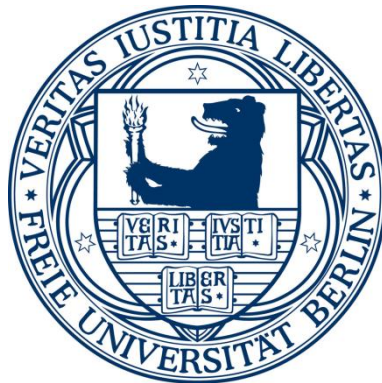


Die Selen-abhängige Tumorigenese im Mausmodell: Einfluss des Selenoprotein P-Genotyps und des COX2-Hemmers Sulindac

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

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



vorgelegt von

Tobias Endermann

aus Lünen (Westfalen)

2011

Die experimentelle Arbeit für die vorliegende Dissertation wurde zwischen Juni 2007 und Dezember 2010 am Institut für Experimentelle Endokrinologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Direktor Prof. Dr. Josef Köhrle, unter der Leitung von Prof. Dr. Lutz Schomburg angefertigt.

Berlin, November 2011

1. Gutachter: Prof. Dr. Josef Köhrle

2. Gutachter: Prof. Dr. Petra Knaus

Disputation am 01.02.2013



Diese Arbeit wurde finanziert durch
die Deutsche Krebshilfe und
die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Deutsche
Forschungsgemeinschaft

DFG

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Geschichte des Selens	1
1.2 Vorkommen und biologische Bedeutung.....	2
1.3 Nahrungsaufnahme und verschiedene Selenformen.....	3
1.4 Selenoproteine und ihre Biosynthese.....	4
1.4.1 SeCys-haltige Selenoproteine	4
1.4.2 SeMet-haltige Proteine	4
1.4.3 Se-bindende Proteine.....	5
1.4.4 Biosynthese der Selenoproteine	5
1.5 Hierarchie der Selenoproteine.....	6
1.6 Funktion von Selenoproteinen.....	7
1.6.1 Die Glutathion-Peroxidasen (GPX)	7
1.6.2 Die Thioredoxin-Reduktasen (TXNRD).....	8
1.6.3 Die Iod-Thyronin-Deiodasen (DIO)	9
1.6.4 Selenoprotein P (SEPP)	9
1.7 Selen und Krebs	12
1.8 Selen und Inflammation	16
1.9 Mausmodelle	17
1.9.1 <i>SepP</i> -KO-Maus	17
1.9.2 <i>Apc^{Min/+}</i> -Maus	17
1.10 Zielsetzung der Arbeit	19
2. Material und Methoden	21
2.1 Materialien	21
2.1.1 Chemikalien	21
2.1.2 Puffer und Lösungen	21
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.4 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	21
2.1.5 Geräte	22
2.1.6 Software	23
2.1.7 Datenbanken.....	23
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Tierexperimentelles Arbeiten	23
2.2.1.1 Verwendete Mauslinien.....	23
2.2.1.2 Maushaltung und –zucht	23

2.2.1.3 Präparation der Versuchstiere und Tumoranalyse	24
2.2.1.4 Bestimmung von Tumoranzahl und –größe.....	24
2.2.3 Molekularbiologische Methoden	25
2.2.3.1 Genotypisierung	25
2.2.3.1.1 Isolation genomischer DNA	25
2.2.3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	25
2.2.3.1.3 Agarosegelelektrophorese	26
2.2.3.1.4 Genotypisierungsprimer.....	26
2.2.3.2 Genexpressionsanalysen	27
2.2.3.2.1 RNA-Isolation aus Tumoren	27
2.2.3.2.2 RNA-Isolation aus eingefrorenem Gewebe.....	27
2.2.3.2.3 RNA-Aufreinigung mittels RNEasy®-Säulchen	28
2.2.3.2.4 Genchip-Analyse	28
2.2.3.2.5 cDNA-Synthese	28
2.2.3.2.6 Real Time-PCR	29
2.2.3.2.7 Real Time-Primer	30
2.2.4 Bestimmung der Glutathion-Peroxidase-Aktivität.....	31
2.2.5 Messung von Zytokinen aus Mausserum.....	32
2.2.6 Histologie	33
2.2.6.1 Einbetten von Därmen in Paraffin.....	33
2.2.6.2 Herstellung von Paraffinschnitten.....	33
2.2.6.3 Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	33
2.2.6.4 Chloracetatesterase-Färbung.....	34
2.2.6.5 Immunhistologie	35
2.2.7 Total-Reflexions-Röntgenfluoreszenz-Analyse (TRFA).....	35
2.2.8 Statistik.....	36
3. Ergebnisse.....	37
3.1 Einfluss des <i>SepP</i> -Genotyps auf die Tumorigenese in <i>Apc^{Min/+}</i> -Mäusen	37
3.2 Einfluss des Se-Gehalts der Nahrung auf die Tumorigenese in <i>Apc^{Min/+}</i> -Mäusen	39
3.2.1 Se-Supplementation von <i>Apc^{Min/+}</i> -Mäusen	39
3.2.2 Se-Supplementation von <i>SepP^{+/-} Apc^{Min/+}</i> -Mäusen.....	41
3.2.3 Bestimmung des Se-Satus der Versuchstiere.....	42
3.2.4 Se-defiziente Fütterung von <i>Apc^{Min/+}</i> - und <i>SepP^{+/-} Apc^{Min/+}</i> -Mäusen	43
3.3 Strategien zur Therapie der Tumorigenese von <i>Apc^{Min/+}</i> -Mäusen	45
3.3.1 Se-Supplementation als Therapie-Strategie	45
3.3.2 NSAID-Therapie	47
3.3.3 Kombination von Sulindac- und Se-Therapie.....	48

