danes - 8-year followup." J Trace Elem Med Biol **23**(4): 265-71.
- Rayman, M. P. (2008). "Food-chain selenium and human health: emphasis on intake." Br J Nutr **100**(2): 254-68.
- Rayman, M. P. (2012). "Selenium and human health." Lancet **379**(9822): 1256-68.
- Read, R., Bellew, T., *et al.* (1990). "Selenium and amino acid composition of selenoprotein P, the major selenoprotein in rat serum." J Biol Chem **265**(29): 17899-905.

Literatur

- Reeves, M. A., Bellinger, F. P., *et al.* (2010). "The neuroprotective functions of selenoprotein M and its role in cytosolic calcium regulation." *Antioxid Redox Signal* **12**(7): 809-18.
- Ren, F. L., Guo, X., *et al.* (2007). "Effects of selenium and iodine deficiency on bone, cartilage growth plate and chondrocyte differentiation in two generations of rats." *Osteoarthritis Cartilage* **15**(10): 1171-7.
- Renko, K., Werner, M., *et al.* (2008). "Hepatic selenoprotein P (SePP) expression restores selenium transport and prevents infertility and motor-incoordination in Sepp-knockout mice." *Biochem J* **409**(3): 741-9.
- Riese, C., Michaelis, M., *et al.* (2006). "Selenium-dependent pre- and posttranscriptional mechanisms are responsible for sexual dimorphic expression of selenoproteins in murine tissues." *Endocrinology* **147**(12): 5883-92.
- Rivas, A., Romero, A., *et al.* (2012). "Association between dietary antioxidant quality score (DAQs) and bone mineral density in Spanish women." *Nutr Hosp* **27**(6): 1886-93.
- Rivkees, S. A., Bode, H. H., *et al.* (1988). "Long-term growth in juvenile acquired hypothyroidism: the failure to achieve normal adult stature." *N Engl J Med* **318**(10): 599-602.
- Robson, H., Siebler, T., *et al.* (2000). "Thyroid hormone acts directly on growth plate chondrocytes to promote hypertrophic differentiation and inhibit clonal expansion and cell proliferation." *Endocrinology* **141**(10): 3887-97.
- Rush, J. W. and Sandiford, S. D. (2003). "Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: influence of gender and physical activity." *Clin Biochem* **36**(5): 345-51.
- Saito, Y., Hayashi, T., *et al.* (1999). "Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein p." *J Biol Chem* **274**(5): 2866-71.
- Schnoke, M., Midura, S. B., *et al.* (2009). "Parathyroid hormone suppresses osteoblast apoptosis by augmenting DNA repair." *Bone* **45**(3): 590-602.
- Schomburg, L., Dumitrescu, A. M., *et al.* (2009). "Selenium supplementation fails to correct the selenoprotein synthesis defect in subjects with SBP2 gene mutations." *Thyroid* **19**(3): 277-81.
- Schomburg, L., Riese, C., *et al.* (2006). "Synthesis and metabolism of thyroid hormones is preferentially maintained in selenium-deficient transgenic mice." *Endocrinology* **147**(3): 1306-13.
- Schomburg, L., Riese, C., *et al.* (2007). "Effect of age on sexually dimorphic selenoprotein expression in mice." *Biol Chem* **388**(10): 1035-41.
- Schomburg, L., Schweizer, U., *et al.* (2003). "Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues." *Biochem J* **370**(Pt 2): 397-402.
- Schutze, N., Bachthaler, M., *et al.* (1998). "Identification by differential display PCR of the

