

**CharitéCentrum 4 für Therapieforschung**

**Institut für Experimentelle Endokrinologie**

Direktor: Prof. Dr. Josef Köhrle

**HABILITATIONSSCHRIFT**

**Molekulare Regulation der Selenoprotein-Biosynthese  
und des Selentransports**

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach  
**BIOCHEMIE**

Vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät der  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. rer. nat. Lutz Schomburg

geboren am 22. April 1966 in Einbeck, Niedersachsen.

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

eingereicht im Januar 2007

öffentlich-wiss. Vortrag am 11.02.2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Katja Becker, Universität Gießen
2. Gutachter: Prof. Dr. Roland Gärtner, LMU München

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	
1.1	Selen, ein essentielles Spurenelement	3
1.2	Vorkommen, Verbreitung und Nachweis von Selen	5
1.3	Aufnahme, Verteilung und Stoffwechsel im Körper	8
1.4	Selenmangelerkrankungen und Selenvergiftungen	11
1.5	Selenocystein (Sec) und die Familie der Selenoproteine	15
1.6	Molekularer Mechanismus der Selenoprotein Biosynthese	18
<b>2</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	
<b>2.1</b>	<b>Biologische Bedeutung von Selenoprotein P (SePP)</b>	<b>22</b>
2.1.1	<i>Schomburg et al., Biochem J 370, 397-402, 2003</i>	22
2.1.2	<i>Schweizer et al., Biochem J 378, 21-26, 2004</i>	26
<b>2.2</b>	<b>Hierarchische Prinzipien im Selenstoffwechsel</b>	<b>29</b>
2.2.1	<i>Schomburg et al., Cell Mol Life Sci 61, 1988-1995, 2004</i>	29
2.2.2	<i>Schomburg et al., Endocrinology 147, 1306-1313, 2006</i>	32
<b>2.3</b>	<b>Molekulare Mechanismen der Selenoprotein Expression</b>	<b>35</b>
2.3.1	<i>Dumitrescu et al., Nat Genet 37, 1247-52, 2005</i>	35
2.3.2	<i>Riese et al., Endocrinology 147, 5883-5892, 2006</i>	40
2.3.3	<i>Schomburg L, Crit Care Med, 2007, in press</i>	43
<b>3</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>46</b>
<b>4</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY</b>	<b>52</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG: AUSGEWÄHLTE PUBLIKATIONEN</b>	<b>65</b>
	A) <i>Schomburg et al., Biochem J 370, 397-402, 2003</i>	66-71
	B) <i>Schweizer at al., Biochem J 378, 21-26, 2004</i>	72-77
	C) <i>Schomburg et al., Cell Mol Life Sci 61, 1988-1995, 2004</i>	78-85
	D) <i>Schomburg et al., Endocrinology 147, 1306-1313, 2006</i>	86-93
	E) <i>Dumitrescu et al., Nat Genet 37, 1247-52, 2005</i>	94-99
	F) <i>Riese et al., Endocrinology 147, 5883-5892, 2006</i>	100-109
	G) <i>Schomburg L, Crit Care Med, 2007, in press</i>	110

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Selen, ein essentielles Spurenelement

Dem Spurenelement Selen (Se) kommt in der Biologie eine herausragende Ausnahmestellung zu (Flohé et al. 2000). Es verleiht einer ganzen Familie von selenhaltigen Proteinen ihren Namen, den sog. Selenoproteinen (Burk et al. 2001). Die Position des Se-Atoms innerhalb dieser Proteine wird über den genetischen Code durch cotranslationale Insertion der 21ten proteinogenen Aminosäure Selenocystein (Sec) vorgegeben (Hatfield und Gladyshev 2002). Zum Zwecke des gezielten Einbaus während der Biosynthese von Selenoproteinen werden neben einer charakteristisch modifizierten tRNA<sup>SEC</sup> noch weitere Se-spezifische Elongationsfaktoren benötigt, und spezielle posttranskriptionale Regulationsmechanismen kontrollieren die Translationseffizienz entsprechend der Se-Verfügbarkeit (Böck et al. 1991). Se ist für die menschliche Gesundheit von außerordentlicher Bedeutung, und zwar als wichtiger Bestandteil der Ernährung, als potentiell hilfreiche Ergänzung in der Prävention und Therapie bestimmter Krankheiten, und auch als gefährliche und wohl zu dosierende Substanz mit toxikologischem Potential (Wilber 1980; Barceloux 1999). Se stellt ein essentielles Spurenelement, d.h. einen lebensnotwendigen Nahrungsbestandteil, dar (Schwarz und Foltz 1957). Entwicklung, Gehirnfunktion, Metabolismus der Schilddrüsenhormone, das Herz-Kreislaufsystem, männliche Fertilität und ein effektives Immunsystem sind direkt von einem guten Se-Status abhängig und zeigen Funktionsbeeinträchtigungen, wenn ein ausgeprägter Se-Mangel vorliegt (Rayman 2000; Brown und Arthur 2001). Die Unverzichtbarkeit von Se für die menschliche Gesundheit zeigte sich z.B. besonders deutlich bei parenteral ernährten Patienten, die im Laufe der langen künstlichen Ernährungsphase eine Muskeldystrophie entwickelten, und deren Symptome sich durch einfache Supplementation mit Se lindern ließen (van Rij et al. 1979). Heutzutage werden Se-haltige Ernährungssupplemente als fester Bestandteil von parenteralen Diäten angesehen (Foster und Sumar 1997). Aus dem Tierversuch wissen wir, dass der Verlust der Expression bestimmter Selenoproteine bzw. der Se-spezifischen tRNA<sup>SEC</sup> nicht mit dem Leben vereinbar ist (Schweizer und Schomburg 2005). Nichtsdestotrotz erscheint aber angesichts der zunehmenden und unkontrollierten Tendenz zur Selbstmedikation durch Nahrungsergänzungsmittel gerade für dieses Spurenelement die Jahrhunderte alte Erkenntnis von Paracelsus „Dosis facit venenum“ wieder hochaktuell (Köhrle et al. 2000; Neve 2002; Rayman 2002). Denn gerade Se hat in den letzten Dekaden eine außerordentliche Wandlung in der allgemeinen Wertschätzung vom Gift über ein Karzinogen zum essentiellen Spurenelement mit gesundheitsfördernden Eigenschaften durchgemacht (Abbildung 1).

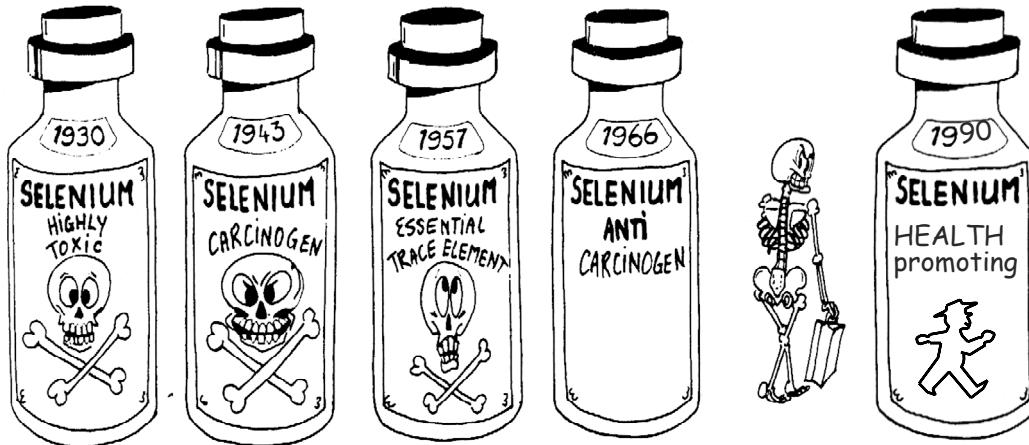


Abbildung 1: Selen (Se): Ein- und Wertschätzung von Selen im Wandel der Zeit (Schomburg und Köhrle 2007), Cartoon modifiziert nach einer Vorlage von Vernie (Vernie 1984) und Köhrle (Köhrle 1999). Se war zunächst weiten Bevölkerungskreisen nur aufgrund seiner toxischen Wirkungen bekannt und wurde ähnlich wie Arsen lediglich als hochgiftige Substanz wahrgenommen. Im Laufe des letzten Jahrhunderts änderte sich das Bild grundlegend, so dass heute eher die essentiellen, gesundheitsfördernden und potentiell chemopräventiven Eigenschaften von Se im Vordergrund stehen.

Se gehört in die VI. Hauptgruppe des Periodensystems der Elemente und weist sowohl metallische als auch nicht-metallische Eigenschaften auf. Es bildet mit Sauerstoff, Schwefel, Tellur und Polonium die Gruppe der Chalkogene (chalkos, griech., Erz; gennan, griech., erzeugen; Chalkogene, Erzbildner). Se und Tellur sind in vielen chemischen Eigenschaften ähnlich, unterscheiden sich aber deutlich in ihrer Häufigkeit (Se ist als Spurenelement um ca. 3 Größenordnungen seltener als Schwefel, Tellur wiederum ca. 10-fach seltener als Se) und den bevorzugt eingenommenen Oxidationszuständen. Schwefel und Se kommen sowohl in der anorganischen als auch der belebten Welt vergesellschaftet vor, wobei sie ähnliche Bindungen eingehen können und somit in vielen Molekülen äquivalente Positionen ausfüllen. Die Entdeckung des Se durch den schwedischen Chemiker Jöns Jakob Berzelius (1779-1848) wird auf das Jahr 1817 datiert. Da kurz zuvor der österreichische Mineraloge Franz Joseph von Reichenstein (1742-1825) das Element Tellur entdeckte (1782) und nach der Erde (lat. tellus) benannt hatte, wählte Berzelius die Mondgöttin (griech. Selene) als Namenspatronin, nicht zuletzt aufgrund des silbrig-matten Glanzes des gereinigten Elementes. Die Fortschritte in Wissenschaft und Medizin zur Biochemie des Se und der Selenoproteine haben die ernährungsphysiologische Bedeutung und das toxische Potential von Se in den letzten Jahren in den Fokus des Interesses gerückt (Köhrle und Schomburg 2006; Schomburg und Köhrle 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden Aspekte des Se-Transportes, der Bedeutung und Regulation einzelner Selenoproteine, der hierarchischen Regulation der Se-Verteilung und -Nutzung und der Kontrolle der Biosynthese von Selenoproteinen bearbeitet.

## 1.2 Vorkommen, Verbreitung und Nachweis von Selen

Während Berzelius Se als metallische Ablagerung im Bleikammerschlamm einer Schwefelsäurefabrik gefunden hatte (Foster und Sumar 1997), werden heute zur industriellen Gewinnung die Anodenschlämme von Kupfer-Raffinationselektrolysen chemisch oder durch Röstung aufbereitet. Elementares Se kommt wie Schwefel in unterschiedlichen Farben und Formen vor (rot, schwarz oder metallisch-grau, amorph, glasartig oder kristallin). Im flüssigen Zustand ist Se schwarz, der gelbliche Dampf enthält  $\text{Se}_8$ -Ringe. Die Kristalle leiten den elektrischen Strom nur schlecht, können aber durch Unregelmäßigkeiten (z.B. durch Halogenid-Dotierung) in gute Halbleiter überführt werden. Das metallisch-graue Selen zeichnet sich durch eine lichtabhängige Leitfähigkeit aus, d.h., je stärker es bestrahlt wird, desto geringer ist der elektrische Widerstand (bereits 1873 durch W. Smith beschrieben). Diese bemerkenswerte Eigenschaft wird für die Herstellung von Se-Gleichrichtern oder Se-Photoelementen genutzt. In der Metallindustrie wird Se als Legierungsbestandteil (ca. 0,25%) den Automatenstählen und Kupferlegierungen beigelegt, in der chemischen Industrie oder für die Glas- und Keramikherstellung wird Se als Pigmentfarbstoff oder Entfärbemittel eingesetzt, und in der Kunststoffchemie beschleunigt es als Selenac (Selen-diethyl-dithiocarbamat) die Vulkanisierungsprozesse. In US-amerikanischen Haushalten wird es als 2-4%ige selenige Säure auch für die Gewehrreinigung genutzt („Gun blueing solution“).

Sechs stabile Isotope von Se kommen natürlicherweise vor, mindestens sieben weitere können durch Neutronen-Aktivierung dargestellt werden. Von diesen werden  $^{75}\text{Se}$ ,  $^{77\text{m}}\text{Se}$  und  $^{81}\text{Se}$  für quantitative Bestimmungen genutzt,  $^{75}\text{Se}$  wird überdies gerne in der Biochemie für die Analyse des Selen-Stoffwechsels und der Selenoproteine eingesetzt.

Se kommt in der Natur ubiquitär dort vor, wo auch Schwefel anzutreffen ist. In der Erdkruste ist es mit ca. 0,05 ppm bis 0,09 ppm seltener als Silber, und nur unwesentlich häufiger als Gold. Se findet sich in Mineralien, Steinen, Vulkan- und Mondproben, fossilen Brennstoffen, in Binnenseen und Ozeanen, in allen Erdreichen, Pflanzen und tierischen Geweben, allerdings unterscheiden sich die relativen Konzentrationen drastisch. Die Weltmeere weisen im Schnitt nur eine Konzentration von 2 nmol/L (0,1 bis 0,15 ppb) auf, jedoch sind bestimmte Bereiche, z.B. die hydrothermalen Quellen („Schwarze Raucher“) 50- bis 100-fach selenreicher (Rathgeber et al. 2002). Die Verbrennung fossiler Energieträger und vulkanische Aktivitäten sind Hauptquellen für Se-Eintragen in die Atmosphäre als Flugaschenbestandteil. In bodennaher Luft sind Se-Gehalte von 0,1 ng bis 10 ng  $\text{Se}/\text{m}^3$  normal, an Eintragungsorten können die lokalen Konzentrationen aber auch auf 500 ng  $\text{Se}/\text{m}^3$  ansteigen (Shamberger 1981). In Rohöl sind die Se-Gehalte sehr variabel, je nach Quellregion. In Petroleum wurden

Gehalte von 0,5 mg bis 1,65 mg Se/kg ermittelt, selbst in den Abwässern aus amerikanischen Ölraffinerien werden noch Gehalte von 0,16 mg Se/L bestimmt (Barceloux 1999). In Binnenseen können Werte von 25 µg Se/L bereits dazu führen, dass die Population größerer Fische (z.B. Barsche) halbiert wird (Crane et al. 1992).

Es gibt Se-anreichernde und Se-arme Pflanzen (Kabata-Pendias 1998). Generell unterscheidet sich der Se-Gehalt von Pflanzen drastisch zwischen verschiedenen Anbaugebieten, spiegelt dabei aber nicht nur den Gehalt des entsprechenden Erdreichs wider, sondern stellt auch eine Pflanzenart-typische Größe dar (Hartfiel und Bahners 1988). In Amerika schwankt der Se-Gehalt der meisten Böden zwischen 0,1 ppm und 2 ppm (Fishbein 1983), kann aber in Se-reichen Gebieten von South Dakota, Montana, Wyoming, Nebraska, Kansas, Utah, Colorado oder Neu Mexiko Spitzenwerte von über 100 ppm erreichen (Jackson 1988). Se-akkumulierende Pflanzen erreichen Se-Gehalte von über 100 mg Se/kg Pflanzenmasse und setzen sich in Se-belasteten Böden gegen Se-sensitive Pflanzen durch (Huang und Wu 1991). Hierbei speichern die akkumulierenden Pflanzen Se in Form von nicht-proteinogenen Aminosäure-Derivaten (Methylselenocystein, Selenocystathion, o.ä.) (Terry et al. 2000), während sonst in Pflanzen die aufgenommenen Se-Salze hauptsächlich in Selenomethionin (SeMet) überführt und bei der Proteinbiosynthese genutzt werden (Schrauzer 2000). Indirekt bestimmt somit der Se-Gehalt des Bodens den Se-Gehalt der Nutzpflanzen und damit den Se-Status der Nutztiere und Menschen in den entsprechenden Regionen (Abbildung 2).

<b>Land</b>	<b>tägliche Aufnahme</b>	<b>Konzentration in Serum oder Plasma</b>
Tibet	5-15 µg	5-25 µg/L
Finnland, vor 1984*	12-23 µg	25-70 µg/L
Neuseeland	19-80 µg	46-80 µg/L
Schottland, England	31-43 µg	50-80 µg/L
Deutschland	38-47 µg	89-98 µg/L
Finnland, seit 1986*	69-82 µg	43-119 µg/L
U.S.A.	60-160 µg	100-350 µg/L
Kanada	113-220 µg	143 µg/L
Japan	128 µg	146 µg/L
China**	2-6990 µg	8-7800 µg/L

\*Finnland begann 1984, den Mineräldüngern für die Landwirtschaft Selen als Natrium-Selenat zuzusetzen.

\*\*Aufgrund seiner enormen Größe und geologischen Gegebenheiten finden sich in China sowohl extrem Selen-reiche als auch Selen-arme Regionen mit entsprechenden Auswirkungen auf Selen-Aufnahme und -Status.

Abbildung 2: Se-Aufnahme und Se-Status in Abhängigkeit vom Wohnort (Schomburg und Köhrle 2007). Die tägliche Aufnahme des essentiellen Spurenelements Se und die Se-Konzentration im Blut sind entscheidend von dem Se-Gehalt der landwirtschaftlichen Nutzflächen abhängig und schwanken beträchtlich in unterschiedlichen Ländern. In einigen Regionen Zentralasiens und Europas werden täglich nur sehr geringe Se-Mengen aufgenommen, so dass entsprechende Supplementationsprogramme in z.B. Finnland und der Keshan-Region in China initiiert wurden und eine dauerhafte Verbesserung des Se-Status der Bewohner bewirkten.

Ein qualitativer Nachweis von Se wird aufgrund der ubiquitären Verbreitung heutzutage nur noch in Ausnahmefällen durchgeführt. Als Schnelltest, z.B. beim Verdacht einer Se-Vergiftung, kann eine auf Gaschromatographie beruhende Atemluftanalyse mit nachfolgender elementspezifischer Detektion als qualitativer Nachweis sinnvoll sein (Uden et al. 2004). Für empfindliche und quantitative Bestimmungen von Se werden spektroskopische Methoden oder Neutronen-Aktivierungsanalysen durchgeführt (Fishbein 1984). Hier kann grundsätzlich zwischen der Se-Gesamtbestimmung einer Probe unabhängig von der Art der Se-haltigen Moleküle oder spezifizierend unter Berücksichtigung der chemischen Form bzw. der Oxidationsstufe von Se in den Verbindungen unterschieden werden (Capon und Smith 1981). Erstere, also die Gesamt-Se-Gehaltsbestimmung, kann mit einer Totalhydrolyse des Analyten bzw. der Mineralisierung der Matrix begonnen werden. Durch eine Atomabsorptions-Spektroskopie (AAS) erfolgt dann die elementspezifische quantitative Analyse. In der Routine haben sich die Graphitrohr-AAS (GFAAS) und die Hydrid-AAS (HGAAS) durchgesetzt (Pyrzynska 1998). Für eine HGAAS wird Se quantitativ mit Natriumborhydrid in flüchtigen Se-Wasserstoff überführt und im Strahlengang des AAS thermisch zersetzt (Nachweisgrenze: 0,1-1 µg Se/L). Für die Neutronenaktivierungsanalyse (NAA) ist keine besondere Probenvorbereitung nötig. Sie erlaubt überdies die gleichzeitige Bestimmung anderer Spuren- und Massenelemente und kann simultan bis zu 30 einzelne Elemente nach einer einmaligen Neutronenbestrahlung erfassen. Allerdings eignet sich die NAA nur bedingt für Routineanalysen, da die Durchführung der Analyse sehr zeitaufwendig und auf die Verfügbarkeit einer geeigneten Neutronen-Strahlungsquelle angewiesen ist. Alternativ und mit deutlich geringerem Aufwand können auch photometrische oder fluorimetrische Se-Bestimmungen durchgeführt werden. Hier macht man sich die spektroskopischen Eigenschaften von Piazselenolen (Komplexe aus Se IV und ortho-Diaminen) zunutze. Verbreitet für die Analyse biologischer Proben (Vollblut, Plasma, Urin, Gewebe, etc.) ist die fluorimetrische Bestimmung von Se-Diaminonaphtalin-Komplexen. Hierzu wird das Material zunächst in einer konzentrierten Säuremischung hydrolysiert, danach wird durch konzentrierte Salzsäure Se quantitativ in Se IV überführt. 2,3-Di-Aminonaphtalin (DAN) wird in wässriger Lösung zugesetzt, bildet mit Se IV die Piazselenol-Komplexe und kann dann nach Überführung in eine organische Phase spezifisch und quantitativ über die Fluoreszenzintensität bestimmt werden (Sheehan und Gao 1990). Bei diesen Analysen können inter-Assay Varianzen von <5% und intra-Assay Varianzen von <6% erzielt werden (Schweizer et al. 2004). Als weitere Se-Bestimmungsmethoden werden noch die Massenspektrometrie (MS) oder die Atomemissionsspektrometrie (AES) nach Anregung

durch induktiv gekoppeltes Plasma (ICP) angewendet. Hierbei werden die Se-Atome durch so hohe thermische Energien angeregt, dass sie charakteristische Strahlung und Elektronen abgeben (ICP-AES) bzw. danach als Ion nach Masse aufgetrennt und als Impuls gezählt werden können (ICP-MS). In den hier vorgestellten Studien wurden zur Bestimmung der Se-Konzentration bzw. des Se-Status die Quantifizierung über fluorimetrische Analyse des Se-Gehaltes von Serum, Gewebehomogenaten oder Zellkulturmedium durchgeführt, die Aktivitäten von Se-abhängigen Enzymen gemessen bzw. ein Assay zur Antikörper-vermittelten Quantifizierung der Selenoprotein P (SePP) Konzentration aufgebaut.

### **1.3 Aufnahme, Verteilung und Stoffwechsel im Körper**

Der Mensch nimmt Se überwiegend mit der festen Nahrung auf und akkumuliert insgesamt je nach Lebensraum und Ernährungsgewohnheit 3-20 mg dieses Spurenelementes (Fan et al. 1988). Der Se-Gehalt von Trinkwasser liegt im ppb-Bereich und darf nach der deutschen Trinkwasserverordnung den Grenzwert von 0,01 mg Se/L nicht überschreiten, d.h., der mittlere Tagesbedarf eines Erwachsenen (ca. 1 µg/kg Körpergewicht) kann selbst bei einer Trinkwasserzufuhr von 3 L/Tag nicht erreicht werden. Der Se-Gehalt in sowohl pflanzlicher als auch tierischer Nahrung ist starken Schwankungen unterworfen und hängt bei den Pflanzen von deren Düngung und der bioverfügbaren Se-Menge im Boden ab, bei den Tieren von der Ernährungszusammensetzung, dem Einsatz von Mineral- und Vitaminsupplementen, vom Se-Gehalt des Futters und damit indirekt wiederum von der Qualität des Bodens im Futteranbaubereich. Nahrungsergänzungsmittel nutzen entweder SeMet oder Natrium-Selenit bzw. Natrium-Selenat als Spurenelementquelle, Se-reiche Hefe enthält neben SeMet noch eine Vielzahl unterschiedlicher Se-haltiger Komponenten und kann Konzentrationen von 1 bis 2 mg/g Trockengewicht erreichen (Schrauzer 2000).

Die Aufnahme von Se in den menschlichen Körper ist abhängig von der chemischen Verbindung. Elementares Se, Selendioxid und Selensulfid werden nur schlecht, Selenit, Selenat oder die Se-haltigen Aminosäurederivate werden generell gut aufgenommen und verwertet (Leblondel et al. 2001). Die Aufnahme erfolgt überwiegend im Zwölffinger- und Dünndarm und scheint, anders als bei anderen Spurenelementen, unabhängig vom Se-Status des Konsumenten zu sein (Wolffram 1995). Mit vergleichbarer Effizienz (70-95%) werden anorganische (Selenit, Selenat) und biologische (Se-haltige Aminosäuren und deren Derivate) Se-Verbindungen resorbiert, wobei allerdings unterschiedliche Aufnahmemechanismen genutzt werden. Selenat wird über einen Na<sup>+</sup>-Cotransporter oder ein OH<sup>-</sup>-Antiportsystem akkumuliert, Selenit über einem Na<sup>+</sup>-unabhängigen passiven Transportweg und die Se-



haltigen Aminosäuren werden analog zu den schwefelhaltigen Aminosäuren über spezialisierte  $\text{Na}^+$ -abhängige Aminosäure-Carriersysteme aufgenommen. Für den weiteren Weg von Se über das Zytosol in die Blutbahn liegen nur teilweise gesicherte Detailkenntnisse vor (Kato et al. 1992). Selenat-Ionen und SeMet können weitgehend unverändert in die Zirkulation gelangen, während Selenit intrazellulär intensiv metabolisiert wird (Whanger et al. 1996). Sec bzw. Selenocystin erscheinen nur in geringen Konzentrationen unverändert im Blutplasma, der Großteil gelangt nach einer Konjugation mit Gluthation als gemischtes Disulfid zur Leber, wo es aufgenommen und weiter metabolisiert wird (Hasegawa et al. 1995).

Menschliche Zellen können grundsätzlich drei Arten von Se-haltigen Proteinen synthetisieren, deren relative Mengen von der Form des mit der Nahrung aufgenommenen Se abhängen (Abbildung 3). SeMet wird von der Methionin-spezifischen Aminoacyl-tRNA Synthetase als Substrat erkannt und über die Methionyl-tRNA wie die essentielle Aminosäure Methionin bei den entsprechenden Methionin-Kodons (AUG) in die wachsende Peptidkette in stöchiometrischem Verhältnis eingebaut. Hierbei unterscheidet die eukaryontische Synthesemaschinerie, also die Aminoacyl-tRNA Synthetase, die Ribosomen, Elongationsfaktoren usw., nicht zwischen Schwefel- und Se-haltigem Methionin (Daniels 1996). Dies führt dazu, dass bei hoher Aufnahme auch der relative Gehalt von SeMet in neu synthetisierten Proteinen, wie z.B. im Albumin des Plasmas, deutlich ansteigt (Burk et al. 2001). Hierdurch werden dann vermehrt SeMet-haltige Proteine synthetisiert, denen aber keine besondere biologische Bedeutung beigemessen wird. Sec hingegen wird in einem Sec-spezifischen Prozess in eine kleine und genau definierte Anzahl unterschiedlicher Proteine an exakt definierten Positionen inseriert (siehe unten). Diese Sec-haltigen Proteine stellen die Gruppe der eigentlichen Selenoproteine dar und werden nur durch wenige Gene kodiert (25 im Menschen, 24 im Nager, 3 in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*) (Kryukov et al. 2003). Die biologischen Aktivitäten einiger Selenoproteine sind essentiell und werden für (fast) alle biochemischen und physiologischen Wirkungen von Se auf die Zelle und den Organismus verantwortlich gemacht. Bei den bisher gut charakterisierten, enzymatisch aktiven Selenoproteinen stellt der Sec-Rest einen zentralen Bestandteil des aktiven Zentrums dar und partizipiert über Änderungen der Koordination und Ladung des Se-Atoms direkt an Redox-Reaktionen (Jacob et al. 2003). Zusätzlich gibt es noch eine bislang nur wenig charakterisierte Gruppe von sog. Se-bindenden Proteinen, die durch Se-Markierungsversuche gefunden wurden, deren genaue Funktion im Metabolismus des Spurenelementes aber noch weitgehend unbekannt ist (Bansal et al. 1990).