3.4 Tumoranalysen	50
3.4.1 Se-Konzentrationen im Tumor und gesundem Normalgewebe	50
3.4.2 Molekularbiologische Untersuchungen von Tumorgewebe	51
3.4.2.1 Differentielle Expression von Genen des Wnt-Signalweges	52
3.4.2.2 Differentielle Expression von Selenoprotein-Genen	53
3.4.2.3 Differentielle Expression von SepP-Rezeptor-Genen	54
3.4.2.4 Differentielle Expression von Inflammationsmarker-Genen	55
3.4.2.5 Differentielle Expression Mastzell-spezifischer Genen	55
3.4.3 Histologische Untersuchungen der Darmpräparaten	56
3.4.3.1 Pathologische Begutachtung der Entartung des Tumorgewebes	57
3.4.3.2 Nachweis von Mastzellen im Tumorgewebe	58
3.5 Nachweis von Zytokinen im Serum von <i>Apc</i> ^{Min/+} -Mäusen	64
4. Diskussion.....	66
4.1 Einfluss des <i>SEPP</i> -Genotyps auf die Tumorigenese.....	67
4.1.1 <i>SEPP</i> -Konzentrationen im Blut.....	67
4.1.2 <i>SEPP</i> -mRNA im Gewebe	68
4.2 Einfluss des Se-Gehalts der Nahrung auf die Tumorigenese	69
4.3 Therapie-Strategien mit Sulindac und Selen	72
4.4 Transkriptionsanalysen	75
4.5 Nachweis von Mastzellen im Tumorgewebe	76
4.6 Fazit und Ausblick.....	78
5. Zusammenfassung	81
6. Summary.....	82
7. Literatur.....	83
Abkürzungsverzeichnis	101
Abbildungsverzeichnis.....	105
Tabellenverzeichnis	107
Publikationen	108
Danksagung.....	109
Erklärung.....	111

1. Einleitung

1.1 Geschichte des Selens

Das Spurenelement Selen (Se) wurde bereits 1817 von dem schwedischen Chemiker Jöns Jakob Berzelius (1779-1848) als metallische Ablagerung im Bleikammerschlamm



Abb. 1.1: Berzelius.

Lithographie von P.H. van den Heuvel, 1836. Quelle: *wikipedia*

einer Schwefelsäurefabrik entdeckt und aufgrund seines silbrig matten Glanzes in Anlehnung an das bereits bekannte Element Tellur (lat. *Tellus* = Erde) nach der Mondgöttin (griech. *Selene*) benannt. Allerdings sollte es bis Mitte des letzten Jahrhunderts dauern, neben den toxischen auch die gesundheitsfördernden Eigenschaften des Selens zu erkennen. Den deutschen Medizinern Schwarz und Foltz gelang es in den 50er Jahren, Ratten durch gezielte Selengabe vor einer diätetisch hervorgerufenen Lebernekrose zu schützen (Schwarz 1951; Schwarz and Foltz 1958). In den 70er Jahren wurde schließlich die zytosolische Glutathion-

Peroxidase (GPX1), ein antioxidatives Enzym, als erstes Selenoprotein bei Säugern identifiziert (Flohé, Günzler et al. 1973). Das Selen hatte nun endgültig einen Wandel im Ansehen vom Gift zum essentiellen Spurenelement vollzogen.



Abb. 1.2: Das Ansehen des Selens im Wandel der Zeit. Waren zunächst nur die toxischen Eigenschaften bekannt, identifizierte man Selen Mitte des letzten Jahrhunderts als essentielles Spurenelement. Heutzutage sind seine chemopräventiven und gesundheitsfördernden Eigenschaften bei schlecht versorgten Menschen unumstritten (Cartoon modifiziert nach (Vernie 1984)).

