

## 4. Diskussion

Die Bedeutung des Spurenelements Selen für die Funktionsfähigkeit des menschlichen Organismus wurde bereits in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben (Rayman, 2000; Köhrle et al., 2000). Selen ist - wie auch Iod - für eine einwandfreie Schilddrüsenfunktion ebenso notwendig wie für die Aktivierung und Homöostase ihrer Hormone (Köhrle, 2000). Selenmangel in Verbindung mit Iodmangel kann zu Myxödematösem Kretinismus führen. Auch ein intaktes Immunsystem (McKenzie et al., 2002) und eine korrekte Spermatogenese (Ursini et al., 1999) sind vom Selenstatus des Individuums abhängig.

Weiterhin wird die Rolle von Selen in der Tumorprotektion (Clark et al., 1998; Combs, Jr. et al., 2001), sowie beim Schutz gegen kardiovaskulären Erkrankungen (Neve, 1996) und in der Behinderung der HIV-Progression hin zu AIDS diskutiert (Sappey et al., 1994).

Das klinische Bild des gravierenden Selenmangels, das sich durch Myopathie, Herzrhythmus- und Leberfunktionsstörungen, Nagelveränderungen und Anämie auszeichnet, deutet ebenfalls darauf hin, dass Selen unverzichtbar für die menschliche Gesundheit ist.

Moghadaszadeh et al. zeigten als erste die Rolle eines mutierten Selenoproteingens in der Ätiologie einer menschlichen Krankheit (Moghadaszadeh et al., 2001). Sie beschrieben unterschiedliche Veränderungen des Gens für Selenoprotein N (SEPN1) bei insgesamt zehn von Hereditärer Muskulärer Dystrophie mit Rigid-Spine-Syndrom betroffenen Familien. Es handelt sich dabei um zwei Rasterschubmutationen, zwei homozygote Punktmutationen, von denen die eine ein Sec-kodierendes TGA in ein Stopkodon, TAA, umwandelt, sowie zwei heterozygote Punktmutationen in SEPN1 bei ein- und derselben Familie im Sinne einer Compound Heterozygotie. Es folgte der Nachweis sechs weiterer Mutationen von SEPN1, diesmal in Verbindung mit der autosomal-rezessiven Multiminicore-Krankheit (MmD), die ebenfalls eine hereditäre Myopathie darstellt (Ferreiro et al., 2002). Interessanterweise wurden auch drei der bereits von Moghadaszadeh beschriebenen Mutationen bei Patienten mit MmD beobachtet. Dies ist ein Hinweis auf die Variabilität des morphologischen Spektrums, das mit SEPN1-Mutationen assoziiert werden kann, und wirft die Frage nach einer Reevaluation der Klassifikation angeborener Myopathien auf.

Kürzlich wurde zum ersten Mal ein Defekt im Sec-Inkorporationsmechanismus als Ursache phänotypischer Auffälligkeiten beim Menschen entdeckt: Es handelt sich um eine Punktmutation im Gen für SBP2 bei drei Kindern einer saudiarabischen Familie sowie eine compound

heterozygote Mutation im gleichen Gen bei einem Kind irischer Herkunft (Dumitrescu et al., 2005). Alle Betroffenen waren durch Kleinwuchs, pathologische Schilddrüsenfunktionstests und eine eingeschränkte enzymatische Aktivität der Dejodase Typ II aufgefallen. Ebenfalls wurden, im Zuge weiterer Untersuchungen, verminderte Werte für die GPx-Aktivität, SePP-Konzentration und Gesamtselenkonzentration im Serum gemessen. Da alle Ergebnisse aus der Analyse von Hautfibroblasten oder Lymphozyten stammen, diese Zellen jedoch weder Dejodase Typ I noch Typ III exprimieren, konnte über die Aktivität dieser beiden Enzyme keine Aussage getroffen werden.

Insgesamt sprechen die Daten von Dumitrescu et al. für einen mangelhaften Seleneinbau in Plasmaproteine als Folge einer gestörten SBP2-Funktion. Sie unterstreichen die Bedeutung von Selenoproteinen für die Regulation der Schilddrüsenhormonachse.