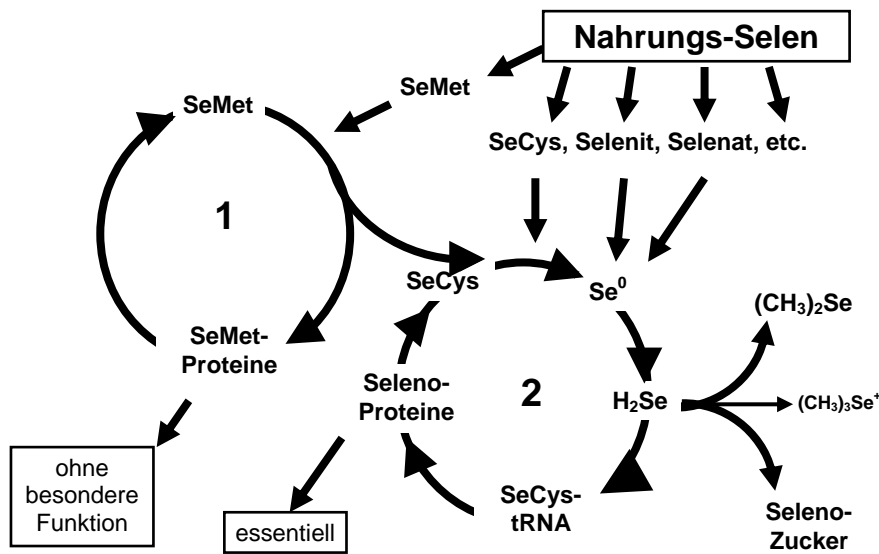


Abbildung 3: Metabolismus Se-haltiger Nahrungsbestandteile (Schomburg und Köhrle 2007). Pflanzliche Se-Quellen enthalten überwiegend SeMet, welches direkt für die Proteinbiosynthese genutzt werden kann, und wiederum SeMet-haltige Proteine generiert (1, SeMet-Zyklus). Alternativ wird Se aus SeMet oder den anderen Se-Quellen freigesetzt und in den Stoffwechsel der Sec-haltigen Proteine (2, Selenoprotein-Zyklus) überführt. Durch fein abgestimmte Reaktionen erfolgt über elementares  $\text{Se}^0$  und Se-Wasserstoff als Zwischenstufen der Aufbau von Sec-beladener tRNA<sup>SEC</sup> (SeCys-tRNA) als Substrat für die Selenoprotein-Biosynthese. Überschüssiges Se erscheint als Seleno-Zucker im Urin, wird nach Methylierung als Dimethylselenid abgeatmet oder als Trimethylselenonium Ion ausgeschieden. Ob die Seleno-Zucker zum Recycling des Se genutzt werden können, ist zurzeit umstritten (Burk et al. 2006; Suzuki et al. 2006).

Die Exkretion von Se kann über die Lungen durch die Atemluft oder über die Niere durch den Urin erfolgen. Hierzu wird, gerade bei übermäßigem Se-Angebot, wie es meist in experimentellen Studien, bei übermäßiger Supplementation oder bei akuten Intoxikationen der Fall ist, Se methyliert und als flüchtiges Dimethylselenid ausgeatmet (Hassoun et al. 1995) bzw. als Trimethylselenonium Ion im Urin ausgeschieden (Nahapetian et al. 1983). Diese Prozesse sind insofern für den charakteristischen unangenehmen Geruch der Atemluft nach Se-Intoxikationen verantwortlich. Bei normaler Se-Versorgungslage überwiegt im Urin als Hauptselenausscheidungsprodukt ein seleniertes Zuckerderivat, i.e. 1-beta-Methylseleno-N-Acetyl-D-Galaktosamin bzw. die Vorstufe, ein Glutathion-Seleno-N-Acetyl-D-Galaktosamin (Kobayashi et al. 2002). Es gibt einerseits Hinweise, dass diese Zucker reine Ausscheidungsprodukte darstellen (Burk et al. 2006), andererseits konnte aber auch ein Recycling des enthaltenen Se nachgewiesen werden (Suzuki et al. 2006). Somit ist die Wiederverwertbarkeit dieser Se-haltigen Zuckerderivate noch umstritten.

#### 1.4 Selenmangelkrankungen, Selenvergiftungen

Für Se sind sowohl Vergiftungen als auch durch einen Mangel bedingte Pathologien bekannt, jedoch ist das Auftreten Se-spezifischer Erkrankungen sehr selten. Die Regionen der Welt, in denen ein extremer Se-Mangel spezifische Krankheiten begünstigt, wie in ländlichen Gebieten Chinas oder Tibets, werden durch geeignete Supplementationsansätze seltener und kleiner (Alfthan et al. 2000). Versehentliche Vergiftungen mit Se-haltigen Präparaten, Supplementen oder Se-reichen Speisen kommen aufgrund des per se schlechten Rufes der Gefährlichkeit von Se kaum vor (Tinggi 2003). Die Symptome einer Se-Vergiftung oder Selenose sind aus dem Nutztierbereich gut bekannt und ähneln den menschlichen Symptomen (Koller und Exon 1986). Die vermutlich erste Beschreibung stammt aus dem 13ten Jahrhundert von Marco Polo, der bei seinen Lasttieren nach dem Verzehr ihnen unbekannter, asiatischer, vermutlich Se-akkumulierender Pflanzen Übelkeit, Hufaufweichung und Haarverlust beobachtete. Ähnliche Symptome kennt man seit dem Beginn des letzten Jahrhunderts auch bei Rindern, Schafen, Schweinen oder Pferden, die je nach Spezies und Region als Alkali- oder Taumelkrankheit (alkali disease, blind staggers) bezeichnet werden (Raisbeck 2000). Allerdings ist fraglich, ob die neurologischen Ausfälle direkt auf eine Selenose zurückzuführen sind (O'Toole und Raisbeck 1995). Beim Menschen sind Se-Vergiftungen sehr selten und meist auf Einzelfälle beschränkt (Wilber 1980). In China gab es 1961-1964 eine systematische Vergiftung der Bevölkerung (248 Opfer) in 5 kleinen Dörfern, die einen Se-reichen Kohlenkalk als Dünger auf ihre Böden brachten und damit ihre Nahrungskette übermäßig mit Se anreicherten (Yang et al. 1983). In Indien gab es einen Gasunfall mit Se-Wasserstoff (Banerjee et al. 1997). Ein einzelner Bericht beschreibt eine reversible Se-Vergiftung nach einem 14 Tage dauernden Konsum von Se-haltigen Tabletten als Nahrungsergänzungsmittel (Clark et al. 1996). Ein Herstellungsirrtum für ein Se-Supplement, der in einer 182-fach höheren Konzentration als angegeben resultierte, führte innerhalb weniger Wochen zu vorübergehenden Vergiftungserscheinungen in den USA (Helzlsouer et al. 1985). Häufiger sind Fälle von versuchter Selbsttötung durch Verschlucken Se-haltiger Lösungen, wie z.B. von Se-Salzen, Se-Präparationen aus dem chemischen Labor oder Se-haltigen Gewehrreinigungs-Lösungen (Gasmi et al. 1997; Quadrani et al. 2000; Lech 2002; Kise et al. 2004). Die akuten Symptome stimmen in den Berichten weitgehend überein und äußern sich durch Atembeschwerden, gastrointestinale Verätzung, deutlich nach Knoblauch bzw. faulem Rettich riechende Atemluft, Rotpigmentierung von Haar und Haut, kardiovaskuläre Dysrhythmie und Blutdruckabfall mit potentiell fataler Konsequenz

(Barceloux 1999). Neben dem Se-Mangel, der Se-Vergiftung und der supplement-bedingten Überversorgung gibt es einen klinischen Umstand, nämlich die Schwermetallvergiftung, in der eine einmalige therapeutische Gabe von einer vergleichsweise hohen Se-Dosis zur akuten Therapie diskutiert wird. Das zugeführte Se bildet mit Schwermetallen wie Quecksilber- oder Cadmium-Ionen schwerlösliche Selenid-Komplexe, die in Organen wie Niere oder Hypophyse akkumulieren (Tubbs et al. 1982) und damit als biologisch inaktive Formen abgelagert werden können (Hansen 1988). Langzeitbeobachtungen, fundierte Dosierungsempfehlungen oder klinische Erfahrungen gibt es für dieses Vorgehen aber nicht, insofern sollte es zurzeit als eher theoretische Option betrachtet werden.

Für wenige spezifische Krankheitsbilder des Menschen konnte ein Se-Mangel definitiv als Mitursache erkannt werden, für viele Erkrankungen mit multifaktorieller Genese erscheint der Se-Status aber als wichtiger Prädispositionsparameter. Bei den folgenden drei Pathologien ist ein Se-Mangel von kausaler Bedeutung; hier haben sich Se-Supplementationen zweifelsfrei als effektive Präventionsmaßnahmen erwiesen:

- Die Keshan Krankheit beschreibt eine Kardiomyopathie, die in den Se-armen Gebieten Chinas gerade bei werdenden und stillenden Müttern und ihren Kindern endemisch auftreten kann (Ge et al. 1983). Neben einem manifesten Se-Mangel als Voraussetzung wird als Kofaktor für den Ausbruch der Krankheit eine zusätzliche Infektion mit Coxsackie-Viren angenommen (Beck et al. 2003). Entsprechende Versuche mit Se-armen Nagern legen nahe, dass durch den Se-Mangel das Immunsystem geschwächt wird und die Konzentration von reaktiven Sauerstoff-Spezies und damit die Mutationsrate der Viren erhöht sind (Beck et al. 2003). Die minimal nötige Se-Aufnahme, die in diesen Gebieten den Ausbruch der Krankheit verhindert, wird als Möglichkeit zur Bestimmung eines Referenzwertes für die Mindestversorgung diskutiert (Thomson 2004).

- Der Myxödematöse Kretinismus ist ein schweres Krankheitsbild, bei dem sowohl die körperliche als auch die geistige Entwicklung stark beeinträchtigt sind. Hier liegt neben dem Se-Mangel eine Jodmangelversorgung mit starker Strumaausprägung und entsprechend reduzierten Schilddrüsenhormonkonzentrationen, gerade während der Entwicklungsphase, zugrunde (Zimmermann und Köhrle 2002). Der Se-Mangel dürfte hierbei sowohl die Biosynthese der Schilddrüsenhormone, deren Metabolismus, das Immunsystem als auch den enzymatischen Schutz gegen Sauerstoffradikale beeinträchtigen (Contempre et al. 2004). Eine zusätzliche Belastung der Schilddrüsenfunktion durch strumigene Thiozyanat-Ionen, wie sie z.B. in der Cassava-Pflanze vorkommen, wird als dritter Risikofaktor angesehen (Contempre et al. 1991). Eine präventive oder therapeutische Se-Supplementation muss bei diesen

Patienten unbedingt mit einer Verbesserung der Jodversorgung kombiniert werden, denn nur so kann die Funktion der Schilddrüse sichergestellt werden (Vanderpas et al. 1993).

- Die Ursachen der Kashin-Beck Krankheit, einer dystrophischen Osteoarthrose, sind weit weniger gut aufgeklärt (Allander 1994). Diese Krankheit trifft wiederum in erster Linie eine schlecht ernährte Landbevölkerung in Tibet, Sibirien oder China. Neben einem ausgeprägten Se-Mangel werden hier zusätzlich wiederum eine Unterversorgung mit Jod, eine schlechte Trinkwasserqualität mit organischen Verunreinigungen wie Fulvinsäure und eine durch Schimmelpilze verursachte Mykotoxin-Belastung der Getreideprodukte gesehen (Sudre und Mathieu 2001). Therapeutisch und präventiv wertvoll erscheint auch hier wiederum nur eine kombinierte Supplementation mit Jod und Se (Moreno-Reyes et al. 2003).

Inzwischen wird versucht, molekulare Ursachen dieser Se-abhängigen Pathologien durch geeignete transgene Tiermodelle zu definieren (Schweizer und Schomburg 2005). So gelang es z.B. durch die gewebespezifische Inaktivierung der mitochondrialen Thioredoxin-Reduktase (TrxR2) den kardialen Phänotyp der Keshan-Krankheit ansatzweise nachzustellen (Conrad et al. 2004). Ebenso steht das Studium der Auswirkungen von Selenoprotein-Mangel auf die Gehirnfunktion und männliche Fertilität im Zentrum von transgenen Tiermodellen (Abbildung 4). Hierbei hat sich besonders das im Labor von Prof. Dr. Dolph Hatfield, NIH, Bethesda, USA, entwickelte konditionale Modell für die Deletion der Sec-spezifischen tRNA<sup>SEC</sup> (Trsp) als sehr vorteilhaft erwiesen (Carlson et al. 2004).

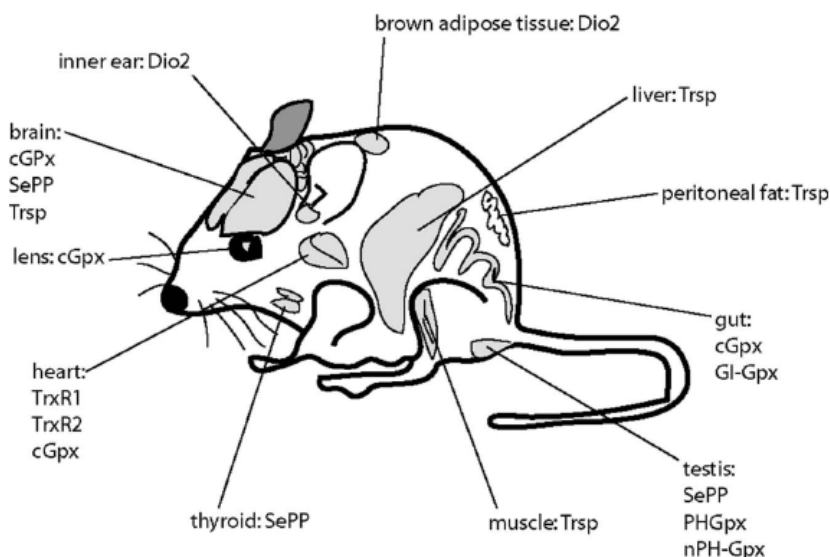


Abbildung 4: Schematische Darstellung von transgenen Mausmodellen zur Analyse der Bedeutung von Selenoproteinen in vivo (Schweizer und Schomburg 2005). Neben der ubiquitären Deletierung spezifischer Selenoprotein-Gene wurden für organspezifische Aspekte oft die gezielte Inaktivierung der Sec-spezifischen tRNA<sup>SEC</sup> (Trsp) und damit aller Selenoproteine durchgeführt. Die Anzahl entsprechender Modelle steigt zurzeit rasch, eine Übersicht der Abkürzungen gibt Abbildung 5.

Die drei oben beschriebenen Pathologien verdeutlichen, dass selbst bei starkem Se-Mangel zusätzliche Faktoren hinzukommen müssen, um eine Ausprägung klinischer Symptome in einem ansonsten gesunden Individuum zu bewirken. Daneben gibt es eine Reihe gut definierter klinischer Konstellationen, in denen sich durch unausgewogene Ernährung (parenteral, Phenylketonurie-abgestimmt oder Protein-arm), angeborene, akute oder chronische Störungen des Magen-Darm-Traktes (Kurzdarmsyndrom, extensive Diarrhoe oder Morbus Crohn) oder durch manifeste Erkrankungen (Dialysepflicht, Cystische Fibrose, AIDS) ein Se-Mangel einstellen kann (Köhrle und Schomburg 2006). Heutzutage wird deshalb davon ausgegangen, dass eine isolierte Se-Unterversorgung nicht zwingend eine Krankheit auslöst, dass sich aber bei bestimmten Erkrankungen ein Se-Mangel entwickeln kann, der das Krankheitsbild negativ beeinflusst. Entsprechend gibt es schon eine beachtliche Liste von Plazebo-kontrollierten Se-Supplementationsstudien, die einen ersten Eindruck des medizinischen Potentials einer gezielten Se-Statuskontrolle vermitteln und die Bedeutung dieses Parameters für den Krankheitsverlauf andeuten (Abbildung 5).

Studie, Selenform, Menge/Dauer	Studienziel	Ergebnis
NPC-Trial, 200 µg Selenhefe/Tag, (Nutritional Prevention of Cancer)	nicht-Melanom-Hautkrebs-Rezidive	Reduktion von Prostata-, Darm- und Lungen-Krebs um bis zu 50% nach 4.5 Jahren*
HCC Prevention Trials, wie oben (NPC) (hepatocellular. carcinoma)	Leberzellkarzinom (Hepatitis-B Träger)	Verringerung der Leberzellkarzinome um 35% in der Beobachtungsperiode von 6 Jahren
Autoimmun-Thyreoiditis Behandlung, 200 µg Na-Selenit bzw. Se-Methionin/Tag	TPO- und Tg-Auto-Antikörper Belastung	Deutliche Abnahme der Antikörpertiter nach einer Behandlung von 3 bzw. 9 Monaten
Polyomyelitis-Virus Infektionsstudie, 50-100 µg Na-Selenit/Tag, 15 Wochen	Immunantwort, Virus-Titer	Verbesserung der Interferon-gamma Antwort, T-Zellvermehrung und Elimination der Viren
Sepsis-, SIRS-Behandlung, Na-Selenit, variable Dosierung über 8-14 Tage	Organversagen, Überleben	Erhöhte Überlebensrate, Verringerung von Komplikationen und der Intensiv-Behandlung
Fertilitätsstudie, 100 µg Selenhefe/Tag, 3 Monate bei subfertilen Männern	Spermien-Qualität und erfolgreiche Vaterschaft	Spermienmotilität verbessert, erfolgreiche Vaterschaft in 11% der Behandelten**
Zentralnervöse Funktionen, Selenhefe, Se-Methionin oder Na-Selenit, variabel	Depression, Epilepsie, kognitive Degeneration	Positive Effekte bei Patienten mit geringen Ausgangswerten, oft aber auch keine Wirkung

\*Studie umstritten, da primäres Studienziel unverändert; \*\*Studie umstritten, da zu geringe Anzahl von Teilnehmern.

Abbildung 5: Selektive Übersicht bereits erfolgter Plazebo-kontrollierter Se-Supplementationsstudien mit jeweiligem primärem Studienziel und Ergebnis. Generell wurden in keiner dieser Studien negative Nebenwirkungen berichtet, sekundäre Auswertungen belegen in fast allen diesen Untersuchungen, dass die Effekte in den Subgruppen mit initial geringen Se-Werten am deutlichsten ausfielen. Umfangreiche Folgestudien wurden bereits für die meisten dieser Effekte initiiert.

Für viele Volkskrankheiten (Krebs, Demenz, Arteriosklerose, Autoimmunerkrankung, Infektion, Sepsis, AIDS usw.) ergeben sich gute Korrelationen zwischen Prädisposition und

Prognose mit dem Se-Status (Constans et al. 1998; Gärtner et al. 2001; Sher 2001; Sole und Jeejeebhoy 2002; Beck et al. 2003; Davis und Uthus 2004; Prummel et al. 2004). Aus diesem Grund wird Se von manchen Wissenschaftlern und Ernährungsexperten bereits in die Gruppe der funktionellen Ernährungsstoffe, also der pharmakologisch aktiven Nahrungsbestandteile mit nützlichen Wirkungen, den sog. Nutraceuticals, eingeordnet (Neve 2002). Ein Se-Mangel sollte durch ausgewogene Ernährung bzw. eine geeignete Spezialdiät bei Risiko-Patienten verhindert werden. Die potentiellen Gefahren einer selbstgewählten und eigendosierten Supplementation sind aber zurzeit noch unabsehbar, und ein toxisches Potential von Se ist offensichtlich (Schomburg und Köhrle 2007).

### **1.5 Selenocystein (Sec) und die Familie der Selenoproteine**

Im Säugerorganismus gibt es drei Arten von Se-haltigen Proteinen: Se-bindende Proteine, deren Bedeutung und biochemische Funktionen noch kaum aufgeklärt sind, SeMet-haltige Proteine, denen vermutlich keine besondere Funktion durch die Gegenwart des Spurenelementes verliehen wird, und die Gruppe der "echten" Sec-haltigen Selenoproteine, von denen die meisten bis dato charakterisierten Vertreter an der Katalyse von Redox-Reaktionen beteiligt sind, bei denen sich das Se-Atom als zentral für die enzymatische Funktion erwiesen hat (Schomburg et al. 2004). Die Biosynthese dieser Proteine zeichnet sich dadurch aus, dass während der Translation die 21te proteinogene Aminosäure Sec inseriert wird (Böck et al. 1991; Birringer et al. 2002; Hatfield und Gladyshev 2002). Dieser Prozess ist in vielerlei Hinsicht einzigartig (siehe hierzu auch Kapitel 1.6: Molekulare Mechanismen der Biosynthese von Selenoproteinen), z.B. dadurch, dass hierbei die Position eines Spurenelementes in den Proteinmolekülen durch den genetischen Code exakt spezifiziert wird. Im Gegensatz zu den anderen proteinogenen Aminosäuren wird Sec nicht durch eine Sec-spezifische Aminoacyl-Transferase auf die zuständige tRNA<sup>SEC</sup> geladen, sondern eine bereits mit einem Seryl-Rest beladenen tRNA<sup>SEC</sup> wird als Matrix genutzt, um durch den Austausch der Hydroxyl-Gruppe des bereits gebundenen Aminosäurerestes gegen eine Selenol-Gruppe die proteinogene Sec-beladenen tRNA<sup>SEC</sup> zu generieren, die dann zur Biosynthese eines Selenoproteins genutzt werden kann.

Die Gruppe der Selenoproteine wird im Menschen von 25 Genen kodiert (Kryukov et al. 2003), von denen viele noch ohne definierte biologische Bedeutung sind (Abbildung 6). Zu den gut charakterisierten Selenoproteinen gehören die Mitglieder der Familie der Glutathion-Peroxidasen (GPx), die schon 1973 als erste Selenoproteine des Säugers identifiziert werden konnten (Flohé et al. 1973). Diese Enzyme katalysieren den Glutathion-abhängigen Abbau

von Peroxiden und verringern damit den Tonus von reaktiven Sauerstoffspezies, welche sonst nach Überführung in Sauerstoffradikale unspezifische Schäden an Membranen, Proteinen oder der DNA verursachen können (Ursini et al. 1995; Arthur 2000). Die Mitglieder unterscheiden sich generell in der gewebespezifischen Regulation ihrer Expression, den enzymchemischen Charakteristika wie Substratpräferenz und Reaktionskonstanten und ihrer Lokalisation (Brigelius-Flohé 1999). Zusätzlich findet sich mit der PH-GPx (GPx-4) in dieser Familie ein Enzym, welches neben der GPx-Aktivität noch weitere definierte biologische Funktionen ausübt (sog. moonlighting Aktivitäten). Hierzu zählen bei der PH-GPx noch Reaktionen im Eicosanoidstoffwechsel (Kühn und Borchert 2002) und strukturgebende Eigenschaften nach erfolgter Polymerisation im Spermium (Ursini et al. 1999).

Selenoprotein (Familie)	Abkürzung	Funktion(-en)
<u>Glutathion-Peroxidasen (GPx):</u>		
zelluläre GPx	cGPx, GPx-1	Abbau von Peroxiden im Zytosol der Zellen aller Organe
gastrointestinale GPx	GI-GPx, GPx-2	Abbau von Peroxiden im Magen-Darm-Trakt
plasma GPx	pGPx, GPx-3	Abbau von Peroxiden im Blut
Phospholipid-Hydroperoxid GPx	PH-GPx, GPx-4	Abbau von Membran-Peroxiden, Eicosanoidstoffwechsel
Riechepithel-GPx	GPx-6	Peroxid-Abbau im Embryo und im Riechepithel
<u>Thioredoxin-Reduktasen (TrxR):</u>		
zytosolische TrxR	TrxR1	Bestandteil des zytosolischen Redoxsystems
mitochondriale TrxR	TrxR2	Bestandteil des mitochondrialen Redoxsystems
hodenspezifische TrxR	TrxR3	Bestandteil des testikulären Redoxsystems
<u>Jod-Thyronin-Dejodasen (Dio):</u>		
5'-DIO, Typ 1	DIO1, 5'D1	Aktivierung von Thyroxin zu T3 in Leber, Niere, usw.
5'-DIO, Typ 2	DIO2, 5'D2	Aktivierung von Thyroxin zu T3, besonders im Gehirn
5-DIO, Typ 3	DIO3, 5D3	Inaktivierung von Thyroxin und T3 zu rT3 bzw. T2
Selenophosphat-Synthetase 2	SPS2	Selen-Aktivierung durch ATP zu Seleno-Phosphat
Methionin-Sulfoxid-Reduktase B	MsrB	Reduktion von Methionin-Sulfoxid zu Methionin
Selenoprotein P	SePP	Plasma-Transport und Speicherung von Selen
Selenoprotein P15	SeP15	Katalyse von Redox-Reaktionen im ER, Qualitätskontrolle
Selenoprotein M		Katalyse von Redox-Reaktionen im ER, Qualitätskontrolle
Selenoprotein S		Retro-Translokation vom ER ins Cytosol, ER Stress-Kontrolle
Selenoprotein H, I, K, N, O, T, V, W		Selenoproteine mit noch unbekannter biologischer Funktion.

Abbildung 6: Auflistung der genetisch kodierten 25 Sec-haltigen Selenoproteine des Menschen (Kryukov et al. 2003). Bei 17 dieser Selenoproteine konnten inzwischen definierte biochemische Funktionen zugeordnet werden. Dabei katalysieren 11 Enzyme ähnliche Reaktionen und zeigen strukturelle Verwandtschaft, so dass diese in 3 Familien zusammengefasst werden können (GPx, TrxR, Dio). Für 8 Proteine liegen zwar vereinzelte Expressionsdaten vor, eine spezifische Bedeutung für bestimmte physiologische Prozesse konnte für diese Selenoproteine aber noch nicht definiert werden (Schomburg et al. 2004).

Eine zweite Familie von bedeutsamen Selenoproteinen stellen die Thioredoxin-Reduktasen (TrxR) dar, welche den intrazellulären Redox-Status und damit viele zentrale Aspekte des



Energiemetabolismus, der Differenzierung und der Signalaktivität kontrollieren (McKenzie et al. 2002; Gromer et al. 2004; Nalvarte et al. 2004). Als dritte Familie von Se-abhängigen Enzymen sind die Jod-Thyronin-Deiodasen (Dio) von zentraler Bedeutung für die Aktivierung der Schilddrüsenhormone und deren Abbau (St Germain und Galton 1997; Köhrle et al. 2005). In der Hierarchie der verschiedenen Selenoproteine werden die Dio Isoenzyme präferentiell versorgt (Gross et al. 1995; Bermano et al. 1996), so dass ein moderater Se-Mangel sogar bei schweren Begleiterkrankungen wie einer Sepsis nicht direkt eine Störung der Expression dieser Enzyme verursacht und sich damit nicht unmittelbar auf die Schilddrüsenhormonkonzentrationen auswirkt (Angstwurm et al. 2004). Neben diesen drei Familien von biochemisch intensiv charakterisierten Selenoenzymen gibt es noch einzelne Selenoproteine mit gut definierter Funktion und mehrere noch weniger gut charakterisierte Selenoproteine.