1.2 Vorkommen und biologische Bedeutung

Selen (Ordnungszahl: 34, Atommasse: 78,96 g/mol) gehört zur Hauptgruppe VI des Periodensystems der Elemente und bildet mit Sauerstoff, Schwefel, Tellur und Polonium die Gruppe der Chalkogene (griech. Erzbildner). Es findet sich ubiquitär im Erdreich, im Gestein und Gewässer, ist allerdings mit ca. 0,09 ppm ein eher seltenes Element der Erdkruste, ähnlich dem Gold. Weltweit gibt es hohe regionale Unterschiede in den Selenkonzentrationen der Böden, was folglich Auswirkung auf dort wachsende Pflanzen, Nutztiere und den Menschen hat.

In ländlichen Gebieten Chinas konnten die Keshan-Krankheit (Ge, Xue et al. 1983; Liu, Chiba et al. 2002), eine dilatative Kardiomyopathie bei Kindern und jungen Frauen, und die Kashin-Beck-Krankheit (Moreno-Reyes, Suetens et al. 1998), eine degenerative Gelenkerkrankung, unter anderem auf Selenmangel zurückgeführt werden. Weitere Faktoren begünstigen allerdings erst den Ausbruch dieser Krankheiten, wie eine zusätzliche Coxsackieviren-Infektion im Falle der Keshan-Krankheit (Beck, Levander et al. 2003) und eine Jodunterversorgung und Verunreinigungen im Trinkwasser und in Getreideprodukten im Falle der Kashin-Beck-Krankheit (Sudre and Mathieu 2001). Durch gezielte Se-Supplementation ist eine Behandlung bzw. Prophylaxe dieser Krankheiten aber möglich und entsprechend wird die volle Ausbildung des Krankheitsbildes heutzutage nicht mehr beobachtet (Ge and Yang 1993). Ebenfalls in China gibt es Gebiete endemischer Selenübersversorgung, in denen es zu den eher seltenen Selenvergiftungen (Selenosen) kommen kann (Yang, Wang et al. 1983). Symptome hierfür sind Haarausfall, Ausfall von Finger- und Fußnägeln, Übelkeit und Erbrechen, nach Knoblauch riechender Atem, Herz-Kreislauf-Störungen und gastrointestinale Störungen bzw. sogar Verätzungen nach der Aufnahme bestimmter Selenverbindungen (Barceloux 1999). Bereits im 13. Jahrhundert wurden solche Symptome von Marco Polo auf seiner Asienreise bei seinen Lasttieren beobachtet. Auch falsch dosierte Se-Supplementationen führten in seltenen Fällen schon zu Selenosen (MacFarquhar, Broussard et al. 2010).

Schon Paracelsus erkannte 1538 „*dosis sola facit venenum*“ (= allein die Dosis macht das Gift) und heutzutage wissen wir, dass eine ausreichende Selenversorgung essentiell ist für die menschliche Gesundheit. Selen ist wichtig für die körperliche und geistige Entwicklung, den Schilddrüsenhormonmetabolismus, das Herz-Kreislaufsystem, die männliche Fertilität, ein funktionierendes Immunsystem und spielt eine große Rolle bei der Prävention und Therapie von Zivilisations- und Infektionskrankheiten (Rayman 2000).

Die empfohlene tägliche Se-Aufnahme (RDA = *recommended dietary allowance*) beträgt ca. 1 µg Se/kg Körpergewicht, also ca. 55 µg (Frauen) bzw. 70-100 µg (Männer) pro Tag, gemessen an der nötigen Dosis für die maximale Aktivität der plasmatischen Glutathion-Peroxidase (GPX3) (Thomson, Robinson et al. 1993). Durch den niedrigen Selengehalt im Boden, der vermutlich auf eiszeitliche Auswaschungen zurückzuführen ist, sind Europäer tendenziell unterversorgt und nehmen nur ca. 30-50 µg Se/Tag zu sich. Eine Ausnahme bildet Finnland mit einer täglichen Aufnahme von ca. 100 µg/Tag, da hier seit 1984 landesweit gezielt Se-haltige Düngemittel verwendet werden (Aro, Alfthan et al. 1995). Im Gegensatz zu Europa sind z.B. nordamerikanische Böden Se-reich, was zu einer überdurchschnittlichen Versorgung mit bis zu 150 µg/Tag führt. Als chemopräventiv gilt eine Aufnahme von bis zu 200 µg Se/Tag, als eine kritische Obergrenze, ab der es zu Selenosen kommen kann, gilt 800 µg/Tag (Barceloux 1999).