Die Tatsache, dass der Phänotyp der beschriebenen Patienten verhältnismäßig mild erscheint, wird von den Autoren durch einen lediglichen Teilverlust der Funktion von SBP2 erklärt. Es bleibt abzuwarten, inwieweit die betroffenen Kinder mit zunehmendem Alter weitere klinische Zeichen von Selenmangel entwickeln werden. Fertilitätseinschränkungen oder auch eine erhöhte Rate an Krebsleiden als Ausdruck verminderten Schutzes vor Sauerstoffradikalen wären denkbare Symptome eines gestörten Selenmetabolismus.

Die Auswirkungen von Störungen der Selenoproteinsynthese auf das Gehirn und die neuronale Funktion des Menschen sind bislang noch nicht beschrieben worden. Es existieren jedoch mehrere Untersuchungen, die darauf hinweisen, dass Selenoproteine eine wichtige Rolle im Nervensystem spielen.

Zum einen liegen Daten aus dem Tiermodell vor: Homozygote Selenoprotein P-Knockout-Mäuse zeigen demnach nicht nur eine verminderte Gewichts- und Größenzunahme, sondern entwickeln ab dem Alter von zwei Wochen auch zunehmend Ataxie (Schomburg et al., 2003), Spastik (Hill et al., 2004) und Krampfanfälle (Schweizer et al., 2004b). Hinzu kommt, dass bei diesen Mäusen im Vergleich zu ihren gesunden Geschwistern eine erhöhte Mortalitätsrate beobachtet wurde. Durch Selensubstitution in Form von mit Selen angereichertem Trinkwasser (10  $\mu$ M) wurde das Auftreten bzw. Fortschreiten der beschriebenen neuronalen Dysfunktionen verhindert.

Zum anderen ist die Plasma-Selenkonzentration bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit verändert (Ceballos-Picot et al., 1996; Cornett et al., 1998), während die Expression von GPx, welche vor allem in Gliazellen nachgewiesen wurde (Savolainen, 1978), in den beschädigten Hirnarealen bei Parkinson-Patienten erhöht ist (Damier et al., 1993). Auch in der Randzone von

Hirnfarktaren wurden erhöhte GPx-Werte gemessen (Takizawa et al., 1994). Solche Beobachtungen korrelieren mit der antioxidativen Funktion von GPx: Dieses Selenoenzym ist unerlässlich für einen effizienten Schutz aller Zellen im Organismus, auch derjenigen des Gehirns, gegenüber freien Radikalen. Tatsächlich zeigten Untersuchungen an cGPx-Knockout-Mäusen, dass diese zwar scheinbar gesund sind (Ho et al., 1997), jedoch eine stark erhöhte Sensibilität gegenüber Oxydantien und Neurotoxinen aufweisen (De Haan et al., 1998). Ihr Gehirn entwickelt als Reaktion auf zerebrale Ischämie ein gegenüber dem Wildtyp vergrößertes Infarktareal, und die Neuronen reagieren vermehrt mit Apoptose (Crack et al., 2001).

Zwei Fallberichte über Patienten mit therapieresistenten epileptischen Anfällen in Verbindung mit einem gestörten Selenstatus (Weber et al., 1991; Ramaekers et al., 1994) ließen erstmals den Gedanken aufkommen, Veränderungen im Selenstoffwechsel könnten für bestimmte Neuropathien beim Menschen verantwortlich sein.

Die Betroffenen waren durch veränderte Werte des Plasma-Selens sowie der zellulären und der Plasma-Glutathionperoxidase aufgefallen. Zwei von ihnen waren Cousin und Cousine. So lag es nahe, eine Störung der Selenoproteinbiosynthese als Ursache für ihr Krankheitsbild in Betracht zu ziehen.

Auf diesen Überlegungen basierend wurden von Dr. Ramaekers, einem der Autoren der weiter oben zitierten Fallberichte, Blutproben von Patienten mit vergleichbarer Symptomatik und ähnlichen Laborwerten gesammelt und an unsere Arbeitsgruppe zur molekularbiologischen Untersuchung übermittelt.

Die vorliegende Arbeit beschreibt das Ergebnis einer Mutationsanalyse bei neun dieser Patienten.