Für die Aktivierung von Selenid durch ATP in der Biosynthese von Sec sind zwei Isoenzyme bekannt, von denen die Selenophosphat-Synthetase 2 (SPS2) selbst ein Sec im aktiven Zentrum trägt und damit in der Feedback-Regulation des Se-Metabolismus eine zentrale Rolle einnehmen könnte (Tamura et al. 2004). Ebenso ist eine der Methionin-Sulfoxid Reduktasen (MsrB) ein Selenoenzym und katalysiert die reversible Reduktion von oxidierten Methionin-Resten in Proteinen zu ihrer ursprünglichen Thioether-Form (Moskovitz und Stadtman 2003). Im Muskel scheinen zwei Selenoproteine von besonderer Bedeutung, nämlich das relativ häufige, kleine, Se-responsive 9 kDa Selenoprotein W (Whanger 2000) und Selenoprotein N, das als einziges Selenoprotein bisher mit humanen Erbkrankheiten assoziiert werden konnte (Moghadaszadeh et al. 2001). Zum Transport, zur Verteilung und zur Speicherung von Se dient ein von der Leber synthetisiertes Plasmaprotein, Selenoprotein P (SePP), das als Langzeitindikator im Plasma für das Monitoring des Se-Status genutzt werden kann (Persson-Moschos et al. 1995; Hill et al. 1996). Die Selenoproteine P15 und M sind strukturhomolog und im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert. Beide Selenoproteine sind an der Qualitätskontrolle von Proteinen, die über eine Signalsequenz am rauen ER ins Lumen synthetisiert werden, beteiligt. Durch proteinchemische Analyse eines hochmolekularen Komplexes und Kolokalisationsexperimente konnte eine direkte Protein-Protein Interaktion von Selenoprotein P15 mit der UDP-Glukose-Glykoprotein Glykosyltransferase (EC 2.4.1.-) im ER gezeigt werden (Korotkov et al. 2001). Diese Wechselwirkung stellt sicher, dass das Selenoprotein im ER verbleibt und nicht an den Golgiapparat weitergeleitet wird. Weiterführende NMR Studien von gereinigten Proteinen haben dann in den Selenoproteinen P15 und M Thioredoxin-ähnliche Domänen identifiziert (Ferguson et al. 2006), die Thiol-

Disulfid-Austauschreaktionen katalysieren können und dadurch wie die Proteindisulfid-Isomerase (EC 5.3.4.1) aktiv die Qualität neu synthetisierter Proteine mitkontrollieren. Die Expression des dritten ER-residenten Selenoproteins, i.e. Selenoprotein S (SelS), wird im Menschen auch durch genetische Polymorphismen im Promotor des Gens beeinflusst. Unter inflammatorischer Stimulation erfolgt eine Genotyp-abhängige Induktion dieses Proteins, welches seinerseits den Grundtonus proinflammatorischer Zytokine kausal mitbestimmt (Curran et al. 2005). Entsprechend wird gerade für dieses Selenoprotein, welches initial aufgrund der Regulation in Hungerphasen durch Glukose auch "Tanis" (aus dem Hebräischen für "Fasten") genannt wurde, der Zusammenhang zwischen Se-Status, entzündlichen Reaktionen und Typ 2 Diabetes diskutiert (Walder et al. 2002). SelS weist eine einzelne Transmembrandomäne auf, und ähnlich wie bei den TrxR befindet sich der Sec Rest an vorletzter Position des 189 Aminosäuren langen Proteins.

Somit könnten diese drei Proteine durch ihren Beitrag zur Qualitätskontrolle im ER das Ausmaß an sog. ER-Stress modulieren, die Menge fehlgefalteter sezernierter Proteine kontrollieren und darüber ein weiteres wichtiges Verbindungsglied zwischen Immunsystem und Se-Status darstellen. Die physiologische Bedeutung der anderen in Abbildung 6 angeführten Selenoproteine ist noch weitgehend unbekannt (Schomburg et al. 2004).

## **1.6 Molekularer Mechanismus der Selenoprotein Biosynthese**

Der Metabolismus von Sec und die Biosynthese von Selenoproteinen sind durch einzigartige, eigentümliche und faszinierende Stoffwechselwege gekennzeichnet (Abbildung 7). Die Synthese von Sec-haltiger tRNA<sup>SEC</sup> erfolgt, wie oben beschrieben, nicht mittels der freien Aminosäure Sec, sondern ausgehend von einer Seryl-beladenen tRNA (Böck et al. 1991). Das Spurenelement wird aus den unterschiedlichen Se-haltigen Molekülen freigesetzt, zum Selenid reduziert und durch enzymatische Phosphorylierung aktiviert. Hierbei dient hauptsächlich Glutathion als Reduktionssystem für Selenit während SeMet zu Sec transseleniert wird und eine Sec-spezifische  $\beta$ -Lyase Se aus Sec abspaltet (Mihara et al. 2000). Se wird dann über Se-Wasserstoff durch eine ATP-abhängige Phosphorylierung zu Selenophosphat aktiviert (Tamura et al. 2004). Eine Sec-Synthetase (SelA) katalysiert schließlich den Austausch der endständigen Hydroxylgruppe durch die Selenylgruppierung, womit die Synthese der Sec-tRNA<sup>SEC</sup> als Baustein für Selenoproteine abgeschlossen ist (Hatfield und Gladyshev 2002). Die Synthese von Selenoproteinen bedarf neben dieser spezialisierten Enzyme und Stoffwechselwege auch einer hierfür entwickelten

Proteinsynthesemaschinerie, die nur z.T. auf allgemeine Komponenten der Translation zurückgreift.

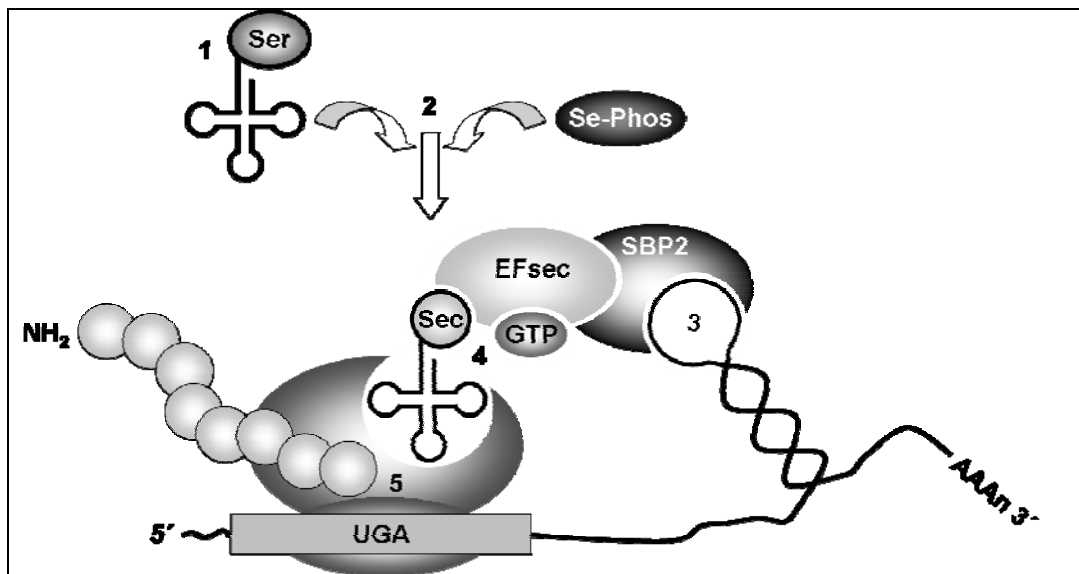


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Selenoprotein-Biosynthese (Schomburg und Köhrle 2007). Die Selenocystein(Sec)-spezifische tRNA<sup>SEC</sup> wird zunächst mit einem Seryl-Rest beladen (1). Selenid wird durch eine ATP-abhängige Reaktion zu Selenophosphat aktiviert und zum Austausch der Hydroxylgruppe zur Selenolgruppe genutzt (2). Selenoproteine werden durch Transkripte kodiert, die sich durch eine Haarnadelstruktur im 3'untranslatierten Bereich der mRNA auszeichnen (sog. SelenoCystein-Insertions Sequenzen, SECIS-Elemente). Diese Strukturelemente werden durch SECIS-bindende Proteine (SBP2) erkannt (3) und rekrutieren Sec-spezifische Elongationsfaktoren (EFsec), die Sec-tRNA<sup>SEC</sup> binden und an das Ribosom dirigieren (4). Dieses Zusammenspiel spezifischer Translationsfaktoren ermöglicht den Sec-Einbau in die wachsende Peptidkette und eine eindeutige Dekodierung des UGA-Kodons als Sec-Insertionssignal (5). Bei Se-Mangel kann das UGA-Kodon als Translationsterminationssignal missinterpretiert werden und einen Abbau der mRNA einleiten (sog. Nonsense-Mediated Decay, NMD).

Selenoproteine werden durch mRNA-Transkripte mit speziellen Strukturmerkmalen kodiert. Dazu gehört das Sec-spezifische Kodon UGA, welches in diesen Transkripten nicht für den üblichen Translationsstopp, sondern für die Insertion der 21ten proteinogenen Aminosäure Sec in die wachsende Proteinkette kodiert (Berry et al. 1997). Damit befindet sich dieses UGA-Kodon nicht am Ende eines offenen Leserasters, sondern es spezifiziert im kodierenden Bereich der mRNA den Einbau des Sec-Restes in die wachsende Peptidkette des entstehenden Selenoproteins. Die Dekodierung des zweideutigen UGA-Kodons als Sec-Insertionssignal erfolgt durch das Zusammenspiel einer Haarnadelstruktur im 3'-untranslatierten Bereich des Transkriptes (sog. SECIS-Element, SelenoCystein-Insertions-Sequenz) mit spezifischen RNA-bindenden Transfaktoren (sog. SECIS-bindende Proteine, SBP2). Neben diesen Eigentümlichkeiten gibt es für den erfolgreichen Einbau des Sec in die wachsende Peptidkette

noch einen spezifischen Elongationsfaktor, EFsec (Fagegaltier et al. 2001). Nur das reibungslose Zusammenspiel dieser Sec-spezifischen Komponenten ermöglicht eine effektive ribosomale Proteinbiosynthese von Selenoproteinen.

Im Gegensatz zur hier geschilderten Situation im Eukaryonten exprimieren Bakterien ein SelB-Genprodukt, welches die Funktionen und Domänen von SBP2 und EFsec in einer Peptidkette vereint, d.h., das bakterielle SelB erkennt und bindet sowohl das SECIS-Element und interagiert auch direkt mit der beladenen Sec-tRNA<sup>SEC</sup> und dem Ribosom (Böck et al. 1991). Da das UGA-Kodon auch als Stoppkodon bei der Translation interpretiert werden kann, konkurriert im Eukaryonten der Sec-Einbau mit dem Kettenabbruch (Berry et al. 1994) und kann dadurch auch den Abbau der mRNA über einen sog. Nonsense-Mediated Decay (NMD) Mechanismus einleiten (Sun und Maquat 2002). Dieser Mechanismus stellt sicher, dass Stopp-Mutationen im Leseraster nicht zur übermäßigen Produktion trunkierter Proteine führen, da solche Produkte die biologischen Funktionen, die Proliferation und Apoptose der betroffenen Zellen umprogrammieren können. Somit übernimmt dieser Mechanismus eine wichtige Schutzfunktion vor mutierten und trunkierten Genprodukten. Im Fall von Selenoprotein mRNA, wie z.B. der GPx-1, führt aber der NMD zu einer effektiven posttranskriptionalen Regulation der Halbwertszeit der GPx-1 Transkripte, so dass nicht nur die Menge an synthetisiertem Enzym durch eine niedrige Se-Konzentration beschränkt wird, sondern auch die mRNA der GPx-1 durch gezielten Abbau im Se-Mangel reduziert ist (Sun et al. 2000).

Im Vergleich unterscheiden sich die einzelnen Selenoprotein mRNA deutlich in Bezug auf Stabilität und Se-abhängigen Abbau durch den NMD Prozess (Maquat 2004). Die intrazelluläre Lokalisation der Sec-spezifischen Elongationsfaktoren ist offensichtlich für den Prozess des NMD ausschlaggebend (de Jesus et al. 2006). Sowohl EFsec als auch SBP2 tragen nukleäre Lokalisationssignale (NLS) und Exportsignale (NES). Die Bindung der Sec-beladenen Sec-tRNA<sup>SEC</sup> an EFsec im Cytoplasma kann den Kerneintritt des Komplexes bewirken. Dort erfolgen die Interaktionen mit SBP2 und der mRNA zu einem ternären Komplex. Externe Signale wie z.B. Veränderungen des intrazellulären Redox-Gleichgewichtes verändern die Konformation und intrazelluläre Lokalisation von SBP2 (Papp et al. 2006). Letztendlich schützt die nukleäre Lokalisation vor dem Abbau der mRNA durch NMD, zur Proteinbiosynthese transloziert der Komplex aber ins Cytoplasma zurück, wo bei Se-Mangel der NMD-vermittelte Transkriptabbau erfolgen kann (de Jesus et al. 2006).

Zwei hierarchische Prinzipien sind in der Biologie des Se besonders bemerkenswert und für die Physiologie und Toxikologie relevant. Die Synthese der unterschiedlichen Selenoproteine

wird nicht gleichermaßen reduziert wenn ein Se-Mangelzustand vorliegt, d.h., einige Selenoproteine werden präferentiell mit dem limitierenden Spurenelement versorgt während die Synthese der anderen fast vollständig eingestellt wird (Bermano et al. 1995; Gross et al. 1995). Hieraus kann man versuchen, teleologisch auf die Wichtigkeit der einzelnen Selenoproteine zu schließen (Wingler et al. 1999). Diese Hierarchie kann nur Teilaspekte einer zweiten und physiologisch noch bedeutsameren Hierarchie erklären, nämlich der auffälligen Unterschiede, mit welcher einzelne Gewebe bzw. Organe ihren Se-Gehalt in Mangelzeiten aufrechterhalten, während andere Kompartimente fast ihren kompletten Se-Vorrat einbüßen (Behne et al. 1988). Hierbei erweisen sich das Gehirn und die endokrinen Organe als besonders effektiv in der Se-Verwertung und Retention, während Leber, Niere oder Plasma schnell ihre Se-Speicher entleeren und nach kurzen Depletionsphasen eine nur noch mangelhafte Selenoprotein-Biosynthese durchführen (Behne et al. 1988).

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass Se im Körper durch sehr ausgefeilte Stoffwechselwege verteilt wird. Der Aufnahmemodus, die Anreicherung und die Bioverfügbarkeit sind für die verschiedenen Se-Formen unterschiedlich. Se-Mangelzustände wirken sich nicht gleichermaßen schwerwiegend auf alle Selenoproteine und Gewebe aus. Die lebenswichtigen Organe wie Gehirn und endokrine Drüsen bleiben auch in Mangelzeiten durch spezifische Regulationsmechanismen präferentiell versorgt. Die beiden hierarchischen Prinzipien der Se-Versorgung im Organismus, i.e., eine Hierarchie der Organe und eine Hierarchie der Selenoproteine, sind wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass man trotz deutlich unterschiedlicher Se-Versorgung in verschiedenen Regionen der Welt bzw. selbst bei intermittierend sehr schlechter Zufuhr (vegetarische, parenterale oder einseitige Ernährung) keine akuten gesundheitlichen Schäden, Ausfälle und Mangelsymptome beobachtet. Die Ausscheidung von Se kann an die nutritive Zufuhr angepasst werden, allerdings ist dieser Zusammenhang recht komplex und nicht durch eine einfache lineare Korrelation modellierbar (Janghorbani et al. 1999). Aber ebenso, wie es dem Menschen gelungen ist, den Mond zu betreten und seine Schattenseite zu erhellen, dürfen wir hoffen, in naher Zukunft auch einige weitere Schleier des geheimnisvollen Elementes der Mondgöttin gelüftet zu sehen, so dass uns Risiken und Nebenwirkungen, die pathophysiologische Relevanz und das therapeutische Potential des Se offenbar und einer kontrollierten Nutzung zugänglich werden. Diesem Ziel waren und sind die im Folgenden geschilderten eigenen Bemühungen gewidmet.

## 2 ERGEBNISSE

### 2.1 Biologische Bedeutung von Selenoprotein P (SePP)

2.1.1 Schomburg L, Schweizer U, Holtmann B, Flohé L, Sendtner M und Köhrle J, *Biochem J* 370, 397-402, 200. (ANLAGE A)

Unter allen bekannten Selenoproteinen nimmt Selenoprotein P (SePP) eine Sonderstellung ein, da die mRNA in Mensch und Nager zehn separate UGA-Kodons für den Einbau der 21ten proteinogenen Aminosäure Sec in die wachsende Peptidkette enthält (Hill et al. 1991). Zudem weisen die Transkripte im 3'-untranslatierten Bereich nicht nur 1 SECIS-Element, sondern 2 distinkte SECIS-Elemente auf, die den Einbau der Sec-Reste mit unterschiedlicher Effizienz unterstützen (Stoytcheva et al. 2006). Die biologische Funktion von SePP war seit seiner Entdeckung unklar, der Reichtum an Se-Atomen pro Molekül erlaubte allerdings schon sehr früh die Vermutung, dass SePP als Se-Transportprotein fungieren könnte (Motsenbocker und Tappel 1982). Ein sehr direkter Ansatz, um die Funktion eines Genproduktes in vivo zu analysieren, besteht in der gezielten genetischen Inaktivierung des entsprechenden Gens in der Maus durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen, die nach der Verifikation des gewünschten Rekombinationsereignisses zur Generierung chimärer Nachkommen genutzt werden. Die gezielte Verpaarung heterozygoter Transmittiertiere führt dann in weiteren Generationen zum Aufbau einer transgenen Zucht, die auch Nachkommen liefert, in denen beide Allele des Gens deletiert sind, sog. homozygot defiziente oder Knock-Out (KO) Mäuse.

Im Fall von SePP wurde ein Austauschvektor kloniert, in dem das untranslatierte Exon 1 und Intron 1 des murinen SePP-Gens mitsamt dem Promotor in einem 3,6 kb großen Fragment erhalten blieb, und im darauf folgenden kodierenden Exon 2 nach 5 Aminosäuren das Leseraster in die kodierende Sequenz eines  $\beta$ -Galaktosidase-Reportergens einmündete. Die Transkription dieses rekombinanten Gens sollte damit zur Expression eines Fusionsproteins unter der Kontrolle des endogenen SePP Promotors am SePP Locus im Genom führen, und dadurch gezielte Einblicke in die SePP-Expression in vivo durch Reporteranalysen liefern. Leider wurde dieses theoretisch vielversprechende Fusionsgen in vivo in den erzeugten transgenen Tieren nicht exprimiert, ein Ergebnis, welches in ca. 50% analoger Versuche mit anderen Genen ebenso beobachtet wird. Nichtsdestotrotz konnten homozygote SePP-KO Mäuse herangezogen und analysiert werden. Die Tiere zeigten ein breites Spektrum an phänotypischen Auffälligkeiten, die sich z.T. als Se-Mangelsymptome erklären ließen, z.T. aber auch völlig unerwartete Einblicke in die Bedeutung des Se-Stoffwechsels erlaubten.

Augenfälligster Phänotyp war ein deutlich reduziertes Wachstum der homozygoten SePP-KO Nachkommen, die 33 Tage nach der Geburt nur ca. 50% des Gewichtes der unveränderten oder heterozygot defizienten SePP(+/-) Geschwister zeigten (Abbildung 8).

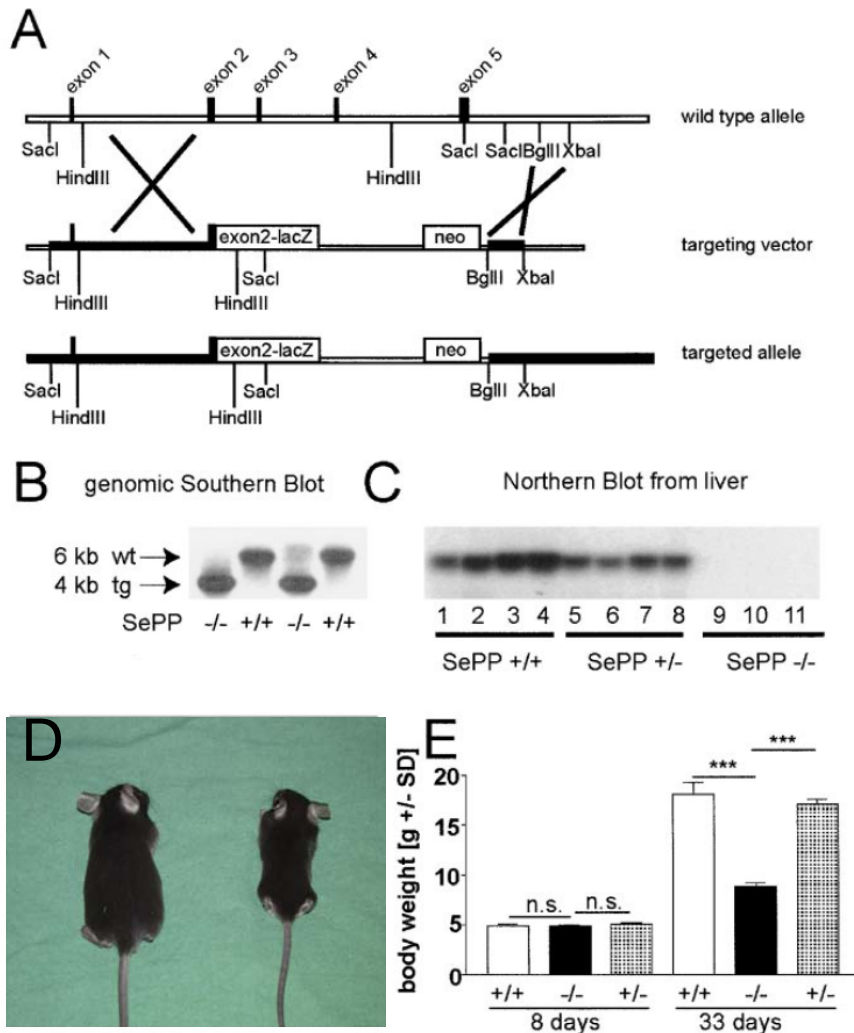


Abbildung 8: Konzeption und Durchführung zur Inaktivierung des Gens von SePP in der Maus (Schomburg et al. 2003). Das normale SePP Gen (wild type allele) enthält 5 Exons, von denen Exon 1 nicht translatiert wird (A). Der Rekombinationsvektor (targeting vector) wurde dermaßen konstruiert und kloniert, dass 5 Aminosäuren von SePP aus Exon 2 im Leseraster in die genetische Information einer  $\beta$ -Galaktosidase (lacZ) münden. Zusätzlich wurde eine Neomycin-Resistenzkassette (neo) zur Selektion transgener Stammzellen eingefügt. Erfolgreiche homologe Rekombination kann im Southern Blot durch die Abwesenheit des normalen SePP-Genfragmentes nach Fragmentierung mit dem Restriktionsenzym Hind III (bei 6 kb) und dem Nachweis des Fragmentes aus dem Transgen bei 4 kb verifiziert werden (B). Die Northern-Analyse der SePP-Transkripte aus Lebergewebe zeigt, dass genodosisabhängig auch die mRNA Konzentrationen von SePP in den transgenen Tieren deutlich reduziert vorliegen (heterozygote Mäuse, +/-) bzw. vollständig abwesend sind (homozygote SePP-KO Mäuse, -/-). Im Vergleich zu Kontrolltieren (D, links) zeigen SePP-KO Mäuse (D, rechts) ein deutlich reduziertes Wachstum mit verringerter Gewichtszunahme am Tag 33 nach der Geburt (E).

Um die These zu überprüfen, dass SePP ein wichtiges Protein für den Se-Stoffwechsel sei, wurde eine Methode zur Se-Analytik aus kleinen Probenmengen aufgebaut und validiert. Diese Methode beruht auf der Bildung fluoreszierender Piazselenol-Verbindungen nach erfolgter Totalhydrolyse der Probensubstanz (Sheehan und Gao 1990). SePP-KO Mäuse zeigten ein charakteristisch verändertes Muster der Se-Konzentrationen in ihren Geweben und dem Serum. Überraschenderweise war die Se-Konzentration in der Leber nicht verringert, sondern signifikant erhöht (Abbildung 9). Parallel waren in denselben Tieren die Se-Konzentrationen im Serum, in der Niere, im Hodengewebe und im Gehirn signifikant reduziert. Hieraus lässt sich folgern, dass SePP für den Se-Metabolismus und die Verteilung des Spurenelementes in den Geweben essentiell ist. Der Verlust der hepatischen SePP-Expression bewirkt eine Akkumulation von Se in der Leber, was sich auch durch die erhöhte Aktivität der hepatischen Selenoenzyme GPx (Abbildung 12) und TrxR (nicht gezeigt) äußert.

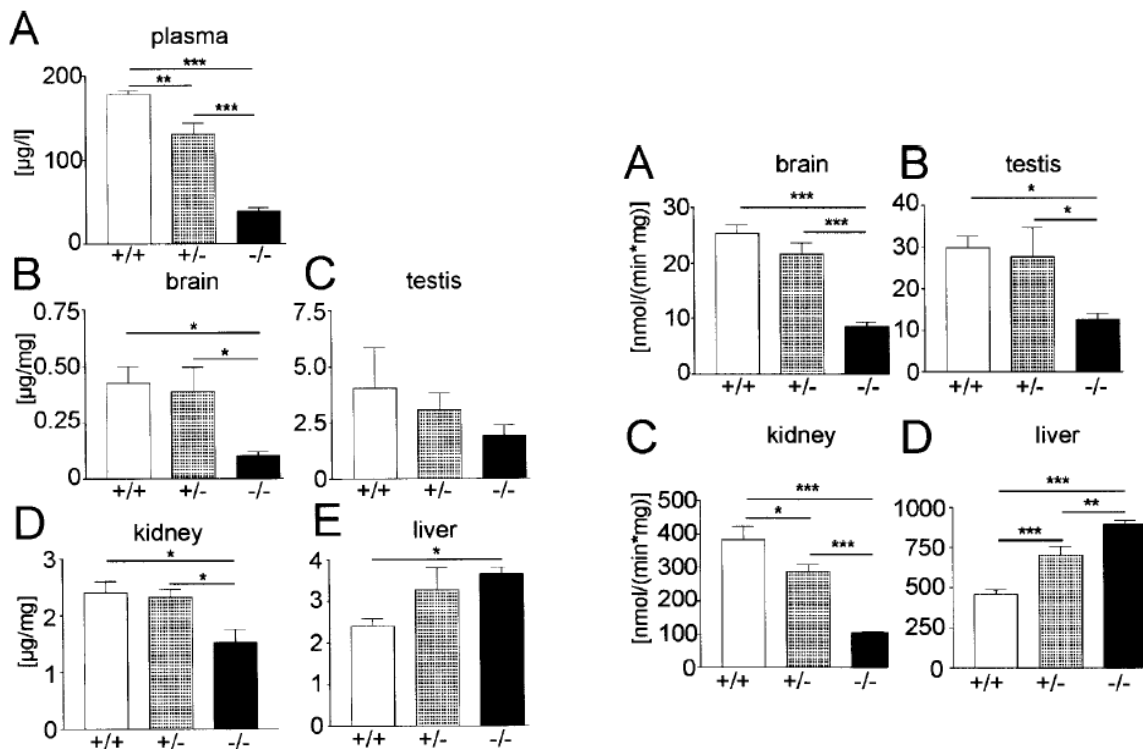


Abbildung 9: Analyse der Se-Konzentrationen (links) und GPx Aktivitäten (rechts) in Geweben von Kontrolltieren und SePP-KO Mäusen (Schomburg et al. 2003). Der Se-Gehalt im Serum zeigt eine deutliche Abhängigkeit von der SePP-Genodosis und fällt in heterozygoten SePP<sup>+/-</sup> und SePP-KO Mäusen auf 60% bzw. 22% der Kontrollwerte ab (links, A). In Gehirn, Niere und Hoden zeigen SePP-KO Tiere deutlich reduzierte Se-Konzentrationen (links, B, C, D) während Se im Lebergewebe akkumuliert (links, E). Parallel zu den veränderten Se-Werten fällt die Aktivität der Se-abhängigen GPx in Gehirn, Hoden und Niere ab (rechts, A, B, C) und steigt im SePP-KO Tier spezifisch in der Leber im Vergleich zu Kontrollgewebe an (rechts, D). Somit stört der Verlust der SePP Expression die Se Homöostase in vivo und führt zu einem verändertem Muster der Se-Gewebe Konzentrationen und der Expression von Se-abhängigen Enzymen.



Um die molekulare Ursache der veränderten Expression der Se-abhängigen Enzyme herauszuarbeiten, wurden Northern-Blot Analysen durchgeführt. Die Veränderung der Se-Konzentration in den Zellen könnte über Redox-regulierte Transkriptionsfaktoren eine veränderte Transkription der entsprechenden Gene bewirken oder alternativ könnten auch posttranskriptionale Mechanismen (z.B. der oben erwähnte RNA-Abbau über den NMD-Weg) zu einer reduzierten mRNA-Konzentration der Se-abhängigen Genprodukte führen. Interessanterweise waren im Se-angereicherten Lebergewebe keine Änderungen auf mRNA-Ebene feststellbar, während im Gehirn eine moderate Reduktion der GPx-1 (cGPx) Transkriptspiegel erkennbar war (Abbildung 10).