1.3 Nahrungsaufnahme und verschiedene Selenformen

Selen wird über die Nahrung hauptsächlich in Form von Se-haltigen Aminosäuren, in pflanzlichen Nahrungsmitteln überwiegend als Selenomethionin (SeMet), in tierischen als Selenocystein (SeCys) oder in Form von anorganischem Selenit (SeO_3^{2-}) oder Selenat (SeO_4^{2-}) aufgenommen (Combs 2001). Aufgrund der oben angeführten geringen Selenkonzentrationen im Boden ist für Europäer für eine ausreichende Se-Aufnahme vor allem der Verzehr von Fleisch, Fisch, Milch und Eiern wichtig, da Selen in der Tierhaltung als Nahrungsergänzungsmittel zugelassen ist, sowie importiertes Getreide und Nüsse (Walnüsse, Cashew-Kerne, Paranüsse) aus Se-reichen Gebieten. Menschen, die sich einseitig ernähren, z.B. strikte Veganer oder Vegetarier, riskieren folglich eher die Gefahr einer Selenunterversorgung (Hoeflich, Hollenbach et al. 2010) und sollten auf Nahrungsergänzungsmittel zurückgreifen, in denen Selen in Form von Se-Hefe (SeMet) oder Na_2SeO_3 bzw. Na_2SeO_4 enthalten ist (Schrauzer 2001). Sowohl das in Aminosäuren gebundene, wie auch anorganisches Selen wird über den Zwölffinger- und Dünndarm gut aufgenommen. An der Resorption von Selenat ist sowohl ein Na^{2+} -Cotransport-, als auch ein OH^- -Antiportsystem beteiligt, Selenit dagegen wird passiv transportiert. SeMet und SeCys gelangen analog zu schwefelhaltigen Aminosäuren über Na^+ -abhängige Aminosäuretransporter in den Organismus (Wolffram 1995). Während SeMet unverändert statt Methionin in Proteine eingebaut werden kann, müssen SeCys, Selenat und Selenit zunächst zu H_2Se (Dihydrogenselenid) metabolisiert werden, um das Selen für die Biosynthese der „echten“ SeCys-haltigen Selenoproteine verfügbar zu machen. Die Ausscheidung von überschüssigem Se erfolgt über die Atmung als Methylselenol oder Dimethylselenid sowie unter normalen Bedingungen überwiegend über den Urin als Trimethylselenonium-Ion oder als Selenozucker (Suzuki and Ogra 2002).

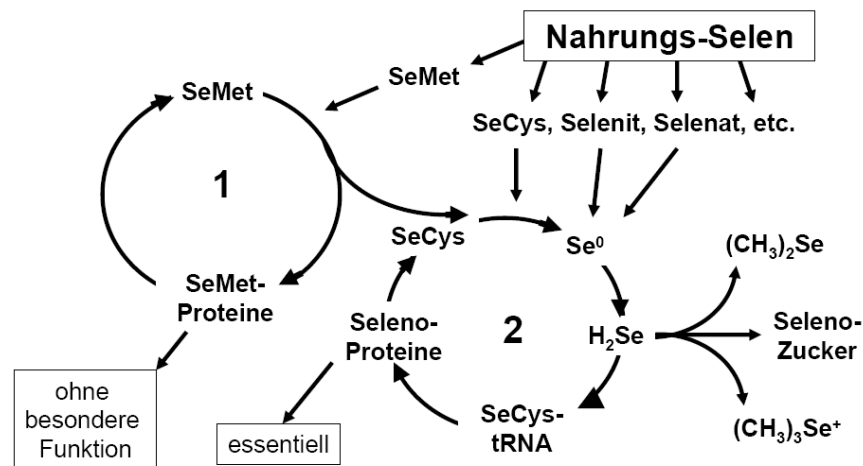


Abb. 1.3: Der Metabolismus von Selen. Während SeMet direkt in Proteine eingebaut werden kann, werden SeCys, Selenit und Selenat zunächst zu Dihydrogenselenid (H_2Se) metabolisiert, bevor es durch ATP aktiviert auf eine Seryl-tRNA übertragen und als SeCys-tRNA für die Biosynthese der echten Selenoproteine verwendet werden kann. Überschüssiges Selen kann über den Urin als Selenozucker oder Trimethylselenium-Ion ausgeschieden oder als flüchtiges Dimethylselenid abgeatmet werden (Schauder and Ollenschläger 2006).

1.4 Selenoproteine und ihre Biosynthese

Menschliche Zellen können drei Arten von Se-haltigen Proteinen synthetisieren, SeCys- bzw. SeMet-haltige sowie Se-bindende Proteine, abhängig davon, welche Se-Form mit der Nahrung aufgenommen wurde (Burk, Hill et al. 2001):

1.4.1 SeCys-haltige Selenoproteine

Die eigentliche Gruppe der Selenoproteine trägt die 21ste proteinogene Aminosäure SeCys im aktiven Zentrum und wird von nur wenigen Genen (25 im Menschen, 24 im Nager) codiert (Kryukov, Castellano et al. 2003), ist aber für fast alle physiologischen Wirkungen des Selens im Organismus verantwortlich. Für die Biosynthese der Selenoproteine hat sich eine einzigartige Synthesemaschinerie entwickelt, die im folgenden Kapitel näher beschrieben werden soll.