- selenoprotein thioredoxin reductase as a 1 alpha,25(OH)₂-vitamin D₃-responsive gene in human osteoblasts--regulation by selenite." Biofactors **7**(4): 299-310.
- Schwartz, Z., Sylvia, V. L., *et al.* (1998). "Treatment of resting zone chondrocytes with bone morphogenetic protein-2 induces maturation into a phenotype characteristic of growth zone chondrocytes by downregulating responsiveness to 24,25(OH)₂D₃ and upregulating responsiveness to 1,25-(OH)₂D₃." Endocrine **9**(3): 273-80.
- Schwarz, K. and Foltz, C. M. (1958). "Factor 3 activity of selenium compounds." J Biol Chem **233**(1): 245-51.
- Schweizer, U., Michaelis, M., *et al.* (2004). "Efficient selenium transfer from mother to offspring in selenoprotein-P-deficient mice enables dose-dependent rescue of phenotypes associated with selenium deficiency." Biochem J **378**(Pt 1): 21-6.
- Segni, M., Leonardi, E., *et al.* (1999). "Special features of Graves' disease in early childhood." Thyroid **9**(9): 871-7.
- Shchedrina, V. A., Everley, R. A., *et al.* (2011). "Selenoprotein K binds multiprotein complexes and is involved in the regulation of endoplasmic reticulum homeostasis." J Biol Chem **286**(50): 42937-48.
- Shinki, T., Ueno, Y., *et al.* (1999). "Calcitonin is a major regulator for the expression of renal 25-hydroxyvitamin D₃-1alpha-hydroxylase gene in normocalcemic rats." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 8253-8.
- Siddiqi, A., Parsons, M. P., *et al.* (2002). "TR expression and function in human bone marrow stromal and osteoblast-like cells." J Clin Endocrinol Metab **87**(2): 906-14.
- Sinningen, K., Tsourdi, E., *et al.* (2012). "Skeletal and extraskelatal actions of denosumab." Endocrine **42**(1): 52-62.
- Sosic-Jurjevic, B., Filipovic, B., *et al.* (2012). "Orchidectomy of middle-aged rats decreases liver deiodinase 1 and pituitary deiodinase 2 activity." J Endocrinol **215**(2): 247-56.
- Spath, S. S., Andrade, A. C., *et al.* (2011). "Local regulation of growth plate cartilage." Endocr Dev **21**: 12-22.
- Squires, J. E. and Berry, M. J. (2008). "Eukaryotic selenoprotein synthesis: mechanistic insight incorporating new factors and new functions for old factors." IUBMB Life **60**(4): 232-5.
- St-Arnaud, R., Arabian, A., *et al.* (2000). "Deficient mineralization of intramembranous bone in vitamin D-24-hydroxylase-ablated mice is due to elevated 1,25-dihydroxyvitamin D and not to the absence of 24,25-dihydroxyvitamin D." Endocrinology **141**(7): 2658-66.
- St.-Arnaud, R. A., A, and Glorieux, FH (1996). "Abnormal bone development in mice deficient for the vitamin D-24-hydroxylase gene." J Bone Miner Res **11**: 126.
- Steinbrenner, H., Alili, L., *et al.* (2006). "Involvement of selenoprotein P in protection of human astrocytes from oxidative damage." Free Radic Biol Med **40**(9): 1513-23.

- Steinbrenner, H., Bilgic, E., *et al.* (2006). "Selenoprotein P protects endothelial cells from oxidative damage by stimulation of glutathione peroxidase expression and activity." Free Radic Res **40**(9): 936-43.
- Stevens, D. A., Harvey, C. B., *et al.* (2003). "Thyroid hormone activates fibroblast growth factor receptor-1 in bone." Mol Endocrinol **17**(9): 1751-66.
- Stoedter, M., Renko, K., *et al.* (2010). "Selenium controls the sex-specific immune response and selenoprotein expression during the acute-phase response in mice." Biochem J **429**(1): 43-51.
- Sudre, P. and Mathieu, F. (2001). "Kashin-Beck disease: from etiology to prevention or from prevention to etiology?" Int Orthop **25**(3): 175-9.
- Suetens, C., Moreno-Reyes, R., *et al.* (2001). "Epidemiological support for a multifactorial aetiology of Kashin-Beck disease in Tibet." Int Orthop **25**(3): 180-7.
- Sun, J., Sun, Q., *et al.* (2011). "From selenoprotein to endochondral ossification: a novel mechanism with microRNAs potential in bone related diseases?" Med Hypotheses **77**(5): 807-11.
- Sunde, R. A. (1990). "Molecular biology of selenoproteins." Annu Rev Nutr **10**: 451-74.
- Sutter, M. E., Thomas, J. D., *et al.* (2008). "Selenium toxicity: a case of selenosis caused by a nutritional supplement." Ann Intern Med **148**(12): 970-1.
- Sutton, A. L. and MacDonald, P. N. (2003). "Vitamin D: more than a "bone-a-fide" hormone." Mol Endocrinol **17**(5): 777-91.
- Swanson, C. A., Patterson, B. H., *et al.* (1991). "Human [74Se]selenomethionine metabolism: a kinetic model." Am J Clin Nutr **54**(5): 917-26.
- Takahashi, N., Yamana, H., *et al.* (1988). "Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures." Endocrinology **122**(4): 1373-82.
- Tang, E. K., Voo, K. J., *et al.* (2010). "Metabolism of substrates incorporated into phospholipid vesicles by mouse 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase (CYP27B1)." J Steroid Biochem Mol Biol **119**(3-5): 171-9.
- Tebben, P. J., Milliner, D. S., *et al.* (2012). "Hypercalcemia, hypercalciuria, and elevated calcitriol concentrations with autosomal dominant transmission due to CYP24A1 mutations: effects of ketoconazole therapy." J Clin Endocrinol Metab **97**(3): E423-7.
- Teitelbaum, S. L. (2000). "Bone resorption by osteoclasts." Science **289**(5484): 1504-8.
- Thamsborg, G., Jensen, J. E., *et al.* (1996). "Effect of nasal salmon calcitonin on bone remodeling and bone mass in postmenopausal osteoporosis." Bone **18**(2): 207-12.
- Thompson, K. M., Haibach, H., *et al.* (1995). "Growth and plasma triiodothyronine concentrations are modified by selenium deficiency and repletion in second-generation selenium-deficient rats." J Nutr **125**(4): 864-73.