Ihre DNA wurde aus Leukozyten extrahiert und auf Veränderungen in den Genen von fünf für die Selenoproteinbiosynthese essentiellen Faktoren hin untersucht: Selenocystein-Elongationsfaktor, SECIS Binding Protein, RPL30, Selenoprotein P und Selenocystein- $\beta$ -Lyase. Im Folgenden soll die Bedeutung der gefundenen Abweichungen von publizierten Referenzsequenzen erwogen werden. Allgemein sollte bei der Interpretation aller dargestellten Ergebnisse berücksichtigt werden, dass bisher keine unabhängige Verifizierung stattgefunden hat.

Die eigentliche Analyse beschränkte sich zwar auf den offenen Leserahmen (Open Reading Frame) der kodierenden Sequenz der Gene; da im allgemeinen jedoch ganze Exons amplifiziert

wurden, konnten auch innerhalb der untranslatierten Regionen (UTRs) einige Varianten gefunden werden. Dieses war sowohl für EFSec als auch für SBP2 und RPL30 der Fall. Es handelt sich in allen diesen Fällen um Basenaustausche. Ihre Rolle für die Proteinexpression ist unklar: Zwar bewirken sie keine Veränderung der Aminosäuresequenz, doch könnten sie durchaus regulatorische oder auch epigenetische Prozesse wie die DNA-Methylierung von CpG-Inseln beeinflussen und somit die Translation des jeweiligen Proteins verändern. Gleiches gilt für die in den Genen für EFSec und Scly gefundenen stillen Mutationen.

Auch im 3'UTR von SEPP wurden bei einigen der Patienten Unterschiede im Vergleich zur Referenzsequenz festgestellt. Dieses ist gesondert zu betrachten, da es sich bei SePP um ein Selenoprotein handelt, welches zehn Sec-kodierende UGA-Codons besitzt und mit zwei SECIS-Elementen ausgestattet ist. Alle diese Elemente liegen im 3'UTR.

Zunächst einmal weisen fünf der Patienten zum Teil heterozygot, zum Teil homozygot einen von zwei Basenaustauschen, die beide als SNP bekannt sind, im 3'UTR ihres letzten Exons auf. Die betreffenden Stellen haben keine bisher bekannte funktionelle Relevanz. Darüber hinaus wurden beide Varianten auch bei mehreren Kontrollen gefunden.

Bei insgesamt sieben der neun untersuchten Patienten wurden Veränderungen in oder nahe bei ihrem zweiten SECIS-Element festgestellt:

Erstens ist die Bedeutung der bei drei der Patienten gefundenen T-Insertion nahe des SECIS-Stemloop zu diskutieren. Die betreffende Stelle liegt zwar nicht mehr im komplementären Bereich der Haarnadel-Struktur; allerdings gibt es derzeit nur wenige Daten zur funktionellen Bedeutung der SECIS-umgebenden Sequenzregionen, die sich zum größten Teil auf PHGPx beziehen (Copeland and Driscoll, 1999; Copeland et al., 2000). Tatsächlich wäre es durchaus denkbar, dass nicht nur der eigentliche Stem-Loop, sondern auch angrenzende Sequenzregionen für die Sec-Dekodierung in SEPP notwendig sind. Da diese Insertion auch bei vier der insgesamt zehn analysierten Kontrollen gefunden wurde und bereits als SNP mit hoher Heterozygotenfrequenz (rund 40 %) bekannt ist, kann sie allerdings nicht für sich allein genommen für das Krankheitsbild der betroffenen Patienten 7, 9 und 11 verantwortlich sein.

Zweitens wurde bei den Patienten 6 und 10 eine Deletion von vier Basen im selben Produkt, SEPP 5.4, beobachtet. Diese Deletion wurde auch bei zwei der Kontrollen wiedergefunden. Allerdings weisen die beiden Patienten im Gegensatz zu den übrigen sowie zu allen sequenzierten Kontrollen jeweils einzigartige Kombinationen von Polymorphismen in ihrem letzten Exon, SEPP 5, auf. Patient 6 besitzt, in beiden Fällen heterozygot, einen bekannten SNP in SEPP 5.2 und die erwähnte Deletion in SEPP 5.4; Patient 10 zeigt drei heterozygote

Auffälligkeiten: die Deletion sowie zwei bekannte SNPs. Eine solche Compound Heterozygotie könnte sich störend auf die Selenoprotein P-Synthese auswirken. Ihre Relevanz sollte deswegen in weiteren Experimenten überprüft werden, beispielsweise mittels eines Reporter-gen-Assays und Zellkultur.