1.4.2 SeMet-haltige Proteine

SeMet wird unspezifisch statt Met in wachsende Polypeptidketten eingebaut, da die eukaryotische Synthesemaschinerie nicht zwischen schwefel- und selenhaltigem Met unterscheidet (Daniels 1996). Somit steigt bei erhöhter SeMet-Versorgung zwar der relative Gehalt von Se im Plasma, allerdings wird den SeMet-haltigen Proteinen selbst keine gesonderte biologische Bedeutung beigemessen, vielmehr ist bei einer längerfristig steigenden SeMet-Konzentration die Umwandlung vom SeMet durch Transselenierung zu SeCys entscheidend (Hoefig, Renko et al. 2011).

1.4.3 Se-bindende Proteine

Die bisher am schlechtesten charakterisierte Gruppe ist die der Se-bindenden Proteine, die durch ^{75}Se -Markierungsversuche identifiziert wurden, deren Funktion im Metabolismus aber weitgehend unverstanden ist. Zum einen sind die 56 kDa-SELENBP1/2 (Bansal, Mukhopadhyay et al. 1990; Lanfear, Fleming et al. 1993) beschrieben, die vermutlich am Proteintransport innerhalb des Golgi-Apparates beteiligt sind (Porat, Sagiv et al. 2000) und eine negative Regulation zeigen im Prostata- (Yang and Sytkowski 1998), Lungen- (Chen, Wang et al. 2004), Ovarial- (Huang, Park et al. 2006) und Darmkrebs (Kim, Kang et al. 2006). Eine aktuelle Studie zeigt, dass SBP1 eine funktionelle und physikalische Bindung mit der zytosolischen Glutathion-Peroxidase (GPX1) eingehen kann und diese beiden Proteine sich offenbar gegenseitig regulieren können (Fang, Goldberg et al. 2010). Außerdem gibt es das 14 kDa-L-FABP (*L-type fatty acid binding protein*), das im Zytosol am Fettsäuretransport und -metabolismus beteiligt ist (Bansal, Cook et al. 1989).

1.4.4 Biosynthese der Selenoproteine

Voraussetzung für die Biosynthese der SeCys-haltigen Selenoproteine ist die Aminoacylierung einer spezifischen transfer RNA ($\text{tRNA}^{\text{[Ser]Sec}}$) mit der Aminosäure Serin durch die Seryl-tRNA-Synthase (SerS) (Lee, Worland et al. 1989), die danach von der Phosphoseryl-tRNA-Kinase (PSTK) an der Serylgruppe phosphoryliert wird (Carlson, Xu et al. 2004). Nun kann die Selenocystein-Synthase (SecS) die entstandene Serylhydroxylgruppe durch einen Selenolrest ersetzen, wobei als Se-Donor ein Selenophosphat dient, das zuvor von der Selenophosphat-Synthetase 2 (SPS2), selbst ein Selenoprotein, unter ATP-Verbrauch aus dem H_2Se -Pool gebildet wurde (Low, Harney et al. 1995).

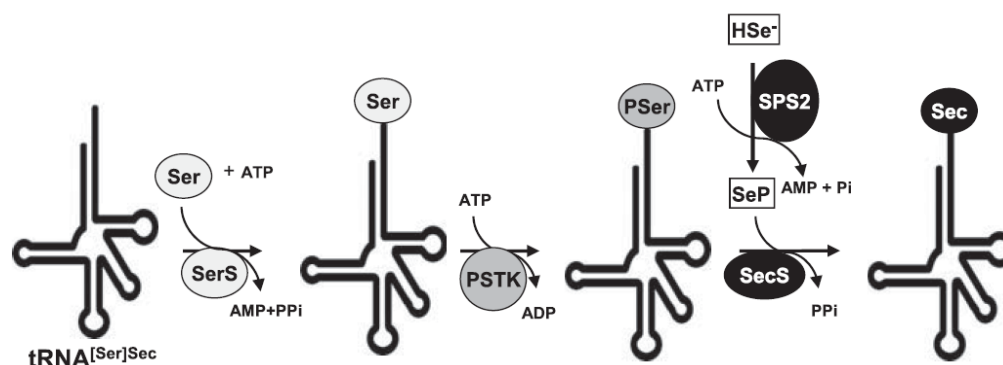


Abb. 1.4: Die tRNA^{[Ser]Sec}-Synthese in Eukaryoten. Die tRNA^{[Ser]Sec} wird zunächst mit Serin durch die Seryl-tRNA-Synthase (SerS) aminoacyliert und dann von der Phosphoseryl-tRNA-Kinase (PSTK) an der Serylgruppe phosphoryliert. Die Selenocystein-Synthase (SecS) ersetzt die Serylhydroxylgruppe durch eine Selenolgruppe, wobei Selenophosphat als Substrat dient, das zuvor durch die Selenophosphat-Synthase 2 (SPS2) aus dem H_2Se -Pool gebildet wurde (Xu, Carlson et al. 2007).