Literatur

- Traulsen, H., Steinbrenner, H., *et al.* (2004). "Selenoprotein P protects low-density lipoprotein against oxidation." Free Radic Res **38**(2): 123-8.
- Tregear, G. W., Van Rietschoten, J., *et al.* (1973). "Bovine parathyroid hormone: minimum chain length of synthetic peptide required for biological activity." Endocrinology **93**(6): 1349-53.
- Turanov, A. A., Xu, X. M., *et al.* (2011). "Biosynthesis of selenocysteine, the 21st amino acid in the genetic code, and a novel pathway for cysteine biosynthesis." Adv Nutr **2**(2): 122-8.
- Valentine, W. M., Abel, T. W., *et al.* (2008). "Neurodegeneration in mice resulting from loss of functional selenoprotein P or its receptor apolipoprotein E receptor 2." J Neuropathol Exp Neurol **67**(1): 68-77.
- Van Cromphaut, S. J., Dewerchin, M., *et al.* (2001). "Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(23): 13324-9.
- van der Deure, W. M., Peeters, R. P., *et al.* (2009). "Molecular aspects of thyroid hormone transporters, including MCT8, MCT10, and OATPs, and the effects of genetic variation in these transporters." J Mol Endocrinol **44**(1): 1-11.
- Varga, F., Rumpler, M., *et al.* (2010). "T3 affects expression of collagen I and collagen cross-linking in bone cell cultures." Biochem Biophys Res Commun **402**(2): 180-5.
- Varga, F., Spitzer, S., *et al.* (2004). "Triiodothyronine (T3) and 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25D3) inversely regulate OPG gene expression in dependence of the osteoblastic phenotype." Calcif Tissue Int **74**(4): 382-7.
- Varlamova, E. G. and Novoselov, V. I. (2012). "[The search of partners of a new mammalian selenium-containing protein V (SeIV) and expression it's mRNA during ontogenesis and spermatogenesis]." Mol Biol (Mosk) **46**(2): 276-84.
- Vestergaard, P. and Mosekilde, L. (2002). "Fractures in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism: a nationwide follow-up study in 16,249 patients." Thyroid **12**(5): 411-9.
- Wagner, C. L., Taylor, S. N., *et al.* (2012). "Vitamin D and its role during pregnancy in attaining optimal health of mother and fetus." Nutrients **4**(3): 208-30.
- Wang, S. J., Guo, X., *et al.* (2005). "[Chondrocyte apoptosis and the expression of Bcl-2, Bax, Fas and iNos in articular cartilage in Kashin-Beck disease]." Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao **25**(6): 643-6.
- Wang, X., Gillen, E. A., *et al.* (2008). "Knockouts of Se-glutathione peroxidase-1 and Cu,Zn superoxide dismutase exert different impacts on femoral mechanical performance of growing mice." Mol Nutr Food Res **52**(11): 1334-9.
- Watts, N. B. (1999). "Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling." Clin Chem