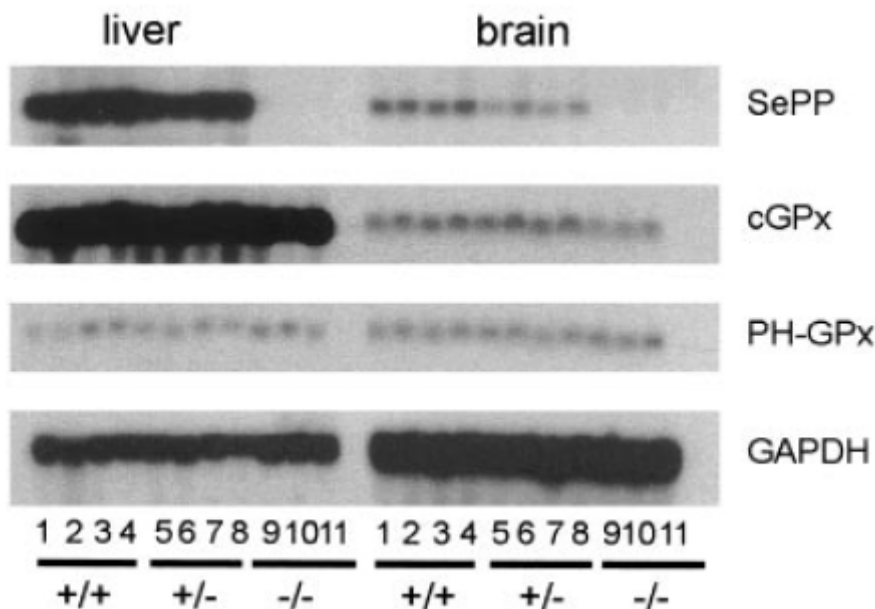


Abbildung 10: Northern-Blot Analyse von ausgewählten Se-abhängigen Genprodukten in Leber (links) und Gehirn (rechts) von Kontrolltieren (+/+), heterozygoten (+/-) und SePP-KO Mäusen (-/-) (Schomburg et al. 2003). Die Reduktion der SePP-mRNA Konzentrationen in Leber und Gehirn bis zum völligen Verlust im Gewebe der SePP-KO Tiere bestätigt die erfolgreiche genetische Inaktivierung und zeigt die Gendosis-abhängige Transkription von SePP in vivo. Die Signale der cGPx-mRNA sind im Gehirn der SePP-KO Individuen reduziert, was auf einen NMD-Mechanismus im Se-verarmten Gewebe zurückgeführt werden kann. Die Transkriptkonzentrationen der NMD-unanfälligen PH-GPx zeigen keine konsistenten Veränderungen in den Geweben der SePP-KO Tiere.

Die meisten der hier gezeigten Ergebnisse wurden kurz nach dieser Publikation von einer unabhängigen Gruppe aus Nashville, Tennessee, U.S.A., bestätigt (Hill et al. 2003).

2.1.2 Schweizer U, Michaelis M, Köhrle J und Schomburg L, *Biochem J* 378, 21-26, 2004. (ANLAGE B)

Neben der oben geschilderten Bedeutung von SePP für den Se-Status des Serums und der Gewebe war die bereits in den 80er Jahren postulierte Transportfunktion von SePP (Motsenbocker und Tappel 1982) noch zu überprüfen. Als erster Schritt stand hierbei die Frage im Vordergrund, ob der schwere Phänotyp von SePP-KO Mäusen durch ein gesteigertes Angebot von Se verhindert werden kann. Hierzu wurde das Trinkwasser der Mäuse mit unterschiedlichen Mengen Natriumselenit angereichert, und als erste Biomarker der Effektivität dieser Maßnahme wurden Körpergewicht und Bewegungsfähigkeit der Mäuse untersucht. Hierbei zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt auf das Wachstum der SePP-KO Mäuse und deren motorische Leistungsfähigkeit (Abbildung 11 und 12). Damit war die Möglichkeit eröffnet, die Schwere des Phänotyps durch Se-Supplementation zu kontrollieren.

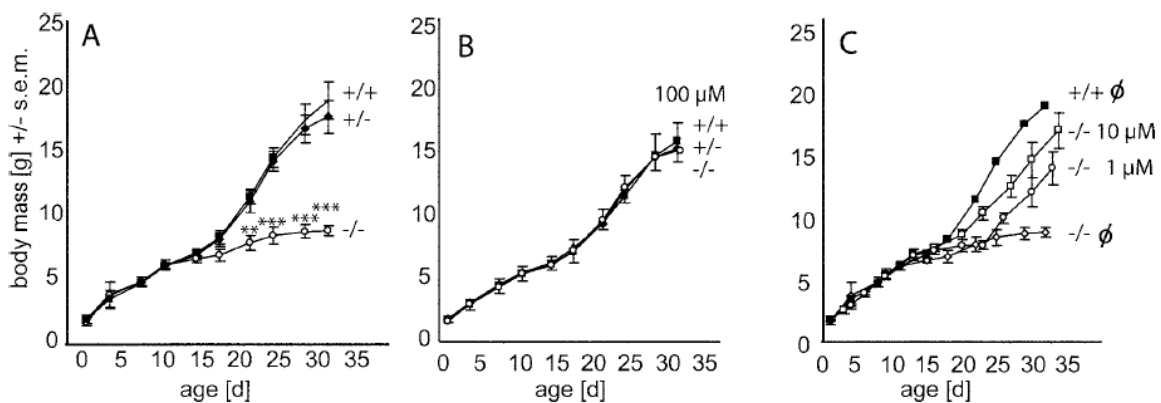


Abbildung 11: Gewichtszunahme während der ersten Lebenswochen in Abhängigkeit vom Se-Angebot und von der SePP-Genodosis (Schweizer et al. 2004). Nachkommen aus den Verpaarungen von heterozygoten Elterntieren wurden individuell markiert und ihr Wachstum wurde während der ersten 35 Lebenstage analysiert. Auf Kontrolldiät setzte nach 2 Wochen ein Wachstumsspur bei Kontrollmäusen (+/+) und heterozygoten Tieren (+/-) ein, der in SePP-KO Mäusen ausblieb. So wiesen diese Tiere nach 35 Tagen nur die Hälfte des Gewichtes der Geschwister auf (A). Dieses Wachstumsdefizit konnte durch die Zugabe von 100 µM Natriumselenit im Trinkwasser der Muttertiere vollständig vermieden werden (B), wobei zu bemerken ist, dass unabhängig vom Genotyp diese Supplementation durch toxische Nebenwirkungen eine geringere Gewichtszunahme bedingt als auf Kontrolldiät. Die Supplementation mit 1 bzw. 10 µM verursacht eine partielle dosisabhängige Normalisierung des Wachstums der SePP-KO Tiere (C).

Männliche SePP-KO Tiere zeigten überdies Ataxien und komplette Infertilität. Zur Analyse der motorischen Koordination und der Ausdauer wurde eine Rotarod-Analyse etabliert. Hierbei handelt es sich um Messungen mittels einer Apparatur, in der die Mäuse zunehmend schneller auf einem rotierenden Stab gegen die Drehrichtung laufen müssen ohne abzustürzen. Ist die Koordination gestört oder erlahmen die Kräfte, so fallen die Tiere ca. 10

cm tief und betätigen durch ihr Gewicht einen Tastkontakt, der die zu Beginn gestartete Uhr zur Zeitnahme des Verbleibens auf dem Stab stoppt (Abbildung 12). Auch in diesem Testverfahren erwies sich die Se-basierte Supplementation zur Vermeidung der Entwicklung des Phänotyps als erfolgreich und gut reproduzierbar.

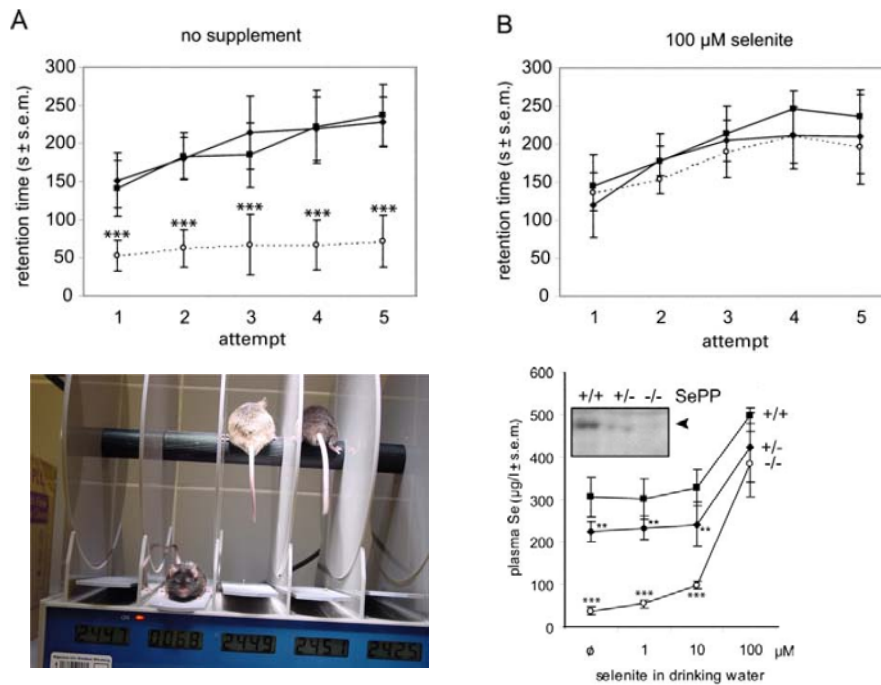
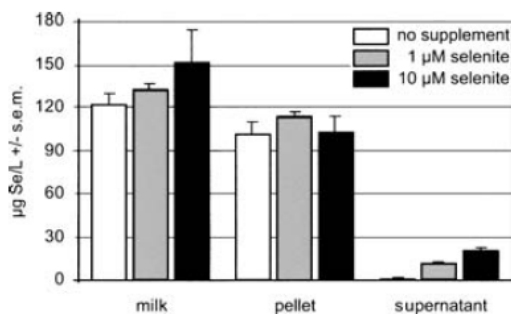


Abbildung 12: Dosisabhängige Vermeidung der Bewegungsstörung von SePP-KO Mäusen durch Natriumselenit-angereichertes Trinkwasser (Schweizer et al. 2004). Die motorischen Fähigkeiten von Kontrollmäusen und transgenen SePP-KO Tieren wurden auf einem rotierenden Stab in Abhängigkeit von der Se-Versorgung analysiert. Die sog. Rotarod Apparatur (links unten) liefert dabei als Messwert die Verweildauer auf dem sich beschleunigenden Stab. Die Elterntiere der zu testenden Mäuse waren mit steigenden Natriumselenit-Konzentrationen im Trinkwasser versorgt gewesen, und sie entwickelten daraufhin abhängig vom Genotyp ein charakteristisches Ansteigen der Serum-Se Konzentrationen (rechts unten). Mit der Verbesserung der Se-Versorgung normalisierte sich auch die kurze Verweildauer und das mangelhafte Lernverhalten der SePP-KO Mäuse im Rotarod Test (A, B). Ohne Supplementation zeigten die SePP-KO Mäuse nur eine durchschnittliche Verweildauer von ca. 50 sec. ohne erkennbaren Lerneffekt bei aufeinanderfolgenden Laufversuchen (A). Unter der Supplementation mit 100 µM Natriumselenit im Trinkwasser war sowohl ihr Laufverhalten als auch die Lernfähigkeit in diesem Test verbessert und nicht mehr unterscheidbar von Kontrolltieren (B).

Trotz dieser Erfolge bei der Vermeidung des Wachstumsdefizit und der Bewegungsstörung blieb die komplette Infertilität auch nach erfolgter Supplementation mit Natriumselenit unverändert bestehen. Nichtsdestotrotz ergab sich die Frage, in welcher Form die Muttertiere das erhöhte Se-Angebot an die SePP-KO Nachkommen weitergegeben hatten. Hierzu wurden Milchproben von säugenden Muttertieren isoliert und analysiert. Es zeigte sich, dass die heterozygoten Muttertiere unter Kontrollbedingungen oder nach Selenit-Supplementation das

Spurenelement überwiegend in proteingebundener Form an die Nachkommen weiterreichten. Die Natriumselenit-Supplementation bewirkte eine nur geringfügige Steigerung der Se-Konzentration der Muttermilch, welche auf nicht-präzipitierbare, lösliche Selenformen zurückzuführen ist (Abbildung 13). Diese Analysen zeigten, dass säugende Muttertiere trotz deutlich unterschiedlicher Se-Versorgung und Se-Serumkonzentrationen die Se-Menge in der Muttermilch sehr konstant zu halten vermögen. Diese Eigenschaft schützt die Nachkommen offensichtlich sowohl vor einer unzureichenden Versorgung mit dem Spurenelement als auch bei übermäßiger Exposition der Mutter vor toxischen Konzentrationen.



**Table 1 GPx enzyme activity in kidney is reduced in SePP<sup>-/-</sup> mice**

Results are means  $\pm$  S.E.M.;  $n = 6$  for each group;  $^{**}P < 0.01$ .

Genotype	GPx enzyme activity (nmol/mg per min)	
	No supplement	10 µM selenite
SePP <sup>+/+</sup>	405 $\pm$ 24	383 $\pm$ 55
SePP <sup>+/-</sup>	334 $\pm$ 79	373 $\pm$ 48
SePP <sup>-/-</sup>	188 $\pm$ 38 <sup>**</sup>	364 $\pm$ 68

Abbildung 13: Analyse des Se-Gehaltes der Muttermilch in Abhängigkeit von der Natriumselenit-Supplementation und Effekt der Supplementation auf die Enzymaktivität der Se-abhängigen GPx der Niere (Schweizer et al. 2004). Die Se-Konzentration in der Muttermilch erwies sich als relativ unabhängig von der zugeführten Natriumselenit-Menge und lag bei 120-150 µg/L (links). Unterschiede ergaben sich in der löslichen Fraktion, vermutlich durch übertretendes Natriumselenit aus dem Trinkwasser in die Muttermilch. Die renale GPx Aktivität als Marker des Se-Status änderte sich unter den Supplementations-Bedingungen in den Kontrolltieren nicht, wohl aber in SePP-KO Mäusen (rechts, Tabelle). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Supplementation sowohl die Se-Konzentrationen im Serum als auch in peripheren Geweben auch in Abwesenheit von SePP anheben kann, dass hingegen die Qualität der Muttermilch weitgehend unabhängig von der Se-Versorgung eine ausreichende, sichere und nicht übermäßige Se-Versorgung der Nachkommen sicherstellt.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass SePP zwar nicht essentiell für ein normgerechtes Wachstum und eine uneingeschränkte Entwicklung der Bewegungsfähigkeit ist, aber bei limitierender Versorgung mit dem Spurenelement dessen Aufnahme und biologische Verwertung und damit den Se-Status positiv beeinflusst und kontrolliert. Es wirkt dadurch wie ein molekularer Vermittler der effektiven Überführung des Se-Angebotes aus der Nahrung in einen körpereigenen, mobilen, stabilen und kontrollierbaren Se-Pool. Diese Funktion dürfte gerade bei nicht übermäßiger Versorgung mit dem Spurenelement, wie es in weiten Teilen der Welt zu konstatieren ist, von besonderer Bedeutung für das gesundheitliche Wohlergehen sein und so eine ungestörte Physiologie des Organismus erlauben.

## 2.2 Hierarchische Prinzipien im Selenstoffwechsel

2.2.1 Schomburg L, Schweizer U, Köhrle J, *Cell Mol Life Sci* 61, 1988-1995, 2004

### (ANLAGE C)

Die Ergebnisse mit den SePP-KO Mäusen brachten neben einigen nahe liegenden Ergebnissen auch völlig überraschende Befunde. So entwickelte sich während der ersten 35 Lebenstage ein Wachstumsdefekt (siehe Abbildung 11), und die männlichen SePP-KO Tiere zeigten im adulten Stadium den Phänotyp einer kompletten Infertilität (Abbildung 14). Dieses Resultat kam nicht unerwartet, da es auch bei Tieren auf Se-Mangeldiäten zuvor beobachtet wurde (Brown und Burk 1973).

Table 1. Transgenic mouse models analysing selenoproteins and Se-dependent processes.

Class	OMIM	KO model	Health effects	
			In development	Upon challenge
Iodothyronine deiodinase (DIO)				
DIO 1	*147892	not rep.	(likely mild)	?
DIO 2	*601413	[31]	growth defect, hearing loss	defective cold adaptation
DIO 3	*601038	[30]	growth retardation	fatalities
Glutathione peroxidase (GPx)				
GPx-1	*138320	[38]	none reported	sensitive to oxidative stress
GPx-2	*138319	[39]	none reported	colitis/cancer in GPx1/GPx2 KO
GPx-3	*138321	not rep.	(likely mild)	?
GPx-4	*138322	[26]	embryonic lethal	reduced fitness of hemizygotes
GPx-6	*607913	impossible	Se dependent in human only	
Thioredoxin reductase (TrxR)				
TrxR1	*601112	[28]	embryonic lethal	–
TrxR2	*606235	[28]	embryonic lethal	–
TGR	*606448	not rep.	?	?
Methionine sulfoxide reductase (Msr)				
MsrB	*606216	not rep.	?	?
Selenophosphate synthetase (SPS)				
SPS2	*606218	not rep.	(likely lethal)	?
Selenoprotein P (SePP)				
SePP	*601484	[34, 35]	growth defect, ataxia, seizures	male infertility
All selenoproteins (tRNA <sup>[Ser]Sec</sup> )				
in general	*165060	[25]	embryonic lethal	–
in mammary	*165060	[68]	none reported	altered tumor suppressor levels
in liver	*165060	[29]	none reported	liver and fat necrosis, fatalities

Abbildung 14: Übersicht über transgene Mausmodelle, die zum Zwecke der Analyse der biologischen Bedeutung von Selenoproteinen generiert wurden (Schomburg et al. 2004). Die Essentialität des Spurenelements wird besonders dadurch deutlich, dass viele der generierten Modelle keine lebensfähigen Nachkommen generierten (GPx-4, TrxR1, TrxR2 und tRNA<sup>SEC</sup>). Der OMIM Eintrag verweist auf die Dokumentation zum entsprechenden humanen Gen, zur chromosomalen Organisation und zum Phänotyps einer entsprechenden Erbkrankheit (soweit bekannt), wie sie in der Online-Version des Victor A. McKusick Verzeichnisses auf dem Server der National Institutes of Health der USA zu finden sind (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Bei der Detailanalyse von Spermien stellte sich heraus, dass die Se-abhängige GPx-4 im Spermium nach kovalenter Crossvernetzung eine essentielle strukturgebende Funktion erfüllt (Ursini et al. 1999). Völlig unerwartet war hingegen die Beobachtung, dass SePP-KO Mäuse

einen neuronalen Phänotyp entwickelten. Sie zeigten Ataxien und gelegentliche epileptische Anfälle. Diese Beobachtung war zuvor in tierexperimentellen Studien mit Se-defizienter Ernährung nicht gemacht worden, und zeigte sich auch bei keinen der anderen inzwischen publizierten transgenen Mausmodelle zur Analyse der biologischen Bedeutung von Selenoproteinen (Abbildung 14). Eine intensive Literaturrecherche nach dem potentiellen Zusammenhang von epileptischen Anfällen und Se-Status ergab, dass auch bei menschlichen Patienten, die an Epilepsie leiden, eine Subgruppe mit auffällig geringer Se-Plasmakonzentration gibt. Durch eine gezielte Se-Supplementation konnte bei diesen Patienten nicht nur die Se-Konzentration im Blut erhöht, sondern ebenso die Anfallshäufigkeit und der Schweregrad der epileptischen Episoden drastisch verringert werden (Ramaekers et al. 1994). Anhand dieser Ergebnisse und durch den Vergleich zu den Daten von Se-defizienten Tiermodellen konnten wir gerade für das Zentrale Nervensystem eine reversible extrazelluläre Se-Speicherfunktion für SePP ableiten (Abbildung 15).

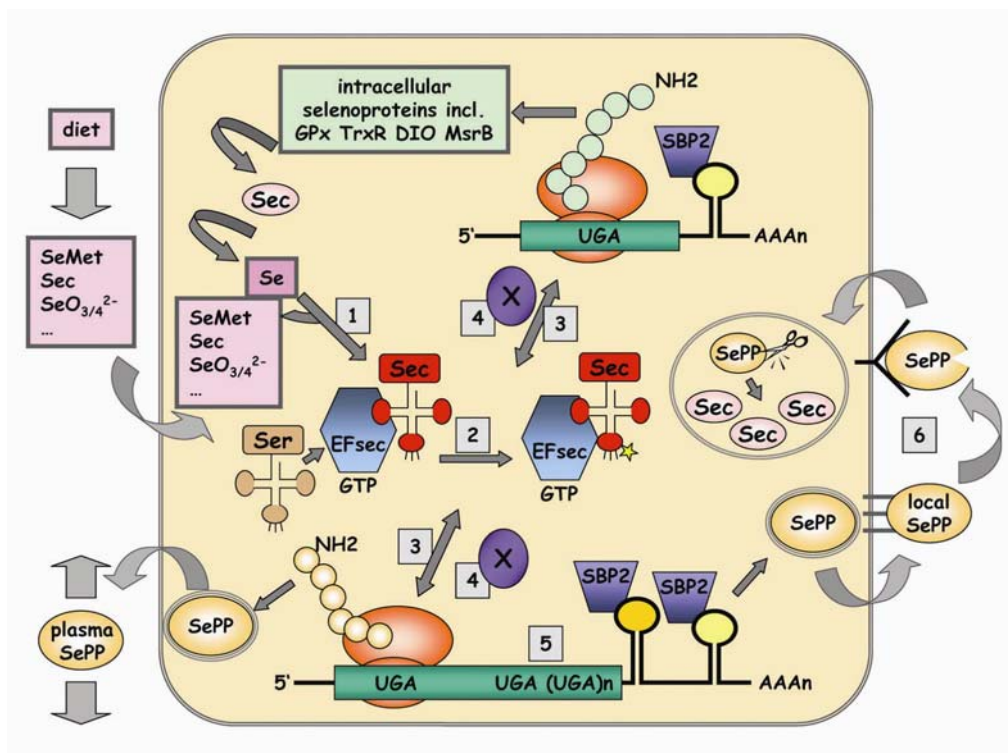


Abbildung 15: Schematische Darstellung der zentralen Stoffwechselwege bei der Aufnahme, Speicherung und Biosynthese von Se-haltigen Nahrungsbestandteilen bzw. Selenoproteinen (Schomburg et al. 2004). Neben der ubiquitär ablaufenden Biosynthese der cytosolischen GPx-1 als intrazellulärem Selenoprotein mit Speicherfunktion können gerade Zellen des Zentralen Nervensystems SePP synthetisieren, in die unmittelbare Umgebung sezernieren und als extrazellulären lokal verfügbaren Se-Vorrat reversibel wieder aufnehmen und verwerten (sog. SePP-Zyklus). Details zum Aufnahmemechanismus sind noch weitgehend spekulativer Natur, eine reversible Biosynthese und Reaktivierung ist aber mit den experimentellen Daten in Einklang und liefert eine gute Arbeitshypothese für kommende Detailstudien (Schomburg et al. 2004).

Das entsprechende Modell geht davon aus, dass neben dem intrazellulären Se-Pool, der hauptsächlich durch die Se-abhängige Transkription und Biosynthese von GPx-1 kontrolliert wird, SePP als extrazellulärer, bei Bedarf reaktivierbarer Se-Speicher von den Neuronen genutzt werden kann und die hierarchisch-präferentielle Versorgung des Gehirns sicherstellt (sog. SePP-Zyklus). Hierbei dient die in Zellkultur beobachtete präferentielle Aufnahme von proteolytisch generierten C-terminalen SePP-Fragmenten als neurotrophe Faktoren (Hirashima et al. 2003) als regulierendes Prinzip, dass eine bedarfsgerechte Remobilisierung des extrazellulären Se-Pools erlaubt.

Weitere Unterstützung fand dieses zunächst spekulative Modell inzwischen durch den fehlenden neuronalen Phänotyp, den wir nach der selektiven Inaktivierung aller hepatischen Selenoproteine durch die gewebespezifische Deletion der tRNA<sup>SEC</sup> beobachteten (Schweizer et al. 2005). Auch in diesem Modell fiel die Serumkonzentration von Se durch das Fehlen des von der Leber sezernierten SePP drastisch ab, jedoch konnte das Gehirn seine Se-Konzentration auch gegen den Gradienten im Serum halten, und entsprechend waren auch keine neurologischen Auffälligkeiten in diesen Mäusen zu beobachten (siehe unten). Ob ein ähnlicher SePP-Zyklus auch für die präferentielle Retention des Spurenelementes im Hodengewebe zur Sicherstellung der Fertilität bei Mangelversorgung funktional ist, konnte bis jetzt noch nicht mit Sicherheit herausgearbeitet werden.

Zusammengefasst belegen diese Studien, dass SePP mehrere Funktionen im Se-Metabolismus übernimmt. Es kontrolliert den Se-Status des Serums und der Gewebe über die Stoffwechselwege der Leber und die bedarfsgerechte Biosynthese und Sezernierung ins Blut. Zusätzlich ist SePP auch als reversibler extrazellulärer Se-Speicher in bestimmten Geweben wie z.B. dem Gehirn von entscheidender Bedeutung. Somit ist SePP auch für die lokale präferentielle Aufrechterhaltung der Spurenelementversorgung im Zentralen Nervensystem verantwortlich und liefert damit einen wichtigen Schlüssel zum Verständnis der hierarchischen Abhängigkeit der verschiedenen Gewebe vom Se-Status.

2.2.2 Schomburg L, Riese C, Michaelis M, Griebert E, Klein MO, Sapin R, Schweizer U und Köhrle J, *Endocrinology* 147, 1306-1313, 2006. (ANLAGE D)

Die Versuche mit Nagetieren auf Se-Mangeldiät hatten gezeigt, dass neben dem Zentralen Nervensystem auch die endokrinen Organe präferentiell mit Se versorgt werden bzw. ihren Se-Status auch bei mangelhafter Versorgung mit dem Spurenelement effektiv erhalten können (Behne et al. 1988). Hierbei sticht die Schilddrüse besonders hervor, da sie das Organ mit der höchsten Se-Konzentration darstellt (Dickson und Tomlinson 1967; Drasch et al. 2000). In der Schilddrüse wird Se für die Biosynthese einer Reihe von Selenoproteinen benötigt, unter anderem von GPx-1, GPx-2 und GPx-4, von TrxR-1 und -2, und den beiden 5'-Dio Isoenzymen (Köhrle et al. 2005). Die besonders hohen Aktivitäten der GPx Enzyme scheinen gerade in dem Schilddrüsengewebe von besonderer Bedeutung zu sein, da bei der Synthese der Schilddrüsenhormone Thyroxin (T4) und Triiod-Thyronin (T3) hohe Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) generiert werden (Beckett und Arthur 2005; Köhrle et al. 2005). SePP-KO Mäuse zeigen generell verminderte Konzentrationen von Se in den untersuchten Geweben, i.e., in Serum, Niere, Hoden und Gehirn (Schomburg et al. 2003). Der Wachstums-Phänotyp und die Ataxien und Lernbehinderungen legten die Vermutung nahe, dass diese Mäuse eine Hypothyreose entwickelt hatten. Die Analyse der mRNA Konzentrationen des stringent durch T3 regulierten hypophysären Thyroidea-Stimulierenden Hormons (TSH) zeigten jedoch keine Auffälligkeiten (Abbildung 16).