Der Einbau eines SeCys in eine wachsende Peptidkette stellt insofern eine Besonderheit dar, als das UGA-Stoppkodon rekodiert wird (Lee, Worland et al. 1989). Voraussetzung hierfür ist eine charakteristische Haarnadelstruktur im 3'-untranslatierten Bereich, das SECIS-Element (Selenocystein Insertions-Element) (Berry, Banu et al. 1991; Berry, Banu et al. 1993). Dieses wird vom SECIS Binding Protein 2 (SBP2) (Copeland and Driscoll 1999; Copeland, Fletcher et al. 2000) und dem eukaryotischen Sec-spezifischen Elongationsfaktor (mSelB/eEFSec) (Fagegaltier, Hubert et al. 2000) erkannt und gebunden. Mit Hilfe weiterer Faktoren, wie dem ribosomalen Protein L30 (Chavatte, Brown et al. 2005), dem 43 kDa RNA-bindenden Protein Secp43 und dem SLA (*soluble liver antigen*), das als die Selenocystein-Synthase (SecS) identifiziert werden konnte (Xu, Mix et al. 2005; Schauder and Ollenschläger 2006), entsteht ein Proteinkomplex (Selenosom), der die mit SeCys beladene tRNA zum Ribosom rekrutiert und den Einbau des SeCys in die wachsende Peptidkette koordiniert (Small-Howard, Morozova et al. 2006).

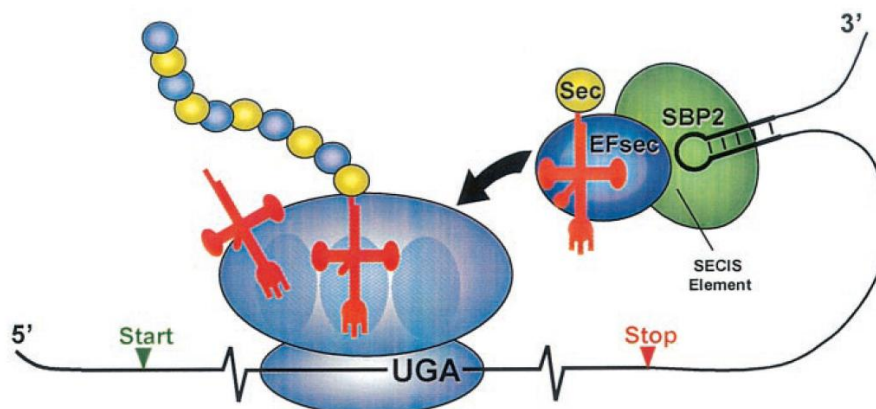


Abb. 1.5: Vereinfachte Darstellung der SeCys-Inkorporation in eine wachsende Polypeptidkette. Das SECIS-Element (Selenocystein Insertions-Element) im 3'-untranslatierten Bereich wird vom SECIS Binding Protein 2 (SBP2) und dem eukaryotischen Sec-spezifischen Elongationsfaktor (mSelB/eEFSec) erkannt und gebunden. Diese rekrutieren mit Hilfe weiterer Faktoren die mit SeCys beladene tRNA zum Ribosom (Hatfield and Gladyshev 2002).

1.5 Hierarchie der Selenoproteine

Die Biosynthese der Selenoproteine wird in erster Linie durch die Verfügbarkeit des Selens bestimmt. Daher kommt es bei Selenmangel zu einer reduzierten Proteinbiosynthese aber auch zu einer Reduktion bestimmter mRNA-Spiegel von Selenoproteinen. Diese werden instabil und durch einen sogenannten „*nonsense mediated decay*“ (NMD) abgebaut (Moriarty, Reddy et al. 1998). NMD ist ein Kontrollmechanismus in eukaryotischen Zellen, der bei Vorhandensein eines durch Mutation herbeigeführten vorzeitigen Stoppkodons eine Expression verkürzter Proteine durch mRNA-Abbau verhindert. Ein Schutz vor diesem Abbau wird u.a. vermittelt durch