- 45**(8 Pt 2): 1359-68.
- Waung, J. A., Bassett, J. H., *et al.* (2012). "Thyroid hormone metabolism in skeletal development and adult bone maintenance." Trends Endocrinol Metab **23**(4): 155-62.
- Weeks, B. S., Hanna, M. S., *et al.* (2012). "Dietary selenium and selenoprotein function." Med Sci Monit **18**(8): RA127-132.
- Weinstein, R. S., Chen, J. R., *et al.* (2002). "Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids." J Clin Invest **109**(8): 1041-8.
- Wessjohann, L. A., Schneider, A., *et al.* (2007). "Selenium in chemistry and biochemistry in comparison to sulfur." Biol Chem **388**(10): 997-1006.
- Whitacre, C. C. (2001). "Sex differences in autoimmune disease." Nat Immunol **2**(9): 777-80.
- WHO (1998). "Vitamin and mineral requirements in human nutrition : report of a joint FAO/WHO expert consultation."
- Williams, A. J., Robson, H., *et al.* (2008). "Iodothyronine deiodinase enzyme activities in bone." Bone **43**(1): 126-34.
- Wojcicka, A., Bassett, J. H., *et al.* (2012). "Mechanisms of action of thyroid hormones in the skeleton." Biochim Biophys Acta **1830**(7): 3979-86.
- Wongdee, K., Krishnamra, N., *et al.* (2012). "Endochondral bone growth, bone calcium accretion, and bone mineral density: how are they related?" J Physiol Sci **62**(4): 299-307.
- Woodrow, J. P., Sharpe, C. J., *et al.* (2006). "Calcitonin plays a critical role in regulating skeletal mineral metabolism during lactation." Endocrinology **147**(9): 4010-21.
- Wuster, C., Raue, F., *et al.* (1992). "Long-term excess of endogenous calcitonin in patients with medullary thyroid carcinoma does not affect bone mineral density." J Endocrinol **134**(1): 141-7.
- Xia, W. F., Jung, J. U., *et al.* (2013). "Swedish mutant APP suppresses osteoblast differentiation and causes osteoporotic deficit, which are ameliorated by n-acetyl-l-cysteine." J Bone Miner Res.
- Xia, Y., Hill, K. E., *et al.* (2010). "Optimization of selenoprotein P and other plasma selenium biomarkers for the assessment of the selenium nutritional requirement: a placebo-controlled, double-blind study of selenomethionine supplementation in selenium-deficient Chinese subjects." Am J Clin Nutr **92**(3): 525-31.
- Xu, X. M., Carlson, B. A., *et al.* (2007). "Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes." PLoS Biol **5**(1): e4.
- Yamamuro, T. (2001). "Kashin-Beck disease: a historical overview." Int Orthop **25**(3): 134-7.
- Yang, C., Wolf, E., *et al.* (1993). "Selenium deficiency and fulvic acid supplementation induces fibrosis of cartilage and disturbs subchondral ossification in knee joints of

Literatur

- mice: an animal model study of Kashin-Beck disease." Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol **423**(6): 483-91.
- Yates, K. E., Allemann, F., *et al.* (2005). "Phenotypic analysis of bovine chondrocytes cultured in 3D collagen sponges: effect of serum substitutes." Cell Tissue Bank **6**(1): 45-54.
- Young, V. R., Nahapetian, A., *et al.* (1982). "Selenium bioavailability with reference to human nutrition." Am J Clin Nutr **35**(5): 1076-88.
- Zanello, L. P. and Norman, A. W. (2004). "Rapid modulation of osteoblast ion channel responses by 1alpha,25(OH)₂-vitamin D₃ requires the presence of a functional vitamin D nuclear receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(6): 1589-94.
- Zeng, H., Cao, J. J., *et al.* (2013). "Selenium in bone health: roles in antioxidant protection and cell proliferation." Nutrients **5**(1): 97-110.
- Zhou, X., Smith, A. M., *et al.* (2012). "Estrogen status alters tissue distribution and metabolism of selenium in female rats." J Nutr Biochem **23**(6): 532-8.
- Zimmerman, A. W. and Veerkamp, J. H. (2002). "New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins." Cell Mol Life Sci **59**(7): 1096-116.

Abkürzungsverzeichnis

Im Abkürzungsverzeichnis nicht aufgeführt sind die, nach dem Duden gebräuchlichen Abkürzungen, physikalische Größen und chemische Verbindungen.

A.dest.	Aqua destillatus, destilliertes Wasser
AB	Alzian Blau
ALP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BMC	<i>bone mineral content</i>
BMD	<i>bone mineral density</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BMU	<i>basic multicellular unit</i>
bp	Basenpaar
BV	<i>bone volume</i>
CaSR	<i>Ca sensing receptor</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
ColX	Kollagen X
Cys	Cystein
d	Tage
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
Dio	Dejodase
DMSO	Dimethylsulfoxid
EF ^{Sec}	<i>Sec-specific elongation factor</i>
FABP1	<i>fatty acid binding protein 1</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FGF23	<i>fibroblast growth factor 23</i>
GH	<i>growth hormone</i>
GPx	Humane Glutathion-Peroxidase
Gpx	Murine Glutathion-Peroxidase
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	Glutathion
HZ	heterozygot
IGF	<i>insuline-like growth factor</i>
IGFBP2	<i>IGF binding protein 2</i>
KBD	<i>Kashin-Beck-Disease</i>
KO	Knockout