Insgesamt gilt für alle Mutationen im Bereich des SECIS-Elements, dass eine Beeinträchtigung dieser Struktur zum Verlust der Sec-kodierenden Funktion eines oder mehrerer UGA-Kodons und damit zum Kettenabbruch in der Proteinbiosynthese führen könnte. Ein so verkürztes Protein wäre nicht mehr in der Lage, die Aufgaben von SEPP regelrecht zu erfüllen. Der resultierende Phänotyp könnte somit durchaus der Symptomatik der hier untersuchten Kinder entsprechen.

Bei Patient 6 wurde im vierten Exon von EFSEC ein Basentausch gefunden, welcher Auswirkung auf die zugehörige Aminosäure hat: Anstatt Prolin wird Leucin in die Peptidkette eingebaut. Da eine solche Variante weder bei den insgesamt zehn Kontrollen noch in der SNP-Datenbank zu finden war, stellt sich die Frage nach ihrem Auftreten in der gesunden Bevölkerung sowie nach ihrem Krankheitswert. Besonders da es sich hierbei um einen auch bezüglich des SEPP-Gens auffälligen Patienten handelt (vgl. weiter oben und 3.4.3), erscheint eine Sequenzierung weiterer neurologisch unauffälliger Kontrollen ebenso wie eine experimentelle Untersuchung der Relevanz dieser Mutation für die Funktionalität von EFSEC und für den Selenmetabolismus im allgemeinen wichtig. Darüber hinaus wäre eine funktionelle Analyse dieser Veränderung in EFSEC in Kombination mit den weiter oben erwähnten Polymorphismen desselben Patienten in SEPP sinnvoll.

Im Gen der Sec- $\beta$ -Lyase wurde bei fünf der Patienten in homozygoter und bei drei von ihnen in heterozygoter Form ein Polymorphismus innerhalb der kodierenden Sequenz des fünften Exons festgestellt. Dieser besteht aus einem Basentausch von Threonin zu Alanin und ist bereits in der Literatur als SNP bekannt. Aufgrund seiner Häufigkeit in der Gesamtbevölkerung - tatsächlich wurde dieser Polymorphismus auch bei einer der hier sequenzierten Kontrollen in heterozygoter Form gefunden - kann dieser Basentausch für sich allein genommen nicht die Ursache für das Krankheitsbild der hier untersuchten Patienten sein. Als prädisponierender Faktor ist er hingegen nicht auszuschließen.

Zwei weitere, als SNP publizierte Varianten wurden bei fünf der Patienten in SCLY detektiert. Es handelt sich um synonyme Basenaustausche in der kodierenden Sequenz; demzufolge führen sie zu keiner Veränderung der betreffenden Aminosäuren. Über ihren Krankheitswert kann nur spekuliert werden. Da ihre Heterozygotenfrequenz - ebenso wie diejenige für den zuvor

diskutierten nicht-synonymen Basentausch in Exon 5 - in der Allgemeinbevölkerung über 30 % beträgt, erscheint es unwahrscheinlich, dass sie, selbst in Kombination, wie dies bei einigen der hier untersuchten Patienten der Fall ist, zu einer relevanten Störung des Metabolismus führen.

Es war Aufgabe dieser Arbeit, Open Reading Frames sowie die Intaktheit der Exon/Intron-Grenzen zu untersuchen. Mutationen in anderen Bereichen der untersuchten Gene wären aber unter Umständen ebenfalls in der Lage, die Selenoproteinbiosynthese zu beeinträchtigen. So könnten eine Sequenzierung der untranslatierten Regionen dieser Gene ebenso wie die Suche nach Promotoralterationen nächste Schritte auf dem Weg zur Ursachenforschung für die Neuropathien der beschriebenen Patienten sein.

Nicht zuletzt muss daran erinnert werden, dass insgesamt fünf Produkte im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert werden konnten. Es ist wahrscheinlich, dass die Amplifizierung dieser Produkte aus technischen Gründen scheiterte – eine mangelhafte Qualität der DNA-Extraktion wäre gut vorstellbar, da die betroffenen Patienten 5, 9 und 10 im allgemeinen besonders mühsame PCR-Optimierung erforderten. Dennoch darf nicht ausgeschlossen werden, dass größere genetische oder epigenetische Fehler in den entsprechenden Exons die Amplifikation verhinderten.