die unterschiedlich starke Bindungsaffinität des SBP2 an die verschiedenen SECIS-Elemente, was einigen Transkripten eine gewisse NMD-Resistenz verleiht, so dass diese besonders wichtigen Selenoprotein-mRNAs im Selenmangel nicht abgebaut werden. Hieraus folgt eine bevorzugte Biosynthese einiger Selenoproteine im Vergleich zu anderen (Low, Grundner-Culemann et al. 2000). Diese Hierarchie ist wichtig, damit auch in Se-Mangelsituationen weiterhin überlebenswichtige Enzyme wie die Thioredoxin-Reduktasen, die Deiodasen sowie GPX2 und 4 synthetisiert werden, während der Organismus z.B. auf GPX1 und 3 oder Selenoprotein S (SELS) eher verzichten kann (Behne and Kyriakopoulos 2001) (auf diese Proteine wird im Einzelnen später eingegangen). Verantwortlich für die Unterscheidung dieser Stress-responsiven Selenoproteine zu den *housekeeping*-Selenoproteinen scheint u.a. eine Methylierung der Sec-beladenen tRNA^{[Ser]Sec} bei steigendem Selengehalt zu sein (Hatfield, Lee et al. 1991; Diamond, Choi et al. 1993). Einzelne Organe werden ebenso einer solchen Hierarchie untergeordnet (Bermano, Nicol et al. 1995; Brigelius-Flohe 1999). Die Selenversorgung des Gehirns und der Hoden wird der von Leber, Niere oder Lunge vorangestellt (Schomburg and Schweizer 2009).

1.6 Funktion von Selenoproteinen

Die 25 menschlichen Gene für Selenoproteine kodieren für 17 Selenoproteinfamilien, einige mit mehreren Genen für ähnliche Funktionen (Kryukov, Castellano et al. 2003). Neben den funktionell gut erforschten Glutathion-Peroxidasen, den Thioredoxin-Reduktasen, den Deiodasen, dem Selenoprotein P und der bereits erwähnten SPS2 sind noch eine ganze Reihe weiterer Selenoproteine identifiziert, deren Funktion bisher allerdings weitestgehend unbekannt ist. Eine Auflistung findet sich in Tabelle 1.1.

1.6.1 Die Glutathion-Peroxidasen (GPX)

Die Glutathion-Peroxidasen (GPX) katalysieren in Anwesenheit von Glutathion (GSH) den Abbau von Hydroperoxiden und Wasserstoffperoxid zu Alkoholen. Sie besitzen somit eine entscheidende Funktion bezüglich der Kontrolle von oxidativem Stress. Im Menschen sind sieben verschiedene GPX bekannt, von denen zwei allerdings Cystein anstatt SeCys enthalten, also keine Selenoproteine sind, nämlich die GPX5 in den Nebenhoden (Vernet, Rigaudiere et al. 1996) und die ubiquitäre Phospholipid Hydroperoxid GPX7 (Utomo, Jiang et al. 2004). Eine differentielle Regulation verschiedener GPX ist mit unterschiedlichen Krebserkrankungen assoziiert (Brigelius-Flohe and Kipp 2009).

Die ubiquitär vorkommende zytosolische GPX1 (auch cGPX genannt) war 1973 das erste Enzym, das als Selenoprotein identifiziert wurde (Flohé, Günzler et al. 1973). Dass die GPX1 unter „normalen“, stressfreien Bedingungen nicht essentiell ist, deutet einerseits die

Hierarchie der Selenoproteine an, andererseits die Tatsache, dass *GPx1*-defiziente Mäuse eine normale Entwicklung durchmachen (Ho, Maguenat et al. 1997). LOH (*Loss of heterozygosity* = Verlust eines Allels z.B. durch Mutation bei bereits defektem 2. Allel) im *GPX1*-Gen ist assoziiert mit Lungen-, Brust-, Kopf- und Hals-, sowie Darmkrebs (Hu and Diamond 2003; Hu, Dolan et al. 2004; Hu, Benya et al. 2005). Der gastrointestinalen *GPX2* (auch GI-*GPX*) (Wingler and Brigelius-Flohe 1999) wird eine Schutzfunktion des Darmepithels vor Inflammation und Krebsentstehung zugeschrieben (Esworthy, Yang et al. 2005). Beim Mamma- (Esworthy, Baker et al. 1995) und Kolonkarzinom (Al-Taie, Uceyler et al. 2004), sowie beim Barrett-Ösophagus (Mork, Scheurlen et al. 2003) ist allerdings eine Überexpression der *GPX2* gezeigt, die mit erhöhter Zellproliferation und maligner Transformation einhergeht. Die vorwiegend von den Nieren in das Blutplasma sezernierte plasmatische *GPX3* (auch als p*GPX* bezeichnet) (Takahashi, Akasaka et al. 1990) wird zur Bestimmung des Selenstatus herangezogen. Bei adäquater Selenversorgung erreicht sie ein Plateau während bei Selenmangel ihre Aktivität verringert ist (Whanger, Beilstein et al. 1988). Beim Prostatakarzinom (Lodygin, Epanchintsev et al. 2005) oder Barrett-Ösophagus (Lee, Schneider-Stock et al. 2005) findet man sie häufig inaktiviert. Eine besondere Funktion erfüllt die sonst ubiquitär exprimierte Phospholipid Hydroperoxid-*GPX4* (auch PH-*GPX* genannt) (Thomas and Girotti 1988) in den Hoden, da sie einerseits antioxidative enzymatische Funktionen erfüllt, während der Spermienreifung aber eine Wandlung zu einem Strukturprotein in der Mitochondrienkapsel des reifen Spermiums durchmacht (Ursini, Heim et al. 1999). Die *GPX6* scheint nur im olfaktorischen Epithel und im embryonalen Gewebe exprimiert zu werden (Kryukov, Castellano et al. 2003).