Abkürzungsverzeichnis

LPS	Lipopolysaccharid
mCT	micro-Computertomographie
Met	Methionin
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	<i>messenger RNA</i>
	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-
NAD(P)H	(Phosphat)
NaSe	Natriumselenit
NTP	Nukleotidtriphosphat
OB	Osteoblasten
OC	Osteoklasten
OPG	Osteoprotegrin
OPUS	<i>Osteoporosis in Ultrasound</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Pen/Strep	Penicillin/Sreptomycin
ppm	<i>parts per million</i>
PSTK	Phosphoseryl-tRNA-Kinase
PTH	Parathormon
PTHR	PTH-Rezeptor
RANK(L)	<i>Receptor Activator of NF-κB (Ligand)</i>
RDA	<i>Recommended dietary allowance</i>
REST	<i>Relative Expression Software Tool</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
SBP2	<i>SECIS binding protein 2</i>
SD	<i>standard deviation</i>
Se	Selen
SeBP1	<i>Selenium binding protein 1</i>
Sec	Selenocystein
SECIS	<i>Selenocystein insertion sequence</i>
SecS	Selenocystein-Synthase
SeS	Selenoprotein S
SEM	<i>standard error of mean</i>
SeMet	Selenomethionin
SePP	Humanes Selenoprotein P (<i>kursiv: Gen</i>)
Sepp	Murines Selenoprotein P (<i>kursiv: Gen</i>)
Ser	Serin

Abkürzungsverzeichnis

SPS2	Selenophosphat-Synthetase
T3	3,3',5-Triiodothyronin
T4	3,3',5,5'-Tetraiodothyronin
TR	<i>Thyroid hormone receptor</i>
TRFA	Totalröntgenfluoreszenzanalytik
tRNA	<i>transfer RNA</i>
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxin-Reduktase
TV	<i>total volume</i>
VDBP	<i>VitD binding protein</i>
VDR	VitD-Rezeptor
VEGF	<i>vaso-endothelial growth factor</i>
VitD	Vitamin D
w/v	<i>weight per volume</i>
WT	wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Schematische Darstellung des Se-Stoffwechsels.....	5
Abb. 1.2: tRNA ^{Ser} -Biosynthese in Eukaryonten	10
Abb. 1.3: Strukturen der SECIS- Elemente in Eu- und Prokaryoten und Archaea.....	11
Abb. 1.4: Schematischer Aufbau von SePP.....	13
Abb. 1.5: Aufbau eines Röhrenknochens.....	15
Abb. 1.6: Schematische Darstellung der endochondralen Ossifikation.	17
Abb. 1.7: Schematische Aufbau der Wachstumszone eines Röhrenknochens bzw. eines Knochens während der endochondralen Ossifikation.....	18
Abb. 1.8: Schematische Darstellung der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen.	19
Abb. 1.9: Schematische Darstellung der Auf- und Abbauprozesse während des Knochenbaus.	21
Abb. 1.10: Schematische Darstellung der Wirkung von PTH.....	24
Abb. 1.11: Wechselspiel zwischen PTH und Calcitonin bei der Aufrechterhaltung eines konstanten Ca-Spiegels.....	26
Abb. 1.12: VitD-Derivate und ihre Bezeichnungen.....	27
Abb. 1.13: Schematische Darstellung eines Ausschnitts der Biosynthese von VitD.....	28
Abb. 1.14. Interaktion PTH und VitD auf die Ca-Homöostase und das Skelett.....	32
Abb. 4.1: Qualitative Auswertung der AB-Färbung nach sieben bzw. 14 Tagen Inkubation mit oder ohne 100 nM NaSe-Supplementation.....	56
Abb. 4.2 Quantitative Auswertung der AB-Färbung nach sieben (A) bzw. 14 Tagen (B) Inkubation mit oder ohne 100 nM NaSe-Supplementation.	57
Abb. 4.3: Qualitative Auswertung der ALP-Färbung nach sieben bzw. 14 Tagen Inkubation mit oder ohne 100 nM NaSe-Supplementation.....	58
Abb. 4.4: Quantitative Auswertung der ALP-Färbung nach sieben (A) bzw. 14 Tagen (B) Inkubation mit oder ohne 100 nM NaSe-Supplementation.	59
Abb. 4.5 Differentielle Genexpression in der murinen Micromass-Zellkultur.....	60
Abb. 4.6: Differentielle Genexpression der Knochen- bzw. Wachstumsspezifischer Gene in Hepa 1-6 Zellen in Abhängigkeit vom Se-Status.	61
Abb. 4.7: Differentielle Genexpression Knochen- bzw. Wachstumsspezifischer Gene in Hepa 1-6 Zellen in Abhängigkeit der verwendeten Se-Formen.....	62
Abb. 4.8: MicroCT-Analyse der Unterschenkelknochen von P34 alten Tieren.	63
Abb. 4.9: MicroCT-Analysen der Trabekel von P34-Tieren auf RDA-Futter.	64
Abb. 4.10: Differentielle Genexpression in Leber, Niere und Schilddrüse in Abhängigkeit vom Sepp-Genotyp.....	65
Abb. 4.11: Differentielle Genexpression in Mäusen in Abhängigkeit vom Geschlecht.....	67

Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.12: Mineralisierung der Knochen der 14 Tage alten Sepp-Tiere.	69
Abb. 4.13: Exemplarischer Vergleich der Knochen P14 alter Tiere unterschiedlichen Sepp-Genotyps.....	69
Abb. 4.14: Quantitative Auswertung von Mikroradiographieuntersuchungen zur Knochenlänge in Abhängigkeit vom <i>SepP</i> -Genotyps bei 14 Tage alten Mäusen (P14). 70	
Abb. 4.15: Quantitative Auswertung von Mikroradiographieuntersuchungen zur Cortexdicke in Abhängigkeit vom <i>SepP</i> -Genotyps bei 14 Tage alten Mäusen (P14).	70
Abb. 4.16: Qualitative Auswertung von Mikroradiographieuntersuchungen in Bezug auf Knochendichte und -länge des Femurs 80 Tage alter Mäusen (P80).....	71
Abb. 4.17 Quantitative Auswertung von Mikroradiographieuntersuchungen zur Knochenlänge in Abhängigkeit vom <i>SepP</i> -Genotyps bei 80 Tage alten Mäusen (P80).	72
Abb. 4.18: Quantitative Auswertung von Mikroradiographieuntersuchungen zur Knochendichte in Abhängigkeit vom Sepp-Genotyps bei 80 Tage alten Mäusen (P80).72	
Abb. 4.19: Quantitative Auswertung von Mikroradiographieuntersuchungen zur Cortexdicke in Abhängigkeit vom <i>SepP</i> -Genotyps bei 80 Tage alten Mäusen (P80).	73
Abb. 4.20: Qualitative Auswertung von Mikroradiographieuntersuchungen in Bezug auf Knochendichte und -länge der Schwanzwirbelknochen 80 Tage alter Mäusen (P80)...	74
Abb. 4.21 Quantitative Auswertung von Mikroradiographieuntersuchungen in Bezug auf Knochendichte und -länge der Schwanzwirbelknochen 80 Tage alter Mäusen (P80)...	74
Abb. 4.22: Qualitative Auswertung von Mikroradiographieuntersuchungen in Bezug auf Knochendichte und -länge des Femurs 159 Tage alter Mäusen (P159).....	75
Abb. 4.23: Quantitative Auswertung von Mikroradiographieuntersuchungen zur Knochenlänge in Abhängigkeit vom <i>SepP</i> -Genotyps bei 159 Tage alten Mäusen (P159).	75
Abb. 4.24. Quantitative Auswertung von Mikroradiographieuntersuchungen in Bezug auf Knochendichte des Femurknochens 159 Tage alter Mäusen (P159).	76
Abb. 4.25: Quantitative Auswertung von Mikroradiographieuntersuchungen zur Cortexdicke in Abhängigkeit vom <i>SepP</i> -Genotyps bei 159 Tage alten Mäusen (P159).	76
Abb. 4.26: Qualitative Auswertung von Mikroradiographieuntersuchungen in Bezug auf Knochendichte und -länge der Schwanzwirbelknochen 159 Tage alter Mäusen (P159).	77
Abb. 4.27: Quantitative Auswertung von Mikroradiographieuntersuchungen in Bezug auf Knochendichte der Schwanzwirbelknochen 159 Tage alter Mäusen (P159).....	77
Abb. 4.28: H/E-Färbung der Wachstumsfuge in Abhängigkeit vom <i>SepP</i> -Genotyp.	78
Abb. 4.29: Differentielle Genexpression knochenrelevanter Gene in der Leber in Abhängigkeit vom Genotyp.	79

Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.30: Differentielle Genexpression knochenrelevanter Gene in der Leber in Abhängigkeit vom Alter.	80
Abb. 4.31: Differentielle Genexpression knochenrelevanter Gene in der Leber in Abhängigkeit vom Geschlecht.....	81
Abb. 4.32: Differentielle Genexpression von Cyp27b1 und Cyp24a1 in der Niere in Abhängigkeit vom Genotyp.	82
Abb. 4.33: Differentielle Genexpression knochenrelevanter Gene in der Niere in Abhängigkeit vom Alter.	83
Abb. 4.34: Differentielle Genexpression knochenrelevanter Gene in der Niere in Abhängigkeit vom Geschlecht.	84
Abb. 4.35: OPUS-Kollektiv zur Bestimmung des Selenstatus.....	85
Abb. 4.36: Korrelation von Se- und SePP-Konzentrationen im Serum der Probandinnen des OPUS-Kollektivs.....	87
Abb. 4.37: Assoziation von BMD der Hüft- und Lendenwirbelknochen und Se-Status innerhalb der verschiedenen Se- bzw. SePP-Quintile.	91
Abb. 5.1: Möglicher Wirkungsort bzw. Wirkungszeitpunkt von Se während der endochondralen Knochenbildung.....	108
Abb. 5.2: Möglicher Wirkungsort von Se während des adulten Knochenumbaus.....	109

Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1: Se-Gehalt verschiedener Nahrungsmittel in verschiedenen Ländern.....	2
Tab. 1-2 Geographische Unterschiede in der täglichen Se-Aufnahme von Erwachsenen	3
Tab. 1-3: Bekannte humane Selenoproteine und ihre Funktionen.....	7
Tab. 2-1: Verwendete Geräte.....	38
Tab. 2-2: Verwendete Software und Datenbanken	39
Tab. 2-3: Sequenzen der Genotypisierungsprimer	40
Tab. 2-4: Sequenzen der Primer für die <i>real-time</i> PCR	40
Tab. 2-5: Schritte der H/E-Färbung.....	50
Tab. 4-1: Charakterisierung der Studienpopulation.....	86
Tab. 4-2: Se-Status variiert im Alter.	86
Tab. 4-3: Assoziation der Schilddrüsenhormone mit dem Se-Status.....	87
Tab. 4-4: Assoziation von Schilddrüsenparametern und dem Se-Status.....	88
Tab. 4-5: Assoziation von 25-OH-VitD bzw. PTH und dem Se-Status.....	89
Tab. 4-6: Assoziation von BMD der Hüft- bzw. Lendenwirbelknochen und dem Se-Status...90	
Tab. 4-7: Se-Status und BMD der Lendenwirbelsäule und der Hüfte	92
Tab. 4-8: Assoziation von Frakturrisiko und Se-Status.	93
Tab. 4-9: Se-Status und klinische Parameter des Knochenumsatzes und extraskeletale Parameter	94

Publikationen

Combs, G. F., Jr., M. I. Jackson, J. C. Watts, L. K. Johnson, H. Zeng, J. Idso, L. Schomburg, **A. Hoeg**, C. S. Hoefig, E. C. Chiang, D. J. Waters, C. D. Davis and J. A. Milner (2012) "Differential responses to selenomethionine supplementation by sex and genotype in healthy adults." Br J Nutr **107**(10): 1514-25.

Combs, G. F., Jr., J. C. Watts, M. I. Jackson, L. K. Johnson, H. Zeng, A. J. Scheett, E. O. Uthus, L. Schomburg, **A. Hoeg**, C. S. Hoefig, C. D. Davis and J. A. Milner (2011) "Determinants of selenium status in healthy adults." Nutr J **10**: 75.

Hoeflich, J., B. Hollenbach, T. Behrends, **A. Hoeg**, H. Stosnach and L. Schomburg (2010) "The choice of biomarkers determines the selenium status in young German vegans and vegetarians." Br J Nutr **104**(11): 1601-4.

Hoeg, A., A. Gogakos, E. Murphy, S. Mueller, J. Kohrle, D. M. Reid, C. C. Gluer, D. Felsenberg, C. Roux, R. Eastell, L. Schomburg and G. R. Williams (2012) "Bone turnover and bone mineral density are independently related to selenium status in healthy euthyroid postmenopausal women." J Clin Endocrinol Metab **97**(11): 4061-70.

Rasmussen, L. B., B. Hollenbach, P. Laurberg, A. Carle, **A. Hog**, T. Jorgensen, P. Vejbjerg, L. Ovesen and L. Schomburg (2009). "Serum selenium and selenoprotein P status in adult Danes - 8-year followup." J Trace Elem Med Biol **23**(4): 265-71.

Rasmussen, L. B., L. Schomburg, J. Kohrle, I. B. Pedersen, B. Hollenbach, **A. Hog**, L. Ovesen, H. Perrild and P. Laurberg (2011) "Selenium status, thyroid volume, and multiple nodule formation in an area with mild iodine deficiency." Eur J Endocrinol **164**(4): 585-90.

Stoedter, M., K. Renko, **A. Hog** and L. Schomburg (2010) "Selenium controls the sex-specific immune response and selenoprotein expression during the acute-phase response in mice." Biochem J **429**(1): 43-51.

Lebenslauf

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Danksagung

Es gibt viele Menschen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre und bei denen ich mich bedanken möchte.