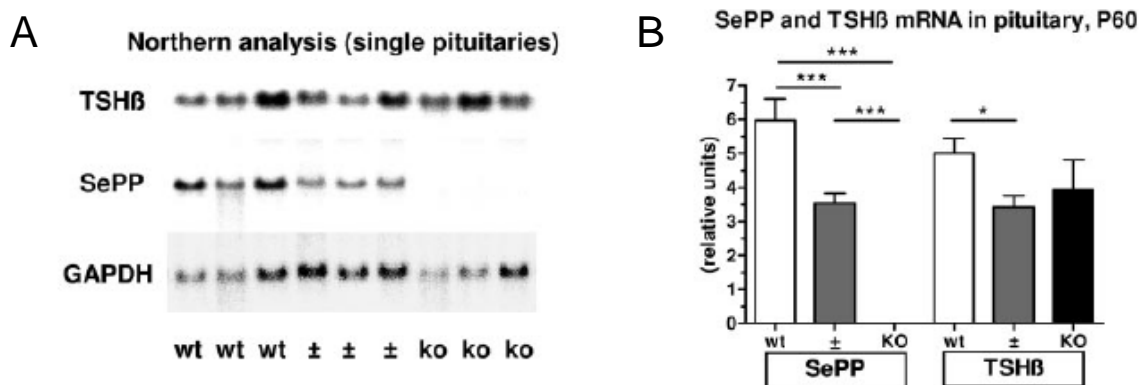


Abbildung 16: Analyse der Schilddrüsenhormon-Achse in SePP-KO Mäusen (Schomburg et al. 2006). Die mRNA Konzentrationen von SePP zeigen in den Hypophysen von Kontrollmäusen und SePP-KO Tieren die erwarteten Unterschiede gemäß der SePP Gendosis im Northern Blot (A) und nach quantitativer Auswertung der Signale durch einen Phosphoimager (B). Trotz fehlender SePP Expression in den SePP-KO Mäusen sind aber die Signale der stringent durch Schilddrüsenhormone regulierten hypophysären beta-Untereinheit des Thyroidea-Stimulierenden Hormons (TSH) unverändert. Somit erscheinen die SePP-KO Mäuse trotz eines gestörten Se-Metabolismus euthyreot (A, B).



Dieser Befund war angesichts des Phänotyps, der ähnlich in hypothyreoten Mausmodellen zu beobachten ist, überraschend. Die nächste wichtige Analyse stellt den Vergleich des Se-Status der Schilddrüse in den verschiedenen Genotypen dar. Neben der Gesamt-Se Analyse empfiehlt sich als Biomarker der Se-Verfügbarkeit für die Biosynthese von Selenoproteinen die Bestimmung der Expression von GPx-1, da die mRNA dieses Enzyms durch NMD bei Se-Mangel aktiv abgebaut wird (Sun et al. 2000). Der Vergleich von Kontrolltieren mit SePP-KO Mäusen lieferte keinen Anhaltspunkt für einen reduzierten Se-Status in den transgenen Tieren (Abbildung 17). Somit wird die Schilddrüse präferentiell und unabhängig von SePP mit dem essentiellen Spurenelement versorgt.

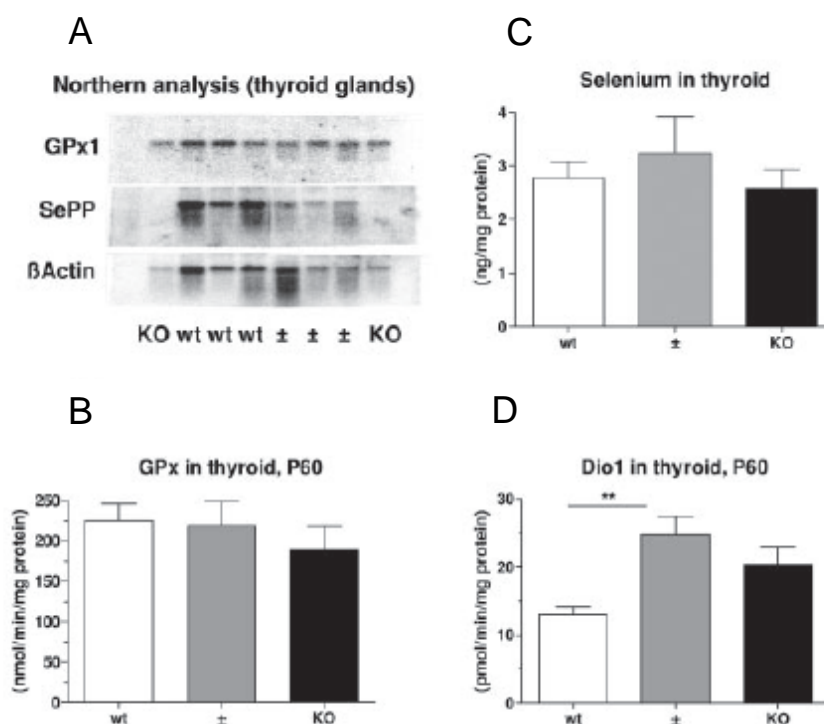


Abbildung 17: Analyse des Se-Status der Schilddrüse in SePP-KO Mäusen (Schomburg et al. 2006). In der Northern-Analyse von mRNA aus einzelnen Schilddrüsen verifiziert die Abwesenheit der SePP Signale aus SePP-KO Mäusen und die reduzierte Signalstärke in heterozygoten SePP±-Mäusen die eingeschränkte bzw. fehlende Expression von SePP mRNA in den Geweben (A). Die unverändert starken Signale der Se-abhängigen GPx-1 mRNA deuten auf einen guten Se-Status der Schilddrüsen in allen drei betrachteten Genotypen hin (A). Dieses Ergebnis wird durch die unverändert starke Expression der GPx-Aktivität (B) und den unveränderten Se-Gehalt der Schilddrüsengewebe (C) verifiziert. Die leicht erhöhte Aktivität der Dio1 in den heterozygoten SePP±-Mäusen deckt sich mit den Ergebnissen, die in Futtersversuchen mit Se-Mangelernährung gewonnen wurden (Bermano et al. 1995). Zusammengefasst belegen diese Ergebnisse, dass die Schilddrüse unabhängig von SePP einen guten Se-Status aufrechterhalten kann.

Im Vergleich zu den Ergebnissen der reduzierten Selenoprotein Expression im Gehirn und des in diesem eigentlich präferentiell versorgten Gewebes ebenfalls reduzierten Se-Gehaltes muss

die Schilddrüse außerordentlich hoch in der Hierarchie der unterschiedlichen Organe für die Se-Versorgung eingeordnet werden (Abbildung 18). Im Gegensatz zu den anderen bislang analysierten Geweben zeigte sie sich in diesen Analysen auch völlig unabhängig von der hepatischen und intra-thyreoidalen SePP-Expression, ein Befund, der die Schilddrüse an die Spitze der präferentiell versorgten Gewebe setzt.

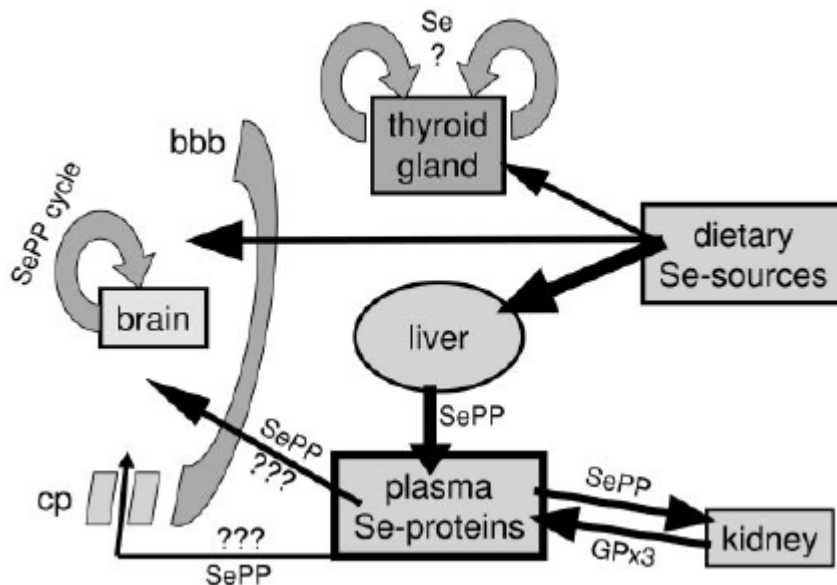


Abbildung 18: Hierarchische Anordnung der unterschiedlichen Gewebe bzw. Kompartimente in Bezug auf die Se-Versorgung (Schomburg et al. 2006). Die mit der Nahrung aufgenommenen Se-Quellen werden in erster Linie durch effektive leberspezifische Stoffwechselwege aufgenommen und in Selenoproteine überführt. Die Leber stellt das Hauptsynthese-Organ für SePP im Blut dar, welches die Niere mit Se versorgt und vermutlich direkt oder über die circumventrikulären Strukturen ins Zentrale Nervensystem gelangt. In SePP-KO Mäusen verringern sich die Se-Konzentrationen in Serum, Niere und Gehirn. Fehlt nur die hepatische SePP Biosynthese, so kann das Gehirn seinen präferentiellen Se-Status aufrechterhalten. Hierbei bedient es sich des oben angesprochenen SePP-Zyklus (Abbildung 15). Die Schilddrüse erscheint noch höher in dieser hierarchischen Versorgung zu stehen, da das Gewebe auch in Abwesenheit von SePP unverändert hohe Se-Konzentrationen aufweist und unvermindert hohe enzymatische Aktivitäten der verschiedenen Selenoproteine exprimiert.

Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse in Verbindung mit der bereits lange bekannten hohen Se-Konzentration in der Schilddrüse darauf hin, dass die Evolution die hierarchischen Prinzipien des Se-Metabolismus dahingehend optimiert hat, dass eine ungestörte Funktion der Schilddrüse und Biosynthese der Schilddrüsenhormone auch in kurzfristigen oder chronischen Mangelsituationen bzw. erkrankungsbedingten Se-Aufnahmestörungen sichergestellt werden können. Diese Erkenntnis verwundert angesichts der essentiellen Funktionen der Schilddrüsenhormone für die neuronale Entwicklung, das Wachstum und den Energiestoffwechsel nicht.

## 2.3 Molekulare Mechanismen der Selenoprotein Expression

2.3.1 Dumitrescu AM, Liao XH, Abdullah MS, Lado-Abeal J, Majed FA, Moeller LC, Boran G, Schomburg L, Weiss RE und Refetoff S, *Nat Genet* 37, 1247-52, 2005  
(ANLAGE E)

Sowohl die Umsetzung des Schilddrüsenprohormons Thyroxin (T4) zum biologisch aktiven Triiod-Thyronin (T3) als auch der Abbau von sowohl T4 als auch T3 wird von Isoenzymen der Familie der Iodothyronin-Deiodasen (Dio) katalysiert (Köhrle et al. 2005). Es sind drei Dio Isoenzyme bekannt, die alle ein für die Katalyse essentielles Se-Atom im aktiven Zentrum aufweisen. Die höhere Reaktivität der Selenol-Gruppe im Vergleich zu z.B. einer Thiol-Gruppe erscheint für die zu katalysierende Reaktion der Iodabspaltung essentiell, denn Cys-Mutanten sind um Größenordnungen weniger aktiv (Schomburg et al. 2004). Somit ist es vorstellbar, dass Menschen mit gestörter Selenoprotein-Biosynthese dadurch auffällig werden, dass ihre Schilddrüsenhormonachse gestört ist.

In Chicago in der Gruppe von Prof. Samuel Refetoff wurden in der pädiatrischen Endokrinologie Patienten identifiziert, die ein bis dahin nicht erklärbares Profil gestörter Schilddrüsenhormon-Konzentrationen im Blut aufwiesen. Die T4-, reversT3- und TSH-Werte waren erhöht und die Gesamtmenge an T3 (TT3, total T3) war erniedrigt (Abbildung 19).

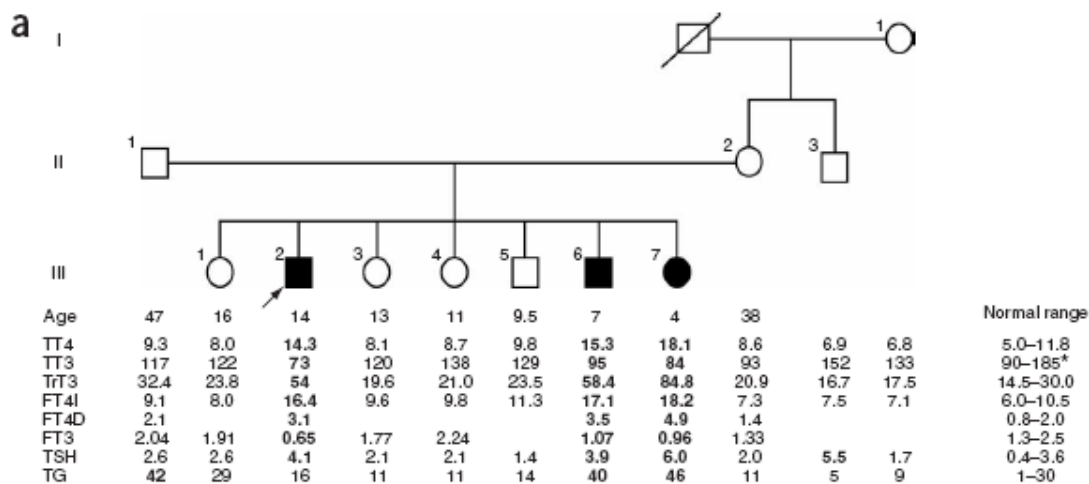


Abbildung 19: Hormonwerte von Kindern, die an einer Erbkrankheit mit gestörter Selenoprotein Biosynthese leiden (Dumitrescu et al. 2005). Oben ist der Stammbaum der betroffenen Familie angeführt (ein Kreis steht für ein weibliches, ein Quadrat für ein männliches Familienmitglied; der horizontale Strich verbindet Eheleute und ausgefüllte Symbole zeigen die betroffenen Patienten an). Unter den Symbolen ist das jeweilige Alter des Familienmitglieds angegeben. In den unteren Zeilen sind die Hormonwerte aufgeführt, rechts davon ist der Normalbereich angedeutet. Auffällig sind bei den Patienten die stark erhöhten T4-, TSH- und rT3-Werte bei niedrigen T3-Konzentrationen.

Da bei diesen Patienten offenbar eine Störung des Feedback-Regulationssystems der Schilddrüsenhormonachse vorlag, entschlossen sich die behandelnden Mediziner dazu, einen TSH-Suppressionstest mit T4 und alternativ mit T3 durchzuführen. Überraschenderweise war die Applikation von T3 erfolgreich, und supprimierte wie bei den gesunden Geschwistern das erhöhte TSH, während sich T4 als nicht effektiv in den Patienten erwies (Abbildung 20). Hieraus konnte man schlussfolgern, dass eine Störung der Konversion von T4 zu T3 vorliegt, und dieses Defizit durch eine gestörte Expression der Dio Enzyme verursacht wird.

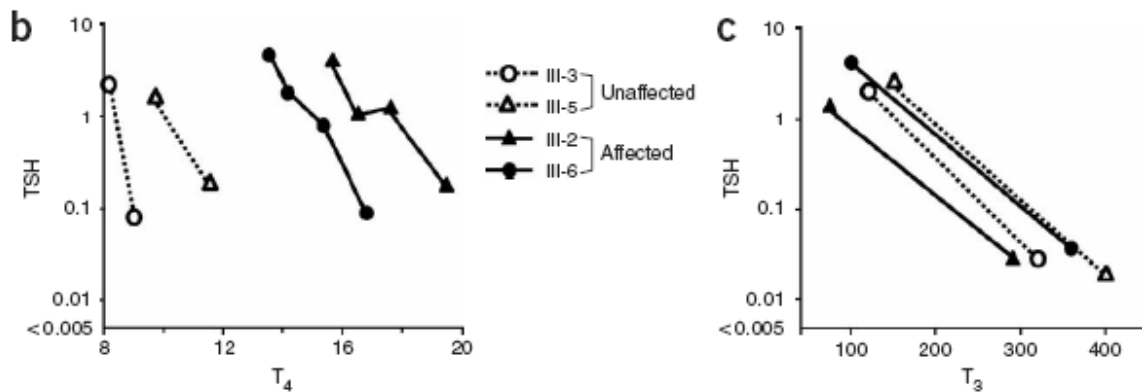


Abbildung 20: TSH-Suppressionsversuche bei den Patienten und ihren gesunden Geschwistern durch T4 (b, links) bzw. T3 (Dumitrescu et al. 2005). Von der Erbkrankheit betroffene Kinder (ausgefüllte schwarze Symbole) zeigen keine effektive Suppression der Serum-TSH Werte auf eine T4 Applikation (b), während sie ebenso wie die gesunden Geschwister mit einer deutlichen im Normbereich liegenden Suppression des TSH nach T3 Applikation reagieren (c). Eine nahe liegende Schlussfolgerung dieser klinischen Daten besteht in dem Postulat, dass bei den betroffenen Kindern die Expression bzw. Regulation der Se-abhängigen Dio Enzyme gestört ist, da diese Selenoproteine den Metabolismus der Schilddrüsenhormone kontrollieren und auch die Aktivierung von T4 zu T3 katalysieren.

Die anhand dieser Befunde und Interpretation initiierte Sequenzierung der Gene von Dio1-3 brachte keine auffälligen Mutationen in den Patienten zum Vorschein. Somit wurde in einem nächsten Schritt die Expression der Dio Enzyme aus Hautstanzen in vitro untersucht. Hierzu wurde neben der Bestimmung der mRNA Konzentrationen und Enzymaktivitäten ein Stimulationsexperiment mit dem stabilen Agonisten der cAMP-abhängigen Signalkaskade db-cAMP durchgeführt. Da Fibroblasten nur Dio2 exprimieren, welche durch cAMP-abhängige Stimulaiton induziert werden kann, sollte dieser Ansatz die Regulation des Dio2 Gens eruieren (Abbildung 21). Überraschenderweise konnte db-cAMP durchaus die mRNA Konzentration von Dio2 deutlich erhöhen, nicht aber die Aktivität des Enzyms. Damit dürfte ein Biosynthese-Defekt des Selenoproteins Dio2 in den Patienten vorliegen, der eine unzureichende Aktivierung von T4 in den verschiedenen Geweben bedingt, welches sich letztendlich in den gestörten Schilddrüsenhormonwerten äußert. Anhand dieser Ergebnisse blieb zu testen, ob sich der Biosynthesedefekt spezifisch auf Dio2 bezog, oder ob eine generelle Störung der Selenoprotein Biosynthesemaschinerie vorlag.

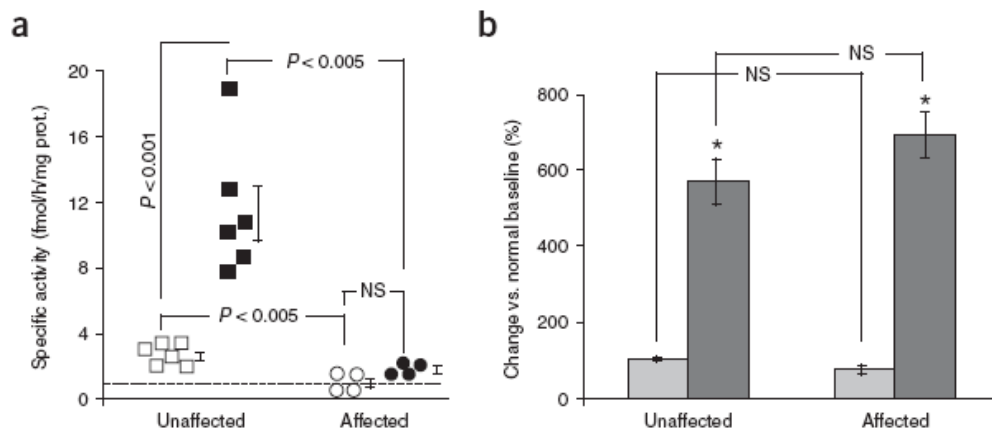


Abbildung 21: Analyse der Dio2 Expression in Fibroblasten-Kulturen der Patienten und ihrer gesunden Geschwister (Dumitrescu et al. 2005). Die Dio2 Enzymaktivität (a, links) ließ sich in den gesunden Geschwister (Quadrate: unaffected) durch Stimulation mit db-cAMP (dunkle ausgefüllte Symbole) gegenüber dem Grundzustand (offene Symbole) deutlich induzieren, nicht aber in den Patienten (Kreise: affected). Auf mRNA Ebene hingegen (b) zeigten sowohl die Patienten als auch die gesunden Geschwister eine deutliche Induktion der Dio2 Transkript-Konzentrationen, wenn db-cAMP der Kultur zugesetzt wurde (Grundzustand: helle graue Balken; db-cAMP-Induktion: dunkle Balken). Somit reagierte die Transkription vom Dio2 Gen normal, die Translation der Dio2 mRNA in aktives Protein war in den Patienten hingegen deutlich gestört.

Zur Analyse, ob der Defekt Dio2-spezifischer Natur ist oder eine allgemeine Störung der Selenoprotein Biosynthese darstellt, wurden Serumproben der Patienten und der gesunden Geschwister verglichen. Hier kam die oben beschriebene fluorimetrische Analytik der Se-Gesamtbestimmung und eine semiquantitative Analyse der SePP-Konzentration im Serum durch Western Blot zum Einsatz (Abbildung 22).

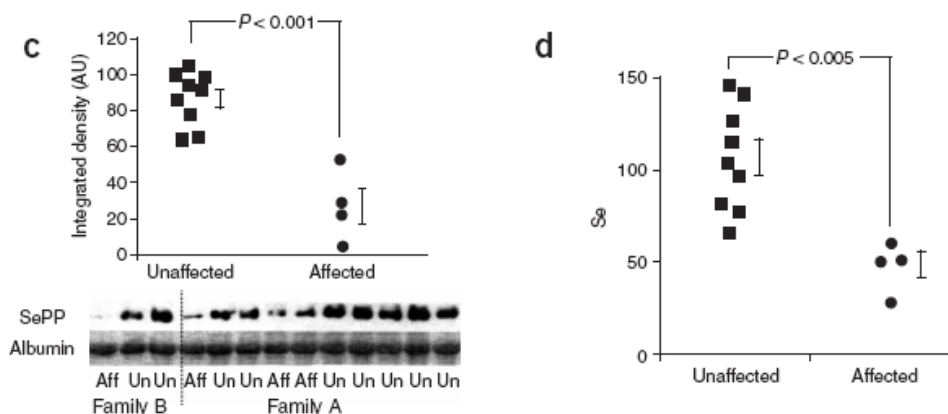


Abbildung 22: Analyse der SePP- und Se-Konzentrationen aus Serumproben der SBP2-Patienten (Dumitrescu et al. 2005). Sowohl die SePP-Konzentration (c) als auch der Gesamt-Se Gehalt (d) war im Serum der Patienten (Aff) signifikant reduziert im Vergleich zu den Geschwister (Un). Zur Analyse kamen 4 Patienten aus 2 unabhängigen Familien (Familie B aus Irland, A aus Saudi Arabien).

Es zeigten sich in beiden Parametern des Se-Status deutlich reduzierte Werte bei den Patienten, was einen generellen Defekt der Selenoprotein Biosynthese nahe legt. Damit konzentrierte sich die Suche nach dem Erbdefekt auf Gene, die für generelle Komponenten der Selenoprotein Biosynthesemaschinerie kodieren (siehe Abbildung 8 und 17). Eine Kopplungs-Analyse schloss wegen mangelnder Comigration der Erkrankung mit Markern auf 3q21.3 den Sec-spezifischen Elongationsfaktor EFsec aus, so dass das SECIS-Bindende Protein 2 (SBP2) als bester potentieller Kandidat übrig blieb. Die Sequenzierung des SBP2 Gens zeigte dann in der Tat in allen betroffenen Patienten Mutationen, die entweder einen Aminosäure-Austausch bewirkten, durch eine Stoppmutation für ein trunkiertes SBP2 Genprodukt kodierten oder eine alternative Splice-Donor Sequenz generierten (Abbildung 23).

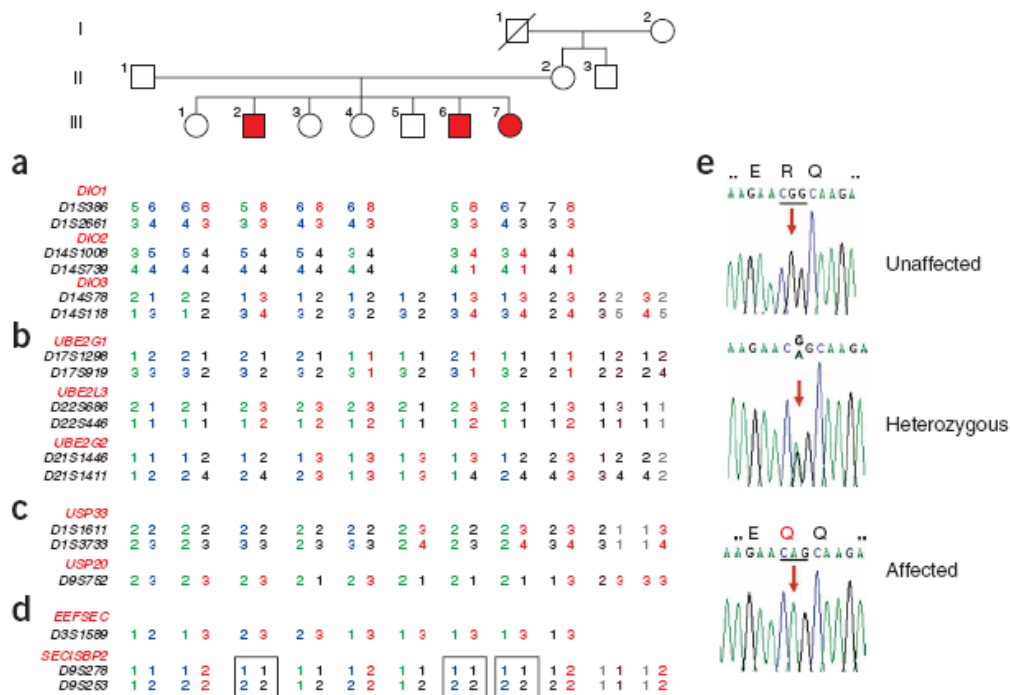


Abbildung 23: Kopplungs-Analyse von Kandidatengenen und Identifizierung von Mutationen im Gen des Sec-spezifischen Elongationsfaktors SBP2 in Patienten mit gestörter Selenoprotein Expression (Dumitrescu et al. 2005). Da die Stabilität von Dio2 posttranslational durch Ubiquitin-abhängige Proteolyse reguliert wird, wurde neben der Kopplungsanalyse der Dio-Isoenzyme (a) auch die Ubiquitin-konjugierenden Enzyme UBE2G1, UBE2L3 und UBE2G2 (b) und die Ubiquitin-Proteasen USP20 und USP33 (c) analysiert. Hier zeigten sich keine Kopplungen mit dem Phänotyp. Der Vergleich mit den Sec-spezifischen Elongationsfaktoren EFsec und SBP2 deutete auf Marker in der Nähe des SBP2-Lokus als potentiell mit der Erbkrankheit assoziierte Sequenzbereiche. Die Sequenzierung des SBP2 Gens der Patienten offenbarte dann in der hier gezeigten Familie eine Missense-Mutation, in der ein CGG-Triplett (Arginin) in ein CAG-Triplett (Glutamin) überführt wurde. Offensichtlich ist das dadurch veränderte SBP2 Protein nicht mehr voll in der Selenoprotein Biosynthese funktionstüchtig.

Diese Arbeit stellt den ersten Bericht über eine erbliche Erkrankung von Komponenten der Selenoprotein Biosynthese Maschinerie dar, und beleuchtet, dass sich Störungen in diesem Stoffwechselweg durch endokrine Aberrationen der Schilddrüsenhormonachse äußern.