Wie in der Einleitung näher erläutert, beruht die Synthese von Selenoproteinen auf dem Einbau der Aminosäure Selenocystein. Aus diesem Grund muss auch eine Rolle möglicher Funktionseinschränkungen der an der Sec-Synthese beteiligten Enzyme sowie der tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> bei der Entstehung des hier beschriebenen Krankheitsbildes bedacht werden. So könnten Mutationen in den Genen für SPS1 oder SPS2, Sela, PSTK, SecP43 oder der tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> weitreichende Folgen für den Selenmetabolismus haben und auf diese Weise neurologischen Schaden hervorrufen. Deswegen beschäftigt sich zu diesem Zeitpunkt eine weitere Promotionsarbeit mit der Sequenzanalyse dieser Gene bei den hier geschilderten Patienten.

Da eine Deletion der tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> im Mausmodell bereits im Embryonalstadium letal endet, ist ein völliger Ausfall dieses Moleküls in diesen Fällen sehr unwahrscheinlich; eine teilweise Funktionseinschränkung wäre dagegen gut vorstellbar (Carlson et al., 2005).

Schließlich ist auch an einen Defekt der Selenaufnahme ins Gehirn zu denken. Da dieses Organ in der Lage ist, auch unter Selenmangelbedingungen seinen Selenspiegel aufrecht zu erhalten (Prohaska and Ganther, 1976; Behne et al., 1988), dürfte es von peripheren Störungen zunächst nicht betroffen sein (Schweizer et al., 2005). Nun ist das bei den in der vorliegenden Arbeit

untersuchten Patienten aber der Fall, sodass neben einer Dysregulation im intrazellulären Selenoprotein-Biosyntheseapparat oder einem Defekt des SePP selbst, welches ja unter anderem als Selentransportmolekül für das Gehirn postuliert wird, auch eine Störung der Selenaufnahme ins Gehirn als Ursache in Frage kommt. Die Art und Weise, wie Selen aus dem Plasma ins Gehirn gelangt, ist bisher ungeklärt. Die Tatsache, dass SePP an Endothelzellen zerebraler Gefäße bindet (Burk et al., 1997), wirft die Frage auf, ob es von den Endothelzellen resorbiert wird, oder ob dieses Selenoprotein in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu durchqueren. Gegen eine freie Durchgängigkeit spricht die Beobachtung, dass die Selen-Konzentration im Liquor lediglich halb so hoch ist wie diejenige im Serum (Meseguer et al., 1999). So muss es zumindest eine gewisse Regulation in diesem Bereich geben. Da sich die Antigen-Eigenschaften von SePP im Gehirn im Vergleich zu denjenigen von Plasma-SePP unterscheiden (Burk et al., 1997) und SePP-mRNA im Gehirn nachgewiesen wurde (Saijoh et al., 1995), kann allerdings ein komplexerer Mechanismus für die Interaktion zwischen Plasma- und Gehirn-SePP erwartet werden. In der Tat ist eine eigenständige SePP-Synthese durch das Gehirn wahrscheinlich (Schweizer et al., 2005).

Angesichts einer solchen Doppelrolle von SePP als Plasma- und als hirnspezifisches Protein wurde auf eine mögliche Parallele zum Eisentransportsystem hingewiesen (Richardson, 2005): Das Eisentransportprotein Transferrin bindet an die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke und assoziiert mit dem membranständigen Transferrinrezeptor 1; der gesamte Komplex wird daraufhin durch Endozytose aufgenommen. In der Zelle wird das so gewonnene Eisen aus dem Komplex gelöst und über noch unbekannte Mechanismen an hirnspezifische Transferrinmoleküle im Interstitium weitergegeben.

Ob tatsächlich eine Analogie zwischen Eisen- und Selenversorgung des Gehirns besteht, bleibt noch zu klären. Eine Antwort auf die Frage, ob ein spezifischer Rezeptor für Plasma-SePP im Gehirn existiert, wäre dabei sicherlich ein wertvoller weiterer Schritt.

Der Stellenwert dieser Arbeit besteht meiner Ansicht nach darin, dass sie auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Funktion einzelner Akteure in der Selenoproteinbiosynthese und neurologischen Defiziten beim Menschen hinweist und einen ersten Versuch unternimmt, hierfür in Frage kommende molekularbiologische Ursachen zu klären.