An erster Stelle soll mein Betreuer Prof. Dr. Lutz Schomburg genannt werden, der mich mit seiner Begeisterung für Selen, Selenoproteine und Geschlechtsunterschiede nachhaltig angesteckt hat. Während der experimentellen und der langen Schreibphase hat er mich immer unterstützt, mir Hoffnung gemacht und an das scheinbar Unmögliche geglaubt. Zudem hat er mich in meiner Entscheidung den Geschlechteraspekt mehr aus geisteswissenschaftlicher Perspektive zu untersuchen bestärkt und so für neuen Antrieb für das Gelingen dieser Arbeit gesorgt. Ein großes Dankeschön dafür. Außerdem hat er mit der Auswahl seiner Mitarbeiter_innen ein glückliches Händchen gehabt und so wurden aus Arbeitskolleg_innen Freund_innen.

Bei Frau Prof. Dr. Petra Knaus vom Fachbereich Biochemie der FU Berlin möchte ich mich für die Übernahme des Erstgutachtens bedanken. Zudem fand ich die Doktorandensymposien sehr gelungen, die uns externen Doktoranden die Chance gaben, unsere Projekte zu präsentieren und unseren Horizont zu erweitern.

Prof. Graham Williams und seinen Mitarbeitern Apostolos Gogakos und Duncan Bassett aus London gilt mein herzlicher Dank für eine gelungene Kooperation, die exzellenten Daten und ihre offenen Ohren bei Fragen, was die Auswertung und Interpretation dieser Daten anging.

Prof. Köhrle und den Mitarbeiter_innen des Instituts für Experimentelle Endokrinologie gilt ein großer Dank bezüglich der tollen menschlichen Atmosphäre am Institut. Dort arbeiten war ein Genuss und wird als mein persönlicher Goldstandard für die Zukunft gelten. Besonders hervorheben möchte ich die AG Schomburg bestehend aus Mette Stoedter, Dr. Kostja Renko, Dr. Carolin Höfig, Dr. Tomas Behrends, Dr. Tobias Endermann, Dr. Peter Hofmann und Nicole Pietschmann, die vor und nach Feierabend zu jedem Spaß bereit war. Insbesondere unsere Patis-, Grill- und Videoabende oder die Teamstaffel bleiben in bester Erinnerung. Nicole Pietschmann hat als meine Nachfolgerin auf dem „Knochenprojekt“ während meiner „Besinnungsphase“ neuen Schwung in die Thematik gebracht und dadurch meine Motivation, das „Ding“ zu Ende zu bringen stark erhöht. Ohne Katja Schreiber, Sandra Müller und Carola Geiler wären die Serumproben der OPUS-Studie sicherlich nicht so schnell vermessen worden. Mein weiterer Dank gilt zudem Dr. Doreen Braun, Jazmin Chiu, Tonka Djekic, Dr. Julia Drebes, Anja Fischbach, Carola Geiler, Dr. Inka Gotthardt, Dr. Anita

Danksagung

Kinne, Antje Kretschmer, Jennifer Merz, Dr. Waldemar Minich, Dr. Susanne Piehl, Dr. Eddy Rijntjes, Dr. Stefan Roth, Dr. Ulrich Schweizer, Sandra Seeher, Vartiter Seher, Dr. Eva Wirth und Franziska Wohlgemuth, die alle immer offene Ohren und sinnvolle Hinweise bei praktischen und theoretischen Fragestellungen hatten und so die Ergebnisse dieser Arbeit erst möglich gemacht haben.

Zu guter Letzt danke ich all denjenigen Freund_innen, die zwar nicht am Institut arbeiteten, aber quasi trotzdem dabei waren. An erster Stelle wären da sicherlich meine Eltern und meine Schwester zu nennen, deren bedingungslose Unterstützung und großes Vertrauen in jeder Phase ein großer Rückhalt waren. Ohne Euch wäre es nichts geworden. Dies gilt auch für Charlotte, Katja, Christoph und Gineke, denen ich für die große Anteilnahme und das Verständnis danke, dass schon wieder „die Sache mit der Doktorarbeit“ diskutiert werden musste. Birgit und Johanna gebührt ebenfalls ein nicht zu beziffernder Dank. Gerade unsere Reisen haben meinen Kopf frei gemacht, mir neue Wirklichkeiten und Möglichkeiten offenbart und mein Leben ungemein bereichert. Ich bin froh, dass ich Euch alle habe und meine Freund_innen nennen kann.

Erklärung

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Der Einfluss von Selen und Geschlecht auf Knochenentwicklung und Knochenhomöostase“ selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel verfasst habe.

Des Weiteren erkläre ich meine Kenntnisnahme der dem angestrebten Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung. Ich versichere, dass ich diese Arbeit weder in dieser noch in einer anderen Form bei einer anderen Prüfungsbehörde eingereicht habe und dass ich nicht im Besitz eines entsprechenden Doktorgrades bin.

Berlin, den.....

Antonia Hög