Hierbei erwies sich der Sec-spezifische Elongationsfaktor SBP2 als limitierender Faktor bei der Translation von Selenoproteinen, insofern könnten weitergehende Studien, die sich mit der endogenen Regulation der Expression dieses nicht-Selenoproteins befassen, neue Einsichten zur Kontrolle des Se-Metabolismus liefern. Gerade für den unten ausgeführten Geschlechterdimorphismus bei der Expression von Selenoproteinen (siehe Abschnitt 2.3.2) könnte ein solches Unterfangen wichtige grundlegend neue Einsichten generieren.

2.3.2 Riese C, Michaelis M, Mentrup B, Götz F, Köhrle J, Schweizer U und Schomburg L, *Endocrinology* 147, 5883-92, 2006. (ANLAGE F)

Bei der Analyse des Phänotyps des SePP-KO Modells fiel auf, dass nur die männlichen SePP-KO Mäuse an einer kompletten Infertilität litten, nicht aber die weiblichen Tiere (Hill et al. 2003; Schomburg et al. 2003). Auch das Ausmaß des Wachstumsdefizits, die Stärke und Häufigkeit epileptischer Anfälle und das spontane Versterben im Zeitraum des Absetzens vom Muttertier zeigte eine klare Präferenz für männliche Mäuse. Diese Beobachtungen erforderten eine geschlechterspezifische Analyse des Se-Status und der Expression von Selenoenzymen in den Geweben. Daten aus der Literatur zu z.B. der geschlechterspezifischen Expression von Dio1 sind uneinheitlich und widersprüchlich (Riese et al. 2006). Der Vergleich der Serum-Se Konzentrationen in löslicher und durch Trichloressigsäure (TCA) präzipitierbarer Form zeigte, dass sich diese generellen Biomarker des Se-Status zwischen den Geschlechtern nicht unterscheiden (Abbildung 24). Hingegen war die Aktivität der extrazellulären GPx-3 im Serum von Weibchen höher als bei Männchen.

1A

Serum Se [ $\mu\text{g/l}$ ]	
female	351 $\pm$ 25
male	331 $\pm$ 30

1B

Serum Se [ $\mu\text{g/l}$ ] (precipitable fraction)	
female	295 $\pm$ 18
male	288 $\pm$ 17

1C

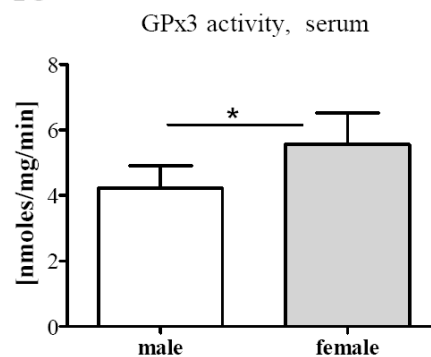


Abbildung 24: Geschlechterspezifischer Vergleich der Serum Se-Konzentrationen und GPx-3 Aktivitäten (Riese et al. 2006). Männliche und weibliche C57BL/6 Mäuse wurden auf normaler Mausdiät bis zum Lebensstag 35 (P35) herangezogen. Der Se-Gesamtgehalt des Serums (1A) und die durch TCA präzipitierbaren Se-haltigen Anteile (1B) wurden bestimmt und zeigten sich als nicht vom Geschlecht abhängig. Hingegen wiesen Weibchen eine deutlich erhöhte Aktivität der plasmatischen GPx-3 auf (1C), ein Befund, der dem Verhältnis im Menschen entspricht (Rush und Sandiford 2003).

Da die genetische Inaktivierung des SePP-Gens einen starken geschlechterspezifischen Phänotyp hervorrief, wurden in einem nächsten Schritt die mRNA Konzentrationen in männlichen und weiblichen Geweben verglichen. Hier zeigten sich drastische



geschlechterspezifische Unterschiede der SePP mRNA-Konzentrationen sowohl in Leber als auch in Niere (Abbildung 25). Interessanterweise war das Expressionsprofil in diesen beiden Organen gegenläufig, so dass Männchen eine höhere renale aber niedrigere hepatische SePP mRNA Konzentration aufwiesen.

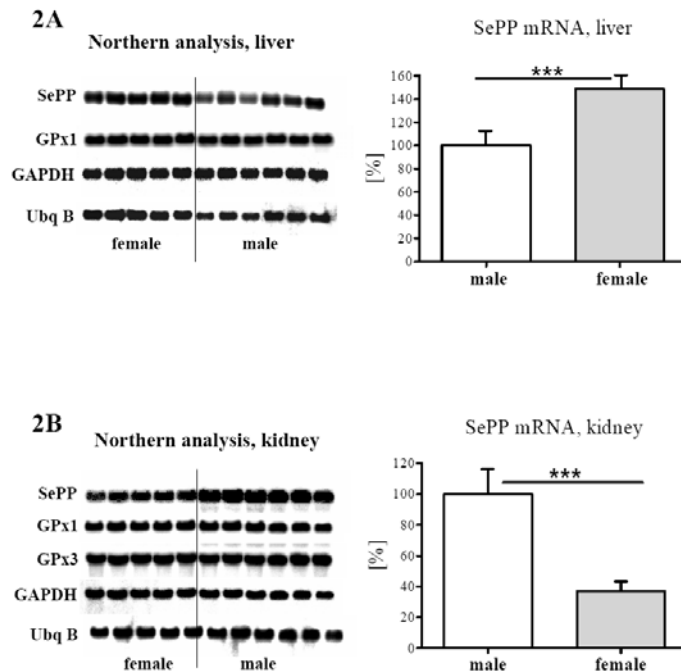


Abbildung 25: Vergleich der SePP mRNA-Konzentrationen in Leber und Niere von männlichen und weiblichen C57BL/6 Mäusen (Riese et al. 2006). Während die mRNA Konzentrationen der ubiquitären GPx-1 und der extrazellulären GPx-3 keinen ausgeprägten Geschlechterdimorphismus aufweisen, unterscheiden sich die Transkriptmengen von SePP deutlich in Leber (2A) und Niere (2B) von weiblichen (female) und männlichen (male) Versuchstieren.

Die Analysen des SePP-KO Modells hatten gezeigt, dass SePP als Se-Transport und Speicherprotein den Se-Status einzelner Gewebe kontrollieren kann. Deshalb wurden angesichts der dimorphen SePP mRNA Expressionen auch die Se-Gewebekonzentrationen in Leber und Niere analysiert (Abbildung 26). Hier zeigten sich keine Unterschiede.

Se tissue concentration [ng/mg protein]	
Liver, female	2.1 ± 0.3
Liver, male	2.1 ± 0.4
Kidney, female	2.4 ± 0.5
Kidney, male	2.5 ± 0.6

Abbildung 26: Vergleich der Se-Gehalte von Leber und Niere aus männlichen und weiblichen Mäusen (Riese et al. 2006). Es zeigten sich keine geschlechterabhängigen Unterschiede, die Gewebekonzentrationen lagen durchgehend bei 2,1 bis 2,5 ppm Se.

Die Patienten mit dem geerbten Defekt im SBP2 Gen entwickelten eine Störung der Schilddrüsenhormonachse (siehe 2.3.1), deshalb wurde auch ein gezielter geschlechter-spezifischer Vergleich der Dio Expressionen durchgeführt (Abbildung 27). Hier waren wiederum deutliche Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Geweben erkennbar. Da die Literaturdaten bei ähnlichen Vergleichen sehr heterogene Ergebnisse lieferten, kam die Vermutung auf, dass neben dem Geschlecht auch der aktuelle Se-Status einen Einfluss auf die dimorphe Expression von Dio1 haben könnte. Daraufhin wurden Mäuse unter Normalbedingungen und unter Se-Mangelfutter herangezogen und verglichen (Abbildung 27). Hier erwies sich neben dem Geschlecht auch der Se-Status von entscheidender Bedeutung für die Ausprägung dieses sexuellen Dimorphismus der Expression von Dio1.

	Liver		Liver		Kidney		Kidney	
	regular diet		Se-poor diet		regular diet		Se-poor diet	
	male	female	male	female	male	female	male	female
<b>transcript</b>	1.00	1.42*	1.00	1.80*	1.00	1.53**	1.00	4.55***
<b>activity</b>	1.00	0.36***	1.00	0.83	1.00	1.84***	1.00	4.21***
<b>protein/transcript</b>	<b>1.00</b>	<b>0.25</b>	<b>1.00</b>	<b>0.46</b>	<b>1.00</b>	<b>1.20</b>	<b>1.00</b>	<b>0.93</b>

Abbildung 27: Vergleich der mRNA Konzentrationen (transcript) und Dio1 Enzymaktivitäten (activity) in Leber und Niere von männlichen und weiblichen C57BL/6 Mäusen auf Normaldiät (regular diet) oder auf Se-Mangeldiät (Se-poor diet) (Riese et al. 2006). Der sexuelle Dimorphismus der Dio1 Expression wird besonders deutlich, wenn das Verhältnis der Enzymaktivität mit relativen mRNA-Konzentrationen gebildet (letzte Zeile: protein/transcript) und zwischen den Geschlechtern verglichen wird. Hierbei wurden zu Darstellungszwecken die Werte im Männchen auf 1,00 gesetzt. Unter der Se-Mangeldiät verstärken sich die Unterschiede auf mRNA-Ebene, wohingegen sich die Aktivitätsspiegel in der Leber angleichen und in der Niere noch divergenter entwickeln.

Anhand der Ergebnisse zur Bedeutung des Sec-spezifischen Elongationsfaktors SBP2 in den identifizierten Patienten (siehe oben) wurde durch quantitative Real-Time PCR Analyse schließlich die Expression von SBP2 zwischen männlichen und weiblichen Geweben verglichen. Hierbei ergaben sich keine Unterschiede, die diesen Geschlechterdimorphismus in der Dio1 Expression erklären könnten (Riese et al. 2006). Somit bleibt die molekulare Ursache dieses offensichtlichen Unterschieds der Translationseffizienz in Abhängigkeit vom Geschlecht und vom Se-Status noch unbekannt. Nichtsdestotrotz zeigen diese Ergebnisse eindeutig, dass die sexuell dimorphe Expression von Selenoproteinen auf mindestens zwei unterschiedlichen Ebenen reguliert wird: bei der Transkription und bei der Translation.

Der unter 2.3.2 beschriebene Geschlechterunterschied bei der Biosynthese und Expression von Selenoproteinen ist zunächst ausschließlich im Tierexperiment beobachtet worden. Es bleibt die Frage, ob diese Befunde auch für den Se-Stoffwechsel im Menschen, die menschliche Gesundheit und die Biosynthese der humanen Selenoproteine von Bedeutung sind. Entsprechende Analysen sind im Menschen nicht durchführbar, und publizierte Ergebnisse zu den Wirkungen von Se-Supplementationen sind in den wenigen verfügbaren Studien meist nicht explizit auf einen Geschlechterunterschied aufgrund unzureichender Größe entweder der männlichen oder der weiblichen Teilnehmergruppen analysiert und publiziert worden (siehe hierzu auch Abbildung 5).

Medizinisch besonders eindrucksvoll und überzeugend stellt sich die Datenlage bei einer Se-Supplementation in der Sepsis dar. Im Tiermodell zeigte sich, dass die Plasma Se-Konzentration in der Akutphase stark abfällt (Maehira et al. 2002). Hierzu könnte die in Zellkultur beobachtete negative Regulation der SePP Expression in Hepatozyten durch proinflammatorische Zytokine beitragen (Dreher et al. 1997; Mostert et al. 2001). Da die Biosynthese von SePP auch durch den verfügbaren Pool von Sec-beladener tRNA<sup>SEC</sup> reguliert wird, ist es naheliegend, dass eine Se-Supplementation die SePP Synthese und damit den Serum Se-Spiegel wieder normalisieren könnte. Auf der Intensivstation bei septikämischen Patienten, bei denen sich ein starker Verlust von Se während der Erkrankung einstellte, wurde beobachtet, dass sich dieser Mangel negativ auf das Überleben und die Erkrankungsausprägung auswirkte (Forceville et al. 1998; Angstwurm et al. 1999).

Nun ist recht aktuell eine großangelegte multizentrische Studie zum Effekt einer entsprechenden Se-Supplementation mit Natriumselenit auf die Mortalität und Morbidität bei Sepsis durchgeführt worden (Angstwurm et al. 2006). Hier zeigten sich drastische Effekte, die Se als mitentscheidenden Parameter für den Krankheitsverlauf einer Sepsis belegen, i.e., die 28-Tage Überlebensrate betrug in der Plazebo-Gruppe nur 50,0% und fiel in der Se-Gruppe auf 39,7% ab. Allerdings zeigt die Detailanalyse retrospektiv, dass auch hier ein entscheidender Unterschied im hepatischen Se-Metabolismus zwischen den Geschlechtern vorliegen könnte. Während sich in der Gruppe der männlichen Sepsispatienten die Natriumselenitgabe sehr eindeutig und positiv auf die Überlebensrate auswirkt, ist dieser Effekt nicht einmal als Tendenz in der deutlich kleineren Gruppe der weiblichen Patienten erkennbar (Schomburg 2007). Ursächlich hierfür könnte die noch ungenügende Gruppengröße sein, oder ein Unterschied im Selenmetabolismus, wie er von uns im Tiermodell beschrieben wurde (Riese et al. 2006). Letztendlich werden hier größer angelegte

Supplementationsstudien Klarheit bringen müssen. Unsere Detailstudien zu den mRNA-Expressionsprofilen, die bei unterschiedlichem Se-Status in männlichen und weiblichen Lebern von erwachsenen Mäusen erhoben werden können, belegen deutliche Unterschiede in der Responsivität zwischen den Geschlechtern (Abbildung 28).

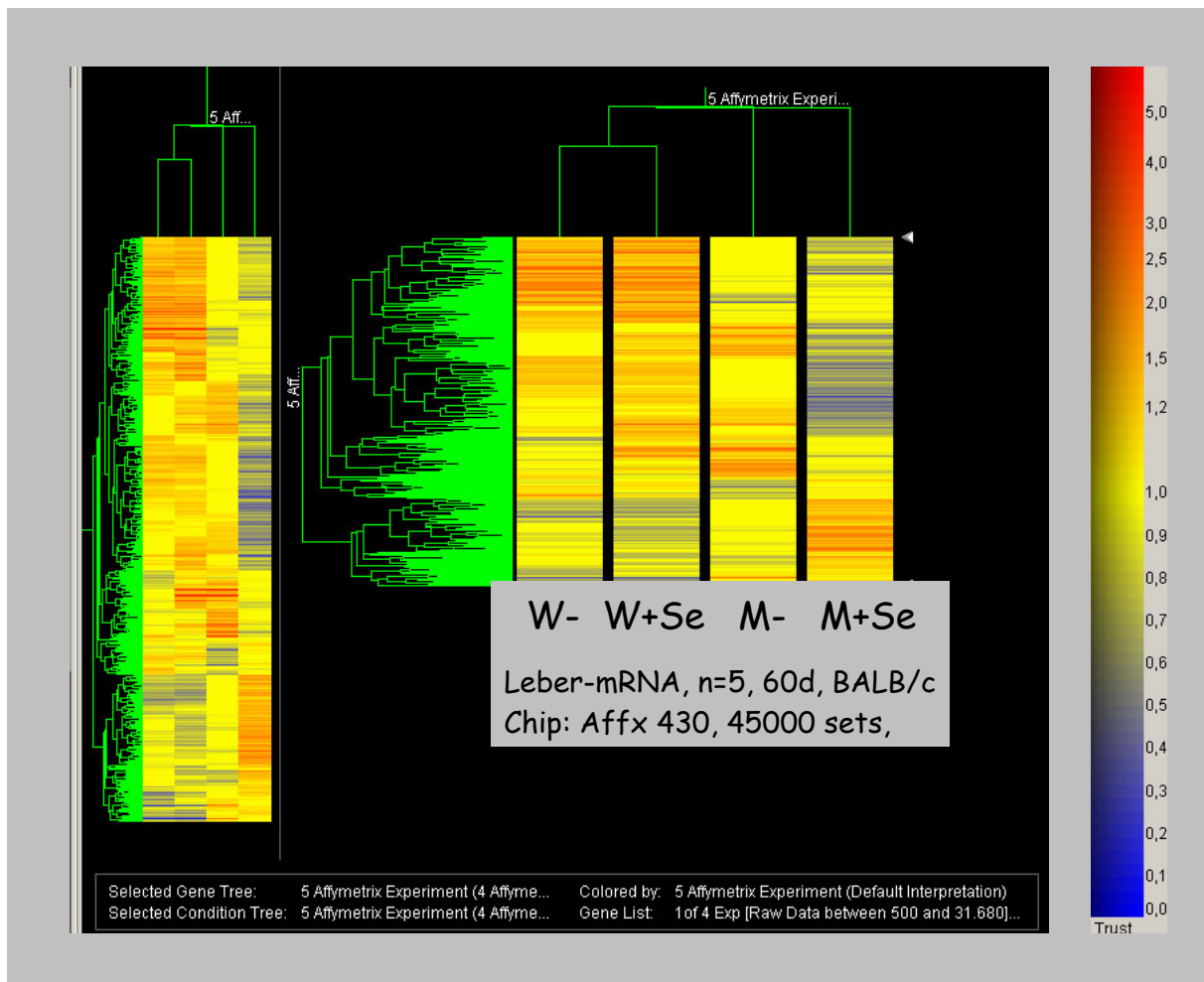


Abbildung 28: Transkriptomanalyse aus Leber von erwachsenen weiblichen (W) und männlichen (M) BALB/c Mäusen auf Se-reichem (+Se) oder Se-Mangel(-)Futter (L. Schomburg et al., noch unpubliziert). Jede horizontale Linie repräsentiert die Expressionsstärke eines von ca. 22000 detektierten Transkripten (gelb: durchschnittlich starke Expression; rot: erhöhte und blau: erniedrigte mRNA Konzentration). Die vertikalen Spalten stellen die Ergebnisse für die 4 verglichenen mRNA-Präparationen dar (von links nach rechts: W-, Weibchen: Se-arm; W+Se: Weibchen: Se-reich, M-, Männchen: Se-arm; M+Se: Männchen: Se-reich). Das jeweilige Dendrogramm über den Spalten drückt die Ähnlichkeit der Expressionsprofile aus, und offenbart, dass sich ein veränderter Se-Status deutlich stärker in der männlichen als in der weiblichen Leber auswirkt. Datenerhebung und Visualisierung erfolgte in Kooperation mit Dr. U. Ungethüm und Dr. R.-J. Kuban, LFCG, Charité.

Während sich die mRNA Konzentrationen vieler Gene in den Lebern der weiblichen Tiere in Abhängigkeit vom Se-Status nur geringfügig veränderten, zeigten die Profile aus männlichen

Lebern nur noch wenig Ähnlichkeit zueinander, so dass hier die Wirkung des diätetisch geänderten Se-Status zu deutlichen Verschiebungen im Intermediärstoffwechsel führen dürfte. Bis die zugrunde liegenden molekularen und physiologischen Konsequenzen einer Se-Supplementation besser eingeschätzt werden können, sollte deshalb eher präventiv bei geringem Se-Status eines Patienten vor einem chirurgischen Eingriff bzw. einer andersartigen intensiven Therapie eine kontrollierte Se-Supplementation in der empfohlenen Dosierung erfolgen. Diese Prävention wäre sicher auch generell in der bundesdeutschen Bevölkerung wünschenswert, empfiehlt sich aber gerade bei Krankenhausaufenthalt und im Besonderen vor anstehenden Operationen. Auch in der hier zitierten und kommentierten SIC-Studie (Angstwurm et al. 2006; Schomburg 2007) korreliert die bessere Prognose eindeutig mit einem initial höheren Se-Status. Während sich bei den gut versorgten Patienten kein statistisch signifikanter Effekt durch die Supplementation sondern lediglich ein Trend zeigt, ist der Zusammenhang zwischen Se-Mangel und erhöhter Sterblichkeit in der schlecht versorgten Placebogruppe signifikant und sehr ausgeprägt.

Ein sehr analoges Bild bietet sich auch bei Krebserkrankungen, bei denen sowohl die Inzidenz als auch die Prognose für den Verlauf der Erkrankung eine deutliche Abhängigkeit vom Se-Status und vom Geschlecht aufweist (Rayman 2005). Diese beiden Volkskrankheiten zeigen insofern eine starke Parallele in ihrer Se-Abhängigkeit und deuten auf einen gemeinsamen zugrunde liegenden Mechanismus der Pathogenese und der Se-Wirkung (Schomburg 2007).

### 3 DISKUSSION

Diese Arbeit beschreibt molekulare Mechanismen, die den Se-Status kontrollieren und regulieren. Se wird als essentielles Spurenelement aus der Nahrung aufgenommen, in die 21te proteinogene Aminosäure Sec überführt und für die Synthese von Selenoproteinen genutzt. Hierzu muss es innerhalb des Körpers dem Bedarf entsprechend verteilt und von den Körperzellen effektiv aufgenommen werden. Schon in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde ein Plasmaprotein beschrieben, welches Se als Sec enthält und als Transportprotein fungieren könnte (Motsenbocker und Tappel 1982). Durch die molekulare Identifizierung und Klonierung des Gens für SePP aus Ratte wurde ersichtlich, dass dessen mRNA insgesamt 10 UGA Kodons für den Sec-Einbau im offenen Leseraster aufweist und damit innerhalb der bekannten Selenoproteine einzigartig ist (Hill et al. 1991). Dieser Se-Reichtum unterstrich die potentielle Funktion als Transportprotein. Nachfolgende Beobachtungen zeigten, dass SePP an Endothelzellen bindet (Burk et al. 1997), Peroxynitrit abbauen kann (Arteel et al. 1998), als neurotropher Faktor für die Kultivierung von Nervenzellen benötigt wird (Yan und Barrett 1998) und PH-GPx-Aktivität in vitro aufweist (Saito et al. 1999). Zusammengenommen deuteten diese Studien auf ein komplexes und mannigfaltiges Aktivitätsspektrum von SePP hin (Burk und Hill 2005).

Diese Einschätzung wurde durch die hier beschriebenen Analysen der transgenen Mausmodelle und endokrinen Patienten bestätigt und erweitert. Entgegen der persönlichen Erwartung waren SePP-KO Mäuse lebensfähig und zunächst phänotypisch unauffällig. Diese Beobachtung belegt bereits, dass SePP im Gegensatz zu der Sec-spezifischen tRNA<sup>SEC</sup> (Bosl et al. 1997), der PH-GPx (Yant et al. 2003) oder der TrxR-1 oder -2 (Conrad et al. 2004; Jakupoglu et al. 2005) nicht essentiell ist. Ob dieser Befund auch für den Menschen gilt, bleibt fraglich. Bis dato sind noch keine erblich bedingten SePP-defizienten Patienten beschrieben, ein Umstand, der auf die Essentialität von SePP im Menschen schliessen lässt oder auf den Mangel an geeigneter Technik zur Identifikation eines solchen Defizits und entsprechend durchgeführter Reihenanalysen. Der Aufbau eines sensitiven Assays zur Quantifizierung von SePP aus menschlichen Serumproben ist in den letzten Monaten erfolgt und lässt erwarten, dass wir diese Frage in naher Zukunft beantworten werden können.

Nichtsdestotrotz zeigten die SePP-KO Mäuse ein Wachstumsdefizit, neurologische Ausfälle und Infertilität bei den Männchen. Hierdurch offenbarten sich Se-sensitive Körperfunktionen und eine entscheidende Rolle von SePP im Se-Stoffwechsel, welche bislang bei rein diätetischen Se-Mangelmodellen nicht oder nur bedingt beobachtet werden konnten (Behne et

al. 1988). Die Analyse der Se-Konzentrationen in den unterschiedlichen Organen zeigte, dass SePP-KO Mäuse eine erhöhte Se-Konzentration in der Leber aufwiesen, nicht aber in den anderen Organen. Diese Beobachtung erlaubt den Rückschluss, dass Nahrungs-Se auch ohne SePP effektiv aufgenommen und in die Leber transportiert werden kann. Bei SePP-Mangel hingegen wird das hepatische Se-Angebot für die Biosynthese anderer Selenoproteine genutzt, wie z.B. für das ubiquitäre Selenoprotein GPx-1, welches generell sehr sensitiv auf Änderungen des Se-Status reagiert und als intrazelluläres funktionales Se-Speicherprotein dient (Lei und Cheng 2005). Diese Veränderung der Selenoprotein-Biosynthese bei SePP-Defizienz in SePP-KO Mäusen erhöht daraufhin hepatische GPx Aktivität unter reduzierter SePP Freisetzung und bedingt einen nachfolgenden Se-Mangel im Plasma. Somit kommt der Leber, auch unter Normalbedingungen, die zentrale Rolle der Se-Aufnahme, Biokonversion, SePP-Synthese und -Sekernierung ins Plasma zu.

Diese Schlussfolgerung konnten wir nach selektiver und kompletter Inaktivierung der hepatischen Selenoprotein-Biosynthese durch die gezielte Trsp Inaktivierung bestätigen, denn hierdurch sank die Plasma-Se Konzentration ebenso stark wie unter genereller SePP-Deletion (Schweizer et al. 2005). Da der SePP-Mangel die Ausprägung der Se-abhängigen Defizite in den SePP- und Se-abhängigen Geweben wie Gehirn oder endokrinen Drüsen bewirkt, und dieses SePP hauptsächlich der hepatischen Selenoprotein Biosynthese entstammt, kommt der Kontrolle des anabolen hepatischen SePP-Synthese Stoffwechselweges eine entscheidende Bedeutung für den Se-Status zu. In diesem Zusammenhang erscheinen die Befunde, dass eine Leberentzündung mit verringerter Se-Plasmakonzentration korreliert (Look et al. 1997), über die detailliert beschriebene Reduktion der SePP-Expression durch proinflammatorische Zytokine in Hepatozyten (Dreher et al. 1997) nahe liegend und nun molekular gut erklärbar. Allerdings werden aber unter diesen Umständen offenbar nicht nur die SePP-Transkription sondern auch zentrale Sec-spezifische Komponenten der hepatischen Biosynthese-Maschinerie herunterreguliert, so dass eine generelle Störung des Se-Stoffwechsels als Antwort auf inflammatorische Signale resultiert und das Krankheitsbild verstärkt.

Diese systematische Reduktion der hepatischen Selenoprotein-Biosynthese kann aber offensichtlich durch geeignete Supplementationsansätze wie z.B. in den klinischen Studien mit Sepsis-Patienten, überwunden werden (Forceville et al. 1998; Angstwurm et al. 1999; Angstwurm et al. 2006). Diese Beobachtung entspricht dem grundlegenden Prinzip des Massenwirkungsgesetzes, da durch erhöhtes Substratangebot (in diesem Fall Natriumselenit) die Produktmenge (Selenoproteine) gesteigert wird. Im Detail bedarf es aber sowohl einer gesteigerten Rate an Sec-tRNA<sup>SEC</sup> Biosynthese, der ausreichenden Verfügbarkeit der trans-

agierenden Faktoren EFsec und SBP2, einer genügenden Anzahl L30-beladener Ribosomen und der Möglichkeit, die Translationseffizienz der verfügbaren Selenoprotein mRNA ohne de novo Transkription deutlich zu steigern. Diese Komplexität der zu fordernden Voraussetzungen für die erfolgreiche Steigerung der hepatischen krankheitsbedingt-reduzierten Selenoprotein-Biosynthese durch Natriumselenit-Supplementation verdeutlicht, dass eine einheitliche Antwort unterschiedlicher Individuen auf diese Therapie nicht vorausgesetzt werden kann.

In diesem Zusammenhang ist der beobachtete Geschlechterunterschied im SePP-KO Mausmodell von Bedeutung. Bei gleicher Fütterung unterscheidet sich die Ausprägung des Se-abhängigen Phänotyps drastisch zwischen männlichen und weiblichen Nachkommen desselben Elternpaares (Hill et al. 2003; Schomburg et al. 2003). Diese Beobachtung ist in Bezug auf Se-Metabolismus und Se-abhängige Mausmodelle derzeit noch relativ einzigartig. Generell ist die Zucht- und Haltungsdiät für Nager sehr Se-reich und führt unter Normalbedingungen zu Se-Konzentrationen im Serum von ca. 400 µg/L. Diese Serumkonzentration kann auch in SePP-KO Mäusen bei artifizieller Se-Supplementation über angereichertes Futter oder Trinkwasser erreicht werden und überdeckt dann die deutliche Ausprägung des Phänotyps (Schweizer et al. 2004). Ein ähnlicher Mechanismus mag auch in anderen transgenen Mausmodellen, die zur Analyse der Funktion spezifischer Selenoproteine generiert wurden, dafür verantwortlich sein, dass geschlechterspezifische Unterschiede nicht deutlich auftreten und beschrieben worden sind. Dieser Zusammenhang von geschlechterabhängiger Selenoprotein-Biosynthese und gewebespezifischem Se-Status wurde in unseren Detailstudien zur geschlechterspezifischen Expression von Selenoproteinen besonders unter Se-Mangelbedingungen sehr evident (Riese et al. 2006). Gerade in der Leber zeigten sich hier deutliche geschlechter- und Se-Status-abhängige Unterschiede, die dafür verantwortlich sein könnten, dass unterschiedliche Individuen in den klinischen Se-Supplementationsstudien unterschiedlich gut auf die Natriumselenitgabe reagierten (Angstwurm et al. 2006; Schomburg 2007).

Die molekularen Analysen zu den hierfür verantwortlichen Komponenten der Selenoprotein-Biosynthesemaschinerie haben bislang auf RNA-Ebene mehrere potentiell limitierende Faktoren (SBP2, EFsec, L30, SPS2 und  $\beta$ -Lyase) weitgehend ausschließen können (Riese et al. 2006). Allerdings mehren sich die Hinweise, dass gerade die Translation von Selenoproteinen und der Abbau von Selenoprotein mRNA maßgeblich durch die subzelluläre Lokalisation sowohl des Transkriptes als auch der trans-agienden Translationsfaktoren kontrolliert wird (Chavatte et al. 2005; de Jesus et al. 2006; Papp et al. 2006). Im Besonderen



hat sich die subzelluläre Lokalisation des Translationsfaktors SBP2, der sich in Patienten als limitierend für die Gesamtselenoprotein Biosyntheserate erwiesen hat (Dumitrescu et al. 2005), als nicht konstant sondern durch eine Veränderung des intrazellulären Redox-Status veränderbar erwiesen (Papp et al. 2006). Unter inflammatorischen Bedingungen erfolgt die Translokation von SBP2 aus dem Cytosol in den Zellkern, und damit eine Unterbrechung der Selenoprotein-Biosynthese. Inwieweit dieser Prozess in vivo abläuft und für die beobachteten Unterschiede der Selenoprotein Biosynthese in männlichen und weiblichen Organen verantwortlich gemacht werden muss, kann zurzeit noch nicht abschließend beurteilt werden. Diese Regulation der intrazellulären Lokalisation von Faktoren, die limitierend für die Translation von Selenoproteinen sind, stellt aber eine überaus attraktive Hypothese für das molekulare Verständnis des Geschlechterunterschiedes und der Inflammations-abhängigen Reduktion der Biosynthese von Selenoproteinen dar.

Die zu erwartende Gewebespezifität dieser Prozesse kompliziert das Bild und bleibt zu klären. Denn gerade der Se-Metabolismus ist durch zwei hierarchische Prinzipien gekennzeichnet. Einerseits wird die Expression der Selenoproteine nicht gleichermaßen durch die Se-Verfügbarkeit reguliert, d.h., es gibt Selenoproteine (z.B. GPx-1 oder SelW), welche bei Se-Mangel nur noch marginal synthetisiert werden, während andere Selenoproteine (PH-GPx) präferentiell versorgt und weitgehend unabhängig vom Se-Status sind (Bermano et al. 1995; Gross et al. 1995; Wingler et al. 1999). Andererseits können die unterschiedlichen Gewebe nicht gleichermaßen gut ihre Se-Konzentration in Mangelzeiten aufrechterhalten, wobei sich das zentrale Nervensystem und die endokrinen Drüsen als besonders effektiv in der Se-Retention erwiesen haben (Behne et al. 1988). Die molekularen Mechanismen, die diesen Hierarchien zugrunde liegen, erscheinen äußerst komplex und beinhalten ausgefeilte mRNA- und gewebespezifische Besonderheiten und Regulationswege.

Bei den Transkripten ist die Interaktion des SECIS-Elementes, und somit des 3'-untranslatierten Bereiches der mRNA, mit den trans-agenrenden Faktoren, und hier in erster Linie mit SBP2, entscheidend für die Translationseffizienz (Bermano et al. 1996; Wingler et al. 1999; Low et al. 2000; Mehta et al. 2004). Inwieweit das UGA-Kodon, und eventuell auch die diesem Kodon benachbarten Nukleotide, die Effizienz des Sec-Einbaus und darüber die Translationseffizienz mitbestimmen, ist zurzeit noch umstritten (Driscoll und Copeland 2003). Die zweite ähnlich enigmatische Hierarchie in der Se-Biologie betrifft die Organebene. Hier erwies sich das SePP-KO Modell als hilfreich für das Verständnis der molekularen Stoffwechselwege, die zur präferentiellen Versorgung bestimmter Organe beitragen. Generell ist das zentrale Nervensystem relativ unabhängig von der diätetischen Se-Zufuhr, und

Versuchstiere halten auch noch nach vielen Generationen auf Se-armer Diät ihre Se-Konzentration im Gehirn weitgehend unverändert, während Leber und Serum fast Se-frei werden (Savaskan et al. 2003). SePP-KO Mäuse entwickeln hingegen neurologische Ausfallerscheinungen und einen Se-Mangel im Gehirn, der sich auch in verminderter GPx-Aktivität äußert (Schomburg et al. 2003). Diese Daten belegen, dass SePP für die Retention von Se im Gehirn essentiell ist. Die darüber hinaus gehende Beobachtung, dass eine Hepatozyt-spezifische SePP-Deletion, die ebenso wie der komplette SePP-KO die Se- und SePP-Konzentration im Serum drastisch reduziert, sich nicht negativ auf die Se-Konzentration im Gehirn auswirkt, offenbart die zentrale Bedeutung der intrazerebralen SePP-Expression für die prominente Stellung des Gehirns in der Hierarchie der Se-Versorgung (Richardson 2005; Schweizer et al. 2005).

Diese Beobachtungen, zusammen mit der Bedeutung von SePP als neurotrophem Faktor für die Kultivierung von Neuronen *in vitro* (Yan und Barrett 1998) und die selektive Verteilung von SePP auch im menschlichen Gehirn (Scharpf et al. 2007), belegen die essentielle Funktion von SePP in der gewebespezifischen Se-Homöostase. Im Einklang mit diesen Beobachtungen lässt sich ein SePP-Zyklus im zentralen Nervensystem postulieren, in dem SePP als extrazelluläre Se-Speicherform fungiert, die nach proteolytischer Spaltung und damit einhergehender verbesserter Aufnahme (Hirashima et al. 2003) reversibel synthetisiert, sezerniert und als Se-Quelle genutzt wird (Schomburg et al. 2004). Die hierdurch nahe liegende Verallgemeinerung, dass dieser SePP-Zyklus auch den hierarchisch präferentiellen Se-Status der endokrinen Organe erklären kann, trifft nicht zu. Im Hoden erfährt das abundante Selenoprotein PH-GPx eine Struktur- und Funktionswandlung vom aktiven Enzym zum zytoskelettalen Bestandteil und wird vermutlich dadurch dem reversiblen Se-Pool entzogen (Ursini et al. 1999). Die Schilddrüse als Se-reichstes Organ vermag SePP-unabhängig vom Se-Status auch bei Se-Mangelversorgung zu erhalten und benutzt dabei bislang noch nicht charakterisierte Mechanismen (Riese et al. 2006). Eventuell ist auch in diesem Organ eine nicht-reversible extrazelluläre kovalente Fixierung einer GPx-Isoform, i.e. der extrazellulären GPx-3, im Kolloid der Schilddrüse für den präferentiellen Se-Status verantwortlich (Beckett und Arthur 2005; Köhrle et al. 2005). Die entsprechenden Studien und Analysen mit z.B. GPx-3-defizienten Mäusen stehen noch aus und dürften für diesen Aspekt eindeutige Antworten erlauben.

Die Identifizierung der ersten Patienten mit einem Defekt in der Selenoprotein-Biosynthese, i.e. mit SBP2-Mutationen, schließt den Kreis von hierarchischer Se-Versorgung, mRNA-Struktur und Organspezifität (Dumitrescu et al. 2005). Im Vergleich zu Individuen mit sehr

schlechtem Se-Status, die durch eine voll funktionale Selenoprotein Biosynthesemaschinerie den verfügbaren Sec- und Se-Pool für die Synthese der biologisch benötigten Selenoproteine sicherstellen und kanalisieren können, ist diese bedarfsangepasste Regulation in den SBP2 Patienten gestört. Hier erfolgt durch den Mangel an funktionellem SBP2 eine generelle Reduktion der Biosynthese aller Selenoproteine in allen Geweben. Dass unter diesen Bedingungen gerade der Schilddrüsenhormonhaushalt pathologisch auffällig geworden ist, kann angesichts der vielen transgenen Mausmodelle, die nach erfolgter Inaktivierung der Dio- Gene keinen solchen Phänotyp zeigten (St Germain et al. 2005; Streckfuss et al. 2005), als unerwartet und eine Ironie der Natur gewertet werden. Glücklicherweise kann der Se-Status und damit eine ungestörte Selenoprotein Biosynthese aus dem menschlichen Serum über die Quantifizierung von SePP verifiziert werden. Dieser Weg der Analyse wird aus großen Kollektiven die im Menschen relevanten Komponenten der Selenoprotein Biosynthese identifizieren helfen, denn neben einer gestörten Schilddrüsenhormonachse dürfte gerade die Biosynthese des Se-reichen Transport- und Speicherprotein SePP einen vorzüglichen Indikator und Surrogatmarker für eine Störung der Selenoprotein-Biosynthesemaschinerie darstellen.

## 4 ZUSAMMENFASSUNG

Dem essentiellen Spurenelement Selen (Se) kommt seit der Beschreibung und Identifizierung von Selenocystein (Sec) als 21ter proteinogener Aminosäure eine einzigartige Bedeutung in der Biochemie und Physiologie zu. Eine kleine gut definierte Gruppe von Selenoproteinen nutzt die besonderen chemischen und physikalischen Eigenschaften von Sec, um bestimmte Reaktionen zu katalysieren, die zur Kontrolle des Intermediärstoffwechsels, des intrazellulären Redoxgleichgewichtes und zum antioxidativen Schutz beitragen. Manche dieser Funktionen und damit einzelne Sec-abhängige Enzyme sind lebensnotwendig für die Einzelzelle bzw. den Gesamtorganismus. Entsprechend genau und stringent wird die Verteilung und Verwertung des Spurenelementes und die Selenoprotein Biosynthese reguliert. Zwei hierarchische Prinzipien haben sich im Säuger herausgebildet, die sicherstellen, dass besonders essentielle Organe wie das Zentrale Nervensystem und die endokrinen Drüsen und besonders wichtige Selenoproteine wie die Glutathion Peroxidase 4 (GPx-4) und die Iodothyronin-Deiodasen präferentiell versorgt werden.

Gegenstand dieser Schrift sind Untersuchungen zur Biosynthese, zur Funktion und biologischen Bedeutung des Se-reichen Plasmaproteins Selenoprotein P (SePP). Die mRNA von SePP unterscheidet sich von allen anderen Transkripten durch zwei Sec-Insertions Sequenz Elemente im 3'-untranslatierten Bereich und kodiert den Einbau von 10 Sec Resten in ein SePP-Molekül. Die genetische Inaktivierung des murinen SePP-Genes zeigte Se-abhängige Ausfallerscheinungen wie Wachstumsdefekte, Infertilität der Männchen und zentralnervöse Defizite. Die Analyse der Expression der enzymatisch aktiven Selenoproteine und der Se-Gewebekonzentrationen verifiziert die Hypothese, dass SePP von der Leber aus den Transport des diätetisch zugeführten Se in die anderen Organe vermittelt. Zusätzlich nutzt das Zentrale Nervensystem einen reversiblen SePP-Synthese und -Abbau Zyklus, während die Schilddrüse auch SePP-unabhängig ihren Se-Status aufrechterhalten kann. Interessanterweise entwickelten die ersten Patienten mit einem Biosynthesedefekt der Selenoproteine Störungen ihrer Schilddrüsenhormonachse und ihres SePP-Status. Der Vergleich der Biosyntheseraten verschiedener Mausgewebe zeigte, dass es eminente Unterschiede in der Translationseffizienz von Selenoproteinen zwischen den Geschlechtern gibt. Auch dieser Befund spiegelt sich in klinischen Studien zur Selenwirkung wider.

Die Ergebnisse belegen, dass die Biokonversion und der Transport von Se durch SePP maßgeblich vermittelt werden, und Störungen der SePP-Biosynthese sich negativ auf die Funktion der Zelle, bestimmter Organe und damit die Gesundheit des Gesamtorganismus auswirken. SePP stellt damit einen vorzüglichen funktionalen Biomarker des Se-Status dar.

## SUMMARY

The essential trace element selenium (Se) has acquired an unparalleled status for biochemistry and physiology since the identification of the 21<sup>st</sup> proteinogenic amino acid selenocysteine (Sec). The unique physical and chemical properties of Sec are exploited by a small number of selenoproteins which catalyse reactions that are of prime importance for general metabolism, intracellular redox-balance and antioxidative defense. Some of these reactions and some of the responsible selenoenzymes are essential for cellular functions and survival of the organism. Accordingly, metabolism, transport and distribution of the trace element and biosynthesis of selenoproteins are stringently controlled and regulated. Two hierarchical principles have developed that guarantee distribution of the trace element to vitally important organs such as the central nervous system or the endocrine glands, as well as to the most essential selenoproteins such as glutathione peroxidase 4 and the iodothyronine deiodinases.

This work describes analyses on biosynthesis, function and biological role of the Se-rich plasma protein selenoprotein P (SePP). SePP mRNA is unique with respect to the presence of two individual Sec-insertion sequence elements in the 3'-untranslated region, which direct the cotranslational insertion of 10 Sec residues per synthesized SePP molecule. Genetic inactivation of murine SePP yielded mice that displayed Se-dependent deficiency symptoms, e.g. growth defects, male infertility and neurological deficits. The analysis of selenoenzyme expression and tissue Se concentrations verified the hypothesis that SePP serves as a hepatically-derived carrier to supply the other organs with Se from the diet. Moreover, the central nervous system seems to employ a reversible SePP biosynthesis and degradation cycle while the thyroid gland appears to sustain its Se concentrations independent from SePP. Interestingly, the first human patients with inherited defects in the selenoprotein biosynthesis machinery displayed a disturbed thyroid hormone feedback axis. Upon comparison of selenoprotein expressions in male and female tissues it became obvious that selenoprotein biosynthesis displays sexual dimorphic rates in mice. This unexpected gender difference appears to be also reflected in human Se supplementation studies.

The results highlight that SePP is a crucial component for Se metabolism and transport. Disturbed SePP biosynthesis interrupts regular functioning of cellular processes and hampers full expression of physiologically important selenoenzymes in the metabolic active tissues, thereby provoking a negative impact on the health of the organism in general.

## 5 LITERATURVERZEICHNIS

- Alfthan, G., G. L. Xu, W. H. Tan, A. Aro, J. Wu, Y. X. Yang, W. S. Liang, W. L. Xue, et al. (2000). "Selenium supplementation of children in a selenium-deficient area in China: blood selenium levels and glutathione peroxidase activities." Biol Trace Elem Res **73**(2): 113-25.
- Allander, E. (1994). "Kashin-Beck disease. An analysis of research and public health activities based on a bibliography 1849-1992." Scand J Rheumatol Suppl **99**: 1-36.
- Angstwurm, M. W., L. Engelmann, T. Zimmermann, C. Lehmann, C. H. Spes, P. Abel, R. Strau, A. Meier-Hellmann, et al. (2006). "Selenium in Intensive Care (SIC) study: Results of a prospective randomized, placebo-controlled, multiple-center study in patients with severe systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock\*." Crit Care Med **35**(1): xx-xx.
- Angstwurm, M. W., J. Schopohl und R. Gaertner (2004). "Selenium substitution has no direct effect on thyroid hormone metabolism in critically ill patients." Eur J Endocrinol **151**(1): 47-54.
- Angstwurm, M. W., J. Schottdorf, J. Schopohl und R. Gaertner (1999). "Selenium replacement in patients with severe systemic inflammatory response syndrome improves clinical outcome." Crit Care Med **27**(9): 1807-13.
- Angstwurm, M. W., J. Schottdorf, J. Schopohl und R. Gärtner (1999). "Selenium replacement in patients with severe systemic inflammatory response syndrome improves clinical outcome." Crit Care Med **27**(9): 1807-13.
- Arteel, G. E., V. Mostert, H. Oubrahim, K. Briviba, J. Abel und H. Sies (1998). "Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration." Biol Chem **379**(8-9): 1201-5.
- Arthur, J. R. (2000). "The glutathione peroxidases." Cell Mol Life Sci **57**(13-14): 1825-35.
- Banerjee, B. D., S. Dwivedi und S. Singh (1997). "Acute hydrogen selenide gas poisoning admissions in one of the hospitals in Delhi, India: case report." Hum Exp Toxicol **16**(5): 276-8.
- Bansal, M. P., T. Mukhopadhyay, J. Scott, R. G. Cook, R. Mukhopadhyay und D. Medina (1990). "DNA sequencing of a mouse liver protein that binds selenium: implications for selenium's mechanism of action in cancer prevention." Carcinogenesis **11**(11): 2071-3.
- Barceloux, D. G. (1999). "Selenium." J Toxicol Clin Toxicol **37**(2): 145-72.
- Beck, M. A., O. A. Levander und J. Handy (2003). "Selenium deficiency and viral infection." J Nutr **133**(5 Suppl 1): 1463S-7S.
- Beckett, G. J. und J. R. Arthur (2005). "Selenium and endocrine systems." J Endocrinol **184**(3): 455-65.
- Behne, D., H. Hilmert, S. Scheid, H. Gessner und W. Elger (1988). "Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins." Biochim Biophys Acta **966**(1): 12-21.
- Bermano, G., J. R. Arthur und J. E. Hesketh (1996). "Role of the 3' untranslated region in the regulation of cytosolic glutathione peroxidase and phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase gene expression by selenium supply." Biochem J **320** ( Pt 3): 891-5.
- Bermano, G., F. Nicol, J. A. Dyer, R. A. Sunde, G. J. Beckett, J. R. Arthur und J. E. Hesketh (1995). "Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats." Biochem J **311** ( Pt 2): 425-30.
- Bermano, G., F. Nicol, J. A. Dyer, R. A. Sunde, G. J. Beckett, J. R. Arthur und J. E. Hesketh (1996). "Selenoprotein gene expression during selenium-repletion of selenium-deficient rats." Biol Trace Elem Res **51**(3): 211-23.

- Berry, M. J., J. W. Harney, T. Ohama und D. L. Hatfield (1994). "Selenocysteine insertion or termination: factors affecting UGA codon fate and complementary anticodon:codon mutations." *Nucleic Acids Res* **22**(18): 3753-9.
- Berry, M. J., G. W. Martin, 3rd und S. C. Low (1997). "RNA and protein requirements for eukaryotic selenoprotein synthesis." *Biomed Environ Sci* **10**(2-3): 182-9.
- Birringer, M., S. Pilawa und L. Flohé (2002). "Trends in selenium biochemistry." *Nat Prod Rep* **19**(6): 693-718.
- Böck, A., K. Forchhammer, J. Heider und C. Baron (1991). "Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code." *Trends Biochem Sci* **16**(12): 463-7.
- Bosl, M. R., K. Takaku, M. Oshima, S. Nishimura und M. M. Taketo (1997). "Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (Trsp)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(11): 5531-4.
- Brigelius-Flohé, R. (1999). "Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases." *Free Radic Biol Med* **27**(9-10): 951-65.
- Brown, D. G. und R. F. Burk (1973). "Selenium retention in tissues and sperm of rats fed a Torula yeast diet." *J Nutr* **103**(1): 102-8.
- Brown, K. M. und J. R. Arthur (2001). "Selenium, selenoproteins and human health: a review." *Public Health Nutr* **4**(2B): 593-9.
- Burk, R. F. und K. E. Hill (2005). "Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis." *Annu Rev Nutr* **25**: 215-35.
- Burk, R. F., K. E. Hill, M. E. Boeglin, F. F. Ebner und H. S. Chittum (1997). "Selenoprotein P associates with endothelial cells in rat tissues." *Histochem Cell Biol* **108**(1): 11-5.
- Burk, R. F., K. E. Hill und A. K. Motley (2001). "Plasma selenium in specific and non-specific forms." *Biofactors* **14**(1-4): 107-14.
- Burk, R. F., K. E. Hill, A. K. Motley, L. M. Austin und B. K. Norsworthy (2006). "Deletion of selenoprotein P upregulates urinary selenium excretion and depresses whole-body selenium content." *Biochim Biophys Acta*.
- Burk, R. F., K. E. Hill, A. K. Motley, L. M. Austin und B. K. Norsworthy (2006). "Deletion of selenoprotein P upregulates urinary selenium excretion and depresses whole-body selenium content." *Biochim Biophys Acta* **1760**(12): 1789-93.
- Cappon, C. J. und J. C. Smith (1981). "Mercury and selenium content and chemical form in fish muscle." *Arch Environ Contam Toxicol* **10**(3): 305-19.
- Carlson, B. A., S. V. Novoselov, E. Kumaraswamy, B. J. Lee, M. R. Anver, V. N. Gladyshev und D. L. Hatfield (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.
- Chavatte, L., B. A. Brown und D. M. Driscoll (2005). "Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes." *Nat Struct Mol Biol* **12**(5): 408-16.
- Clark, R. F., E. Strukle, S. R. Williams und A. S. Manoguerra (1996). "Selenium poisoning from a nutritional supplement." *Jama* **275**(14): 1087-8.
- Conrad, M., C. Jakupoglu, S. G. Moreno, S. Lippl, A. Banjac, M. Schneider, H. Beck, A. K. Hatzopoulos, et al. (2004). "Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function." *Mol Cell Biol* **24**(21): 9414-23.
- Constans, J., M. Seigneur, A. D. Blann, M. Renard, F. Resplandy, J. Amiral, V. Guerin, M. R. Boisseau, et al. (1998). "Effect of the antioxidants selenium and beta-carotene on HIV-related endothelium dysfunction." *Thromb Haemost* **80**(6): 1015-7.
- Contempre, B., G. M. de Escobar, J. F. Denef, J. E. Dumont und M. C. Many (2004). "Thiocyanate induces cell necrosis and fibrosis in selenium- and iodine-deficient rat

- thyroids: a potential experimental model for myxedematous endemic cretinism in central Africa." Endocrinology **145**(2): 994-1002.
- Contempre, B., J. Vanderpas und J. E. Dumont (1991). "Cretinism, thyroid hormones and selenium." Mol Cell Endocrinol **81**(1-3): C193-5.
- Crane, M., T. Flower, D. Holmes und S. Watson (1992). "The toxicity of selenium in experimental freshwater ponds." Arch Environ Contam Toxicol **23**(4): 440-52.
- Curran, J. E., J. B. Jowett, K. S. Elliott, Y. Gao, K. Gluschenko, J. Wang, D. M. Abel Azim, G. Cai, et al. (2005). "Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response." Nat Genet **37**(11): 1234-41.
- Daniels, L. A. (1996). "Selenium metabolism and bioavailability." Biol Trace Elem Res **54**(3): 185-99.
- Davis, C. D. und E. O. Uthus (2004). "DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions." Exp Biol Med (Maywood) **229**(10): 988-95.
- de Jesus, L. A., P. R. Hoffmann, T. Michaud, E. P. Forry, A. Small-Howard, R. J. Stillwell, N. Morozova, J. W. Harney, et al. (2006). "Nuclear assembly of UGA decoding complexes on selenoprotein mRNAs: a mechanism for eluding nonsense-mediated decay?" Mol Cell Biol **26**(5): 1795-805.
- Dickson, R. C. und R. H. Tomlinson (1967). "Selenium in blood and human tissues." Clin Chim Acta **16**(2): 311-21.
- Drasch, G., S. Mail der, C. Schlosser und G. Roeder (2000). "Content of non-mercury-associated selenium in human tissues." Biol Trace Elem Res **77**(3): 219-30.
- Dreher, I., T. C. Jakobs und J. Köhrle (1997). "Cloning and characterization of the human selenoprotein P promoter. Response of selenoprotein P expression to cytokines in liver cells." J Biol Chem **272**(46): 29364-71.
- Driscoll, D. M. und P. R. Copeland (2003). "Mechanism and regulation of selenoprotein synthesis." Annu Rev Nutr **23**: 17-40.
- Dumitrescu, A. M., X. H. Liao, M. S. Abdullah, J. Lado-Abeal, F. A. Majed, L. C. Moeller, G. Boran, L. Schomburg, et al. (2005). "Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism." Nat Genet **37**(11): 1247-52.
- Fagegaltier, D., P. Carbon und A. Krol (2001). "Distinctive features in the SelB family of elongation factors for selenoprotein synthesis. A glimpse of an evolutionary complexified translation apparatus." Biofactors **14**(1-4): 5-10.
- Fan, A. M., S. A. Book, R. R. Neutra und D. M. Epstein (1988). "Selenium and human health implications in California's San Joaquin Valley." J Toxicol Environ Health **23**(4): 539-59.
- Ferguson, A. D., V. M. Labunskyy, D. E. Fomenko, D. Arac, Y. Chelliah, C. A. Amezcua, J. Rizo, V. N. Gladyshev, et al. (2006). "NMR structures of the selenoproteins Sep15 and SelM reveal redox activity of a new thioredoxin-like family." J Biol Chem **281**(6): 3536-43.
- Fishbein, L. (1983). "Environmental selenium and its significance." Fundam Appl Toxicol **3**(5): 411-9.
- Fishbein, L. (1984). "Overview of analysis of carcinogenic and/or mutagenic metals in biological and environmental samples. I. Arsenic, beryllium, cadmium, chromium and selenium." Int J Environ Anal Chem **17**(2): 113-70.
- Flohé, L., J. R. Andreesen, R. Brigelius-Flohé, M. Maiorino und F. Ursini (2000). "Selenium, the element of the moon, in life on earth." IUBMB Life **49**(5): 411-20.
- Flohé, L., W. A. Günzler und H. H. Schock (1973). "Glutathione peroxidase: a selenoenzyme." FEBS Lett **32**(1): 132-4.
- Forceville, X., D. Vitoux, R. Gauzit, A. Combes, P. Lahilaire und P. Chappuis (1998). "Selenium, systemic immune response syndrome, sepsis, and outcome in critically ill patients." Crit Care Med **26**(9): 1536-44.



- Foster, L. H. und S. Sumar (1997). "Selenium in health and disease: a review." Crit Rev Food Sci Nutr **37**(3): 211-28.
- Gärtner, R., W. Albrich und M. W. Angstwurm (2001). "The effect of a selenium supplementation on the outcome of patients with severe systemic inflammation, burn and trauma." Biofactors **14**(1-4): 199-204.
- Gasmi, A., R. Garnier, M. Galliot-Guilley, C. Gaudillat, B. Quartenoud, A. Buisine und D. Djebbar (1997). "Acute selenium poisoning." Vet Hum Toxicol **39**(5): 304-8.
- Ge, K., A. Xue, J. Bai und S. Wang (1983). "Keshan disease-an endemic cardiomyopathy in China." Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol **401**(1): 1-15.
- Gromer, S., S. Urig und K. Becker (2004). "The thioredoxin system--from science to clinic." Med Res Rev **24**(1): 40-89.
- Gross, M., M. Oertel und J. Köhrle (1995). "Differential selenium-dependent expression of type I 5'-deiodinase and glutathione peroxidase in the porcine epithelial kidney cell line LLC-PK1." Biochem J **306** ( Pt 3): 851-6.
- Hansen, J. C. (1988). "Has selenium a beneficial role in human exposure to inorganic mercury?" Med Hypotheses **25**(1): 45-53.
- Hartfiel, W. und N. Bahners (1988). "Selenium deficiency in the Federal Republic of Germany." Biol Trace Elem Res **15**: 1-12.
- Hasegawa, T., M. Mihara, T. Okuno, K. Nakamuro und Y. Sayato (1995). "Chemical form of selenium-containing metabolite in small intestine and liver of mice following orally administered selenocystine." Arch Toxicol **69**(5): 312-7.
- Hassoun, B. S., I. S. Palmer und C. Dwivedi (1995). "Selenium detoxification by methylation." Res Commun Mol Pathol Pharmacol **90**(1): 133-42.
- Hatfield, D. L. und V. N. Gladyshev (2002). "How selenium has altered our understanding of the genetic code." Mol Cell Biol **22**(11): 3565-76.
- Helzlsouer, K. J., R. Jacobs und S. Morris (1985). "Acute selenium intoxication in the United States." Federation Proc **44**: 1670.
- Hill, K. E., R. S. Lloyd, J. G. Yang, R. Read und R. F. Burk (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., Y. Xia, B. Akesson, M. E. Boeglin und R. F. Burk (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., J. Zhou, W. J. McMahan, A. K. Motley, J. F. Atkins, R. F. Gesteland und R. F. Burk (2003). "Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse." J Biol Chem **278**(16): 13640-6.
- Hirashima, M., T. Naruse, H. Maeda, C. Nozaki, Y. Saito und K. Takahashi (2003). "Identification of selenoprotein P fragments as a cell-death inhibitory factor." Biol Pharm Bull **26**(6): 794-8.
- Huang, Z. Z. und L. Wu (1991). "Species richness and selenium accumulation of plants in soils with elevated concentration of selenium and salinity." Ecotoxicol Environ Saf **22**(3): 251-66.
- Jackson, M. L. (1988). "Selenium: geochemical distribution and associations with human heart and cancer death rates and longevity in China and the United States." Biol Trace Elem Res **15**: 13-21.
- Jacob, C., G. I. Giles, N. M. Giles und H. Sies (2003). "Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function." Angew Chem Int Ed Engl **42**(39): 4742-58.
- Jakupoglu, C., G. K. Przemek, M. Schneider, S. G. Moreno, N. Mayr, A. K. Hatzopoulos, M. H. de Angelis, W. Wurst, et al. (2005). "Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential

- for embryogenesis but dispensable for cardiac development." Mol Cell Biol **25**(5): 1980-8.
- Janghorbani, M., Y. Xia, P. Ha, P. D. Whanger, J. A. Butler, J. W. Olesik und L. Daniels (1999). "Metabolism of selenite in men with widely varying selenium status." J Am Coll Nutr **18**(5): 462-9.
- Kabata-Pendias, A. (1998). "Geochemistry of selenium." J Environ Pathol Toxicol Oncol **17**(3-4): 173-7.
- Kato, T., R. Read, J. Rozga und R. F. Burk (1992). "Evidence for intestinal release of absorbed selenium in a form with high hepatic extraction." Am J Physiol **262**(5 Pt 1): G854-8.
- Kise, Y., S. Yoshimura, K. Akieda, K. Umezawa, K. Okada, N. Yoshitake, H. Shiramizu, I. Yamamoto, et al. (2004). "Acute oral selenium intoxication with ten times the lethal dose resulting in deep gastric ulcer." J Emerg Med **26**(2): 183-7.
- Kobayashi, Y., Y. Ogra, K. Ishiwata, H. Takayama, N. Aimi und K. T. Suzuki (2002). "Selenosugars are key and urinary metabolites for selenium excretion within the required to low-toxic range." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 15932-6.
- Köhrle, J. (1999). "The trace element selenium and the thyroid gland." Biochimie **81**(5): 527-33.
- Köhrle, J., R. Brigelius-Flohé, A. Böck, R. Gärtner, O. Meyer und L. Flohé (2000). "Selenium in biology: facts and medical perspectives." Biol Chem **381**(9-10): 849-64.
- Köhrle, J., F. Jakob, B. Contempre und J. E. Dumont (2005). "Selenium, the thyroid, and the endocrine system." Endocr Rev **26**(7): 944-84.
- Köhrle, J. und L. Schomburg (2006). "Selen - Selenoproteine - Selenmangel - Selenvergiftung." Ernährungsmedizin, Prävention und Therapie (P. Schauder, G. Ollenschläger (Hrsg.)): 149-159.
- Koller, L. D. und J. H. Exon (1986). "The two faces of selenium-deficiency and toxicity--are similar in animals and man." Can J Vet Res **50**(3): 297-306.
- Korotkov, K. V., E. Kumaraswamy, Y. Zhou, D. L. Hatfield und V. N. Gladyshev (2001). "Association between the 15-kDa selenoprotein and UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase in the endoplasmic reticulum of mammalian cells." J Biol Chem **276**(18): 15330-6.
- Kryukov, G. V., S. Castellano, S. V. Novoselov, A. V. Lobanov, O. Zehtab, R. Guigo und V. N. Gladyshev (2003). "Characterization of mammalian selenoproteomes." Science **300**(5624): 1439-43.
- Kühn, H. und A. Borchert (2002). "Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes." Free Radic Biol Med **33**(2): 154-72.
- Leblondel, G., Y. Mauras, A. Cailleux und P. Allain (2001). "Transport measurements across Caco-2 monolayers of different organic and inorganic selenium: influence of sulfur compounds." Biol Trace Elem Res **83**(3): 191-206.
- Lech, T. (2002). "Suicide by sodium tetroxoselenate(VI) poisoning." Forensic Sci Int **130**(1): 44-8.
- Lei, X. G. und W. H. Cheng (2005). "New roles for an old selenoenzyme: evidence from glutathione peroxidase-1 null and overexpressing mice." J Nutr **135**(10): 2295-8.
- Look, M. P., J. K. Rockstroh, G. S. Rao, K. A. Kreuzer, S. Barton, H. Lemoch, T. Sudhop, J. Hoch, et al. (1997). "Serum selenium, plasma glutathione (GSH) and erythrocyte glutathione peroxidase (GSH-Px)-levels in asymptomatic versus symptomatic human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)-infection." Eur J Clin Nutr **51**(4): 266-72.
- Low, S. C., E. Grundner-Culemann, J. W. Harney und M. J. Berry (2000). "SECIS-SBP2 interactions dictate selenocysteine incorporation efficiency and selenoprotein hierarchy." Embo J **19**(24): 6882-90.

- Maehira, F., G. A. Luyo, I. Miyagi, M. Oshiro, N. Yamane, M. Kuba und Y. Nakazato (2002). "Alterations of serum selenium concentrations in the acute phase of pathological conditions." Clin Chim Acta **316**(1-2): 137-46.
- Maquat, L. E. (2004). "Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(2): 89-99.
- McKenzie, R. C., J. R. Arthur und G. J. Beckett (2002). "Selenium and the regulation of cell signaling, growth, and survival: molecular and mechanistic aspects." Antioxid Redox Signal **4**(2): 339-51.
- Mehta, A., C. M. Rebsch, S. A. Kinzy, J. E. Fletcher und P. R. Copeland (2004). "Efficiency of mammalian selenocysteine incorporation." J Biol Chem **279**(36): 37852-9.
- Mihara, H., T. Kurihara, T. Watanabe, T. Yoshimura und N. Esaki (2000). "cDNA cloning, purification, and characterization of mouse liver selenocysteine lyase. Candidate for selenium delivery protein in selenoprotein synthesis." J Biol Chem **275**(9): 6195-200.
- Moghadaszadeh, B., N. Petit, C. Jaillard, M. Brockington, S. Q. Roy, L. Merlini, N. Romero, B. Estournet, et al. (2001). "Mutations in SEPNI cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome." Nat Genet **29**(1): 17-8.
- Moreno-Reyes, R., F. Mathieu, M. Boelaert, F. Begaux, C. Suetens, M. T. Rivera, J. Neve, N. Perlmutter, et al. (2003). "Selenium and iodine supplementation of rural Tibetan children affected by Kashin-Beck osteoarthropathy." Am J Clin Nutr **78**(1): 137-44.
- Moskovitz, J. und E. R. Stadtman (2003). "Selenium-deficient diet enhances protein oxidation and affects methionine sulfoxide reductase (MsrB) protein level in certain mouse tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(13): 7486-90.
- Mostert, V., I. Dreher, J. Kohrle, S. Wolff und J. Abel (2001). "Modulation of selenoprotein P expression by TGF-beta(1) is mediated by Smad proteins." Biofactors **14**(1-4): 135-42.
- Motsenbocker, M. A. und A. L. Tappel (1982). "A selenocysteine-containing selenium-transport protein in rat plasma." Biochim Biophys Acta **719**(1): 147-53.
- Nahapetian, A. T., M. Janghorbani und V. R. Young (1983). "Urinary trimethylselenonium excretion by the rat: effect of level and source of selenium-75." J Nutr **113**(2): 401-11.
- Nalvarte, I., A. E. Damdimopoulos, C. Nystom, T. Nordman, A. Miranda-Vizuete, J. M. Olsson, L. Eriksson, M. Bjornstedt, et al. (2004). "Overexpression of enzymatically active human cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductase in HEK-293 cells. Effect on cell growth and differentiation." J Biol Chem **279**(52): 54510-7.
- Neve, J. (2002). "Selenium as a 'nutraceutical': how to conciliate physiological and supra-nutritional effects for an essential trace element." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **5**(6): 659-63.
- O'Toole, D. und M. F. Raisbeck (1995). "Pathology of experimentally induced chronic selenosis (alkali disease) in yearling cattle." J Vet Diagn Invest **7**(3): 364-73.
- Papp, L. V., J. Lu, F. Striebel, D. Kennedy, A. Holmgren und K. K. Khanna (2006). "The redox state of SECIS binding protein 2 controls its localization and selenocysteine incorporation function." Mol Cell Biol **26**(13): 4895-910.
- Persson-Moschos, M., W. Huang, T. S. Srikumar, B. Akesson und S. Lindeberg (1995). "Selenoprotein P in serum as a biochemical marker of selenium status." Analyst **120**(3): 833-6.
- Prummel, M. F., T. Strieder und W. M. Wiersinga (2004). "The environment and autoimmune thyroid diseases." Eur J Endocrinol **150**(5): 605-18.
- Pyrzynska, K. (1998). "Speciation of Selenium Compounds." Anal Sciences **14**: 479-483.
- Quadroni, D. A., H. A. Spiller und D. Steinhorn (2000). "A fatal case of gun blue ingestion in a toddler." Vet Hum Toxicol **42**(2): 96-8.
- Raisbeck, M. F. (2000). "Selenosis." Vet Clin North Am Food Anim Pract **16**(3): 465-80.

- Ramaekers, V. T., M. Calomme, D. Vanden Berghe und W. Makropoulos (1994). "Selenium deficiency triggering intractable seizures." Neuropediatrics **25**(4): 217-23.
- Rathgeber, C., N. Yurkova, E. Stackebrandt, J. T. Beatty und V. Yurkov (2002). "Isolation of tellurite- and selenite-resistant bacteria from hydrothermal vents of the Juan de Fuca Ridge in the Pacific Ocean." Appl Environ Microbiol **68**(9): 4613-22.
- Rayman, M. P. (2000). "The importance of selenium to human health." Lancet **356**(9225): 233-41.
- Rayman, M. P. (2002). "The argument for increasing selenium intake." Proc Nutr Soc **61**(2): 203-15.
- Rayman, M. P. (2005). "Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action." Proc Nutr Soc **64**(4): 527-42.
- Richardson, D. R. (2005). "More roles for selenoprotein P: local selenium storage and recycling protein in the brain." Biochem J **386**(Pt 2): e5-7.
- Riese, C., M. Michaelis, B. Mentrup, F. Götz, J. Köhrle, U. Schweizer und L. Schomburg (2006). "Se-dependent pre- and posttranscriptional mechanisms are responsible for sexual dimorphic expression of selenoproteins in murine tissues." Endocrinology in revision.
- Riese, C., M. Michaelis, B. Mentrup, F. Götz, J. Köhrle, U. Schweizer und L. Schomburg (2006). "Selenium-dependent pre- and posttranscriptional mechanisms are responsible for sexual dimorphic expression of selenoproteins in murine tissues." Endocrinology **147**(12): 5883-5892.
- Rush, J. W. und S. D. Sandiford (2003). "Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: influence of gender and physical activity." Clin Biochem **36**(5): 345-51.
- Saito, Y., T. Hayashi, A. Tanaka, Y. Watanabe, M. Suzuki, E. Saito und K. Takahashi (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.
- Savaskan, N. E., A. U. Brauer, M. Kuhbacher, I. Y. Eyupoglu, A. Kyriakopoulos, O. Ninnemann, D. Behne und R. Nitsch (2003). "Selenium deficiency increases susceptibility to glutamate-induced excitotoxicity." Faseb J **17**(1): 112-4.
- Scharpf, M., U. Schweizer, T. Arzberger, W. Roggendorf, L. Schomburg und J. Köhrle (2007). "Neuronal and ependymal expression of selenoprotein P in the human brain." J Neural Transm: in press.
- Schomburg, L. (2007). "Selenium in Intensive Care (SIC) Study - the XX-files are still unresolved." Crit Care Med (in press).
- Schomburg, L. und J. Köhrle (2007). "Kapitel 58, Selen." Handbuch der Lebensmitteltoxikologie (H. Dunkelberg, A. Hartwig, T. Gebel (Hrsg.)): 2403-2446.
- Schomburg, L. und J. Köhrle (2007). "Selen: Nutzen und Risiko." MMW - Fortschritte der Medizin (in press).
- Schomburg, L., C. Riese, M. Michaelis, E. Griebert, M. O. Klein, R. Sapin, U. Schweizer und J. Köhrle (2006). "Synthesis and metabolism of thyroid hormones is preferentially maintained in selenium-deficient transgenic mice." Endocrinology **147**(3): 1306-13.
- Schomburg, L., U. Schweizer, B. Holtmann, L. Flohé, M. Sendtner und J. Köhrle (2003). "Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues." Biochem J **370**(Pt 2): 397-402.
- Schomburg, L., U. Schweizer und J. Köhrle (2004). "Selenium and selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, enigmatic." Cell Mol Life Sci **61**(16): 1988-95.
- Schrauzer, G. N. (2000). "Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity." J Nutr **130**(7): 1653-6.
- Schwarz, K. und C. M. Foltz (1957). "Selenium as an integral part of Factor 3 against dietary necrotic liver degeneration." J Am Chem Soc **79**: 3292.

- Schweizer, U., M. Michaelis, J. Köhrle und L. Schomburg (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.
- Schweizer, U. und L. Schomburg (2005). "New Insights into the Physiological Actions of Selenoproteins from Genetically Modified Mice." IUBMB Life **57**: 1-8.
- Schweizer, U., F. Streckfuss, P. Pelt, B. A. Carlson, D. L. Hatfield, J. Köhrle und L. Schomburg (2005). "Hepatically derived selenoprotein P is a key factor for kidney but not for brain selenium supply." Biochem J **386**(Pt 2): 221-6.
- Shamberger, R. J. (1981). "Selenium in the environment." Sci Total Environ **17**(1): 59-74.
- Sheehan, T. M. und M. Gao (1990). "Simplified fluorometric assay of total selenium in plasma and urine." Clin Chem **36**(12): 2124-6.
- Sher, L. (2001). "Role of thyroid hormones in the effects of selenium on mood, behavior, and cognitive function." Med Hypotheses **57**(4): 480-3.
- Sole, M. J. und K. N. Jeejeebhoy (2002). "Conditioned nutritional requirements: therapeutic relevance to heart failure." Herz **27**(2): 174-8.
- St Germain, D. L. und V. A. Galton (1997). "The deiodinase family of selenoproteins." Thyroid **7**(4): 655-68.
- St Germain, D. L., A. Hernandez, M. J. Schneider und V. A. Galton (2005). "Insights into the role of deiodinases from studies of genetically modified animals." Thyroid **15**(8): 905-16.
- Stoytcheva, Z., R. M. Tujebajeva, J. W. Harney und M. J. Berry (2006). "Efficient incorporation of multiple selenocysteines involves an inefficient decoding step serving as a potential translational checkpoint and ribosome bottleneck." Mol Cell Biol.
- Streckfuss, F., I. Hamann, L. Schomburg, M. Michaelis, R. Sapin, M. O. Klein, J. Köhrle und U. Schweizer (2005). "Hepatic deiodinase activity is dispensable for the maintenance of normal circulating thyroid hormone levels in mice." Biochem Biophys Res Commun **337**(2): 739-45.
- Sudre, P. und F. Mathieu (2001). "Kashin-Beck disease: from etiology to prevention or from prevention to etiology?" Int Orthop **25**(3): 175-9.
- Sun, X. und L. E. Maquat (2002). "Nonsense-mediated decay: assaying for effects on selenoprotein mRNAs." Methods Enzymol **347**: 49-57.
- Sun, X., P. M. Moriarty und L. E. Maquat (2000). "Nonsense-mediated decay of glutathione peroxidase 1 mRNA in the cytoplasm depends on intron position." Embo J **19**(17): 4734-44.
- Suzuki, K. T., L. Somekawa und N. Suzuki (2006). "Distribution and reuse of <sup>76</sup>Se-selenosugar in selenium-deficient rats." Toxicol Appl Pharmacol **216**(2): 303-8.
- Tamura, T., S. Yamamoto, M. Takahata, H. Sakaguchi, H. Tanaka, T. C. Stadtman und K. Inagaki (2004). "Selenophosphate synthetase genes from lung adenocarcinoma cells: Sps1 for recycling L-selenocysteine and Sps2 for selenite assimilation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(46): 16162-7.
- Terry, N., A. M. Zayed, M. P. De Souza und A. S. Tarun (2000). "Selenium in Higher Plants." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **51**: 401-432.
- Thomson, C. D. (2004). "Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review." Eur J Clin Nutr **58**(3): 391-402.
- Tinggi, U. (2003). "Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review." Toxicol Lett **137**(1-2): 103-10.
- Tubbs, R. R., G. N. Gephardt, J. T. McMahan, M. C. Pohl, D. G. Vidt, S. A. Barenberg und R. Valenzuela (1982). "Membranous glomerulonephritis associated with industrial mercury exposure. Study of pathogenetic mechanisms." Am J Clin Pathol **77**(4): 409-13.

- Uden, P. C., H. T. Boakye, C. Kahakachchi und J. F. Tyson (2004). "Selective detection and identification of Se containing compounds--review and recent developments." J Chromatogr A **1050**(1): 85-93.
- Ursini, F., S. Heim, M. Kiess, M. Maiorino, A. Roveri, J. Wissing und L. Flohé (1999). "Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation." Science **285**(5432): 1393-6.
- Ursini, F., M. Maiorino, R. Brigelius-Flohé, K. D. Aumann, A. Roveri, D. Schomburg und L. Flohé (1995). "Diversity of glutathione peroxidases." Methods Enzymol **252**: 38-53.
- van Rij, A. M., C. D. Thomson, J. M. McKenzie und M. F. Robinson (1979). "Selenium deficiency in total parenteral nutrition." Am J Clin Nutr **32**(10): 2076-85.
- Vanderpas, J. B., B. Contempre, N. L. Duale, H. Deckx, N. Bebe, A. O. Longombe, C. H. Thilly, A. T. Diplock, et al. (1993). "Selenium deficiency mitigates hypothyroxinemia in iodine-deficient subjects." Am J Clin Nutr **57**(2 Suppl): 271S-275S.
- Vernie, L. N. (1984). "Selenium in carcinogenesis." Biochim Biophys Acta **738**(4): 203-17.
- Walder, K., L. Kantham, J. S. McMillan, J. Trevaskis, L. Kerr, A. De Silva, T. Sunderland, N. Godde, et al. (2002). "Tanis: a link between type 2 diabetes and inflammation?" Diabetes **51**(6): 1859-66.
- Whanger, P., S. Vendeland, Y. C. Park und Y. Xia (1996). "Metabolism of subtoxic levels of selenium in animals and humans." Ann Clin Lab Sci **26**(2): 99-113.
- Whanger, P. D. (2000). "Selenoprotein W: a review." Cell Mol Life Sci **57**(13-14): 1846-52.
- Wilber, C. G. (1980). "Toxicology of selenium: a review." Clin Toxicol **17**(2): 171-230.
- Wingler, K., M. Bocher, L. Flohe, H. Kollmus und R. Brigelius-Flohe (1999). "mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins." Eur J Biochem **259**(1-2): 149-57.
- Wolffram, S. (1995). "Mechanisms of intestinal absorption of selenium." Med Klin (Munich) **90** Suppl 1: 1-5.
- Yan, J. und J. N. Barrett (1998). "Purification from bovine serum of a survival-promoting factor for cultured central neurons and its identification as selenoprotein-P." J Neurosci **18**(21): 8682-91.
- Yang, G. Q., S. Z. Wang, R. H. Zhou und S. Z. Sun (1983). "Endemic selenium intoxication of humans in China." Am J Clin Nutr **37**(5): 872-81.
- Yant, L. J., Q. Ran, L. Rao, H. Van Remmen, T. Shibatani, J. G. Belter, L. Motta, A. Richardson, et al. (2003). "The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults." Free Radic Biol Med **34**(4): 496-502.
- Zimmermann, M. B. und J. Köhrle (2002). "The impact of iron and selenium deficiencies on iodine and thyroid metabolism: biochemistry and relevance to public health." Thyroid **12**(10): 867-78.

## 6 DANKSAGUNG

An dieser Stelle ist es mir Freude, Bedürfnis und Vergnügen zugleich, meinen aufrichtigen Dank an die folgenden Adressaten zu schicken.

Hier stehen meine wissenschaftlichen Lehrer an erster Stelle, da sie mir nicht nur die Welt der Biochemie eröffnet haben und mir Wege zeigten, sich dieser fragend, irrend und erkennend zu nähern, sondern auch weil sie mir meine mitunter unkonventionelle Art der wissenschaftlichen Arbeit und Tagesgestaltung erlaubten und mir die Möglichkeit gaben, eigene Vorstellungen umzusetzen. Diese Großzügigkeit habe ich uneingeschränkt bei (in chronologischer Reihenfolge) Prof. Dr. Karl Bauer, Prof. Dr. William W. Chin und im Besonderen bei Prof. Dr. Josef Köhrle erfahren dürfen. Ohne diese stete Unterstützung, unverzichtbare Motivation und konstruktive Kritik hätte ich diesen akademischen Berufsweg nicht bis hierhin verfolgt und beschritten. Herzlichen Dank! Gleichsam möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. P.-M. Kloetzel, Direktor des Instituts für Biochemie, CCM, für die überaus freundliche, unbürokratische und essentielle Unterstützung in den letzten Monaten bedanken. Ebenso unverzichtbar waren die inhaltlichen, formalen und moralischen Beiträge meiner hochgeschätzten Kollegen. Es ist mir unmöglich, die Fülle an konstruktiven Denkanstößen, technischen, intellektuellen und praktischen Hilfestellungen und täglichen Beweise der Langmut, Toleranz und Motivation zu benennen, aber diese einmalige empathische Atmosphäre erst machte die wissenschaftliche Arbeit zu einer sozialen, interaktiven und angenehmen Betätigung, die ich nicht missen mochte und möchte. Hierbei haben sich besonders Dr. Ulrich Schweizer, aber auch Dr. Noriyuki Koibuchi, Dr. Branislav Radovic, Dr. Silvia Misiti, Dr. Paul M. Yen, Dr. Akira Takeshita, Dr. Andreas Teske, Dr. Rupert Yip, Dr. Carsten Reissner und Dr. Thorsten Stühmer außerordentlich verdient gemacht. Euch gilt mein tief empfundener und aufrichtiger Dank für weit mehr als das hier Angeführte.

Die meiste Zeit durfte ich aber mit jüngeren Kollegen, Wissenschaftlern und Technikern verbringen, von und mit denen ich intensiv dazulernte. Während wir an den uns gestellten Aufgaben wachsen mussten, gelang es uns, ein offenes, kritisches und konstruktives gegenseitiges Vertrauensverhältnis aufzubauen, welches die entscheidende Voraussetzung für eine erfolgreiche Teamarbeit darstellt. Diese positiven Interaktionen prägten mich stärker, als ich es auszudrücken vermag. Es ist mein ausgesprochenes Glück, einen Teil des Weges mit vielen solcher exzellenten Mitmenschen gegangen sein zu dürfen; mein Problem besteht nun im angemessenen Dank für diese nicht benennbaren, aber doch herzlichen, unverzichtbaren und mannigfaltigen Interaktionen. Bitte entschuldigt die relativ nüchterne alphabetische Auflistung - mein Dank und meine Hochschätzung für Euch ist hier nicht darstellbar:

Also, liebe Anita Kinne, Anne Peters, Birgit Hollenbach, Birgit Kühlein, Björn Heynisch, Cornelia Riese, Dirk Bökenkamp, Heike Heuer, Jan Ehrchen, Johanna Höflich, John Neidhardt, Katja Schreiber, Kostja Renko, Marcus Scharpf, Marten Michaelis, Mette Stodter, Peter Hofmann, Ralf Sigmund, Silke Apelt, Silke Kappler, Silke Penschuk, Sönke Friedrichsen, Stefan Turwitt, Stephan Roth und Vartitér Seher, herzlichen Dank für Euren Beitrag zur mich bewegenden Wissenschaft, Lutzwerdung und Menschheitsgeschichte.

Nicht zuletzt bin ich natürlich der unverzichtbaren Stärkung durch den Freundeskreis und in ausgesprochenem Maße der liebevollen familiären Unterstützung zutiefst dankbar. Also, liebe Petra, lieber Axel, liebe Eltern - ganz herzlichen Dank und nur weiter so.

## 7 ERKLÄRUNG

gemäß § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....

Datum

.....

Unterschrift



## 8 ANHANG: AUSGEWÄHLTE PUBLIKATIONEN

**A) Schomburg L\***, Schweizer U\*, Holtmann B, Flohé L, Sendtner M, Köhrle J.  
Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues.  
Biochemical Journal 2003; **370**(Pt 2):397-402.

**B) Schweizer U, Michaelis M, Köhrle J., Schomburg L**  
Efficient selenium transfer from mother to offspring in selenoprotein-P-deficient mice enables dose-dependent rescue of phenotypes associated with selenium deficiency.  
Biochemical Journal 2004; **378**(Pt 1):21-26.

**C) Schomburg L, Schweizer U, Köhrle J.**  
Selenium and selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, enigmatic.  
Cellular and Molecular Life Sciences 2004; **61**(16):1988-1995.

**D) Schomburg L, Riese C, Michaelis M, Griebert E, Klein MO, Sapin R, Schweizer U, Köhrle J.**  
Synthesis and metabolism of thyroid hormones is preferentially maintained in selenium-deficient transgenic mice.  
Endocrinology 2006; **147**(3):1306-1313.

**E) Dumitrescu AM, Liao XH, Abdullah MS, Lado-Abeal J, Majed FA, Moeller LC, Boran G, Schomburg L, Weiss RE, Refetoff S.**  
Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism.  
Nature Genetics 2005; **37**(11):1247-1252.

**F) Riese C, Michaelis M, Mentrup B, Götz F, Köhrle J, Schweizer U, Schomburg L.**  
Selenium-dependent pre- and posttranscriptional mechanisms are responsible for sexual dimorphic expression of selenoproteins in murine tissues.  
Endocrinology 2006; **147**(12):5883-5892.

**G) Schomburg L.**  
Selenium in Intensive Care (SIC) Study - the XX-files are still unresolved.  
Critical Care Medicine 2007; **35**(3):995-996.