1.6.2 Die Thioredoxin-Reduktasen (TXNRD)

Die Thioredoxin-Reduktasen (TXNRD) sind die einzigen bekannten Enzyme, die NADPH-abhängig oxidierte Thioredoxine (TXN), kleine ubiquitäre, redoxaktive Proteine, reduzieren können. Dieses zelluläre Redox-System ist aus allen lebenden Organismen bekannt (Arner and Holmgren 2000). TXNRD wurden erstmals 1996 aus T-Zellen isoliert und als Selenoproteine identifiziert (Gladyshev, Jeang et al. 1996). Inzwischen sind drei Isoformen bekannt: die zytosolische TXNRD1 (Tamura and Stadtman 1996), die mitochondriale TXNRD2/3 (Lee, Kim et al. 1999; Miranda-Vizuete, Damdimopoulos et al. 1999) und die ausschließlich im Hoden vorkommende Thioredoxin-Glutaredoxin-Reduktase (TGR) (Sun, Kirnarsky et al. 2001), die auch Glutathion und Glutaredoxin reduzieren kann. Das Thioredoxin-System spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B, Ref-1, AP-1 und p53, und somit von Zellwachstum, Apoptose und Immunantwort (Rundlof and Arner 2004). Die *TXNRD* selbst scheinen über ein antioxidatives Response-Element (ARE) transkriptionell reguliert zu werden (Hintze,

Wald et al. 2003). Die Wichtigkeit des Thioredoxin-Systems konnte in Tierversuchen unterstrichen werden: ein Knockout im *Txn*-Gen selbst führt zu embryonaler Letalität (Matsui, Oshima et al. 1996), *TxnRd1* oder *TxnRd2*-defiziente Mäuse versterben ebenfalls nach wenigen Tagen als Embryo, da Wachstum und Differenzierung (*TxnRd1*) (Jakupoglu, Przemeck et al. 2005) bzw. Hämatopoese (*TxnRd2*) (Nonn, Williams et al. 2003) gehemmt sind. Für *TXN* und *TXNRD* konnte in verschiedenen Tumorentitäten, wie Leber- (Kawahara, Tanaka et al. 1996), Lungen- (Kakolyris, Giatromanolaki et al. 2001), Brust- (Matsutani, Yamauchi et al. 2001) oder Darmkarzinomen (Grogan, Fenoglio-Prieser et al. 2000; Raffel, Bhattacharyya et al. 2003) eine Überexpression nachgewiesen werden, die assoziiert ist mit beschleunigter Zellproliferation und schlechterer Prognose für die Patienten.

1.6.3 Die Iod-Thyronin-Deiodasen (DIO)

Die Familie der Iod-Thyronin-Deiodasen (DIO) umfasst drei Vertreter, die strukturell sehr ähnlich sind und alle SeCys im aktiven Zentrum enthalten (Bianco and Larsen 2005; Köhrle, Jakob et al. 2005). Ihre Rolle besteht vor allem in der Aktivierung und Deaktivierung von Schilddrüsenhormonen, die wichtig sind für Wachstum, Entwicklung, Differenzierung und Stoffwechsel (Köhrle 2002). Daher stehen sie in der Hierarchie der Selenoproteine weit oben (Bates, Spate et al. 2000). Von der Schilddrüse wird hauptsächlich das vier Iodatome enthaltende 3,3',5,5'-Tetraiodothyronin (Thyroxin/T4) gebildet, das in das biologisch aktive 3,3',5-Triiodothyronin (T3) umgewandelt werden kann. Diese Reaktion kann von der hauptsächlich in Leber, Niere, Hypophyse und Schilddrüse exprimierten DIO1 oder von der vorwiegend im Gehirn, braunem Fettgewebe, Plazenta und Muskel vorkommenden DIO2 katalysiert werden. Der Abbau von aktivem T3 oder aktivierbarem T4 zu reversT3 (rT3) bzw. T2 erfolgt durch die DIO3, die man im Uterus, der Plazenta und im embryonalen Gewebe hoch exprimiert findet (Bianco, Salvatore et al. 2002; Köhrle, Jakob et al. 2005; Bianco and Kim 2006). Ebenso kann die DIO1 diese Innenring-Deiodierung katalysieren, allerdings sind die Mechanismen, die für die Kontrolle der DIO-Aktivitäten verantwortlich sind, bisher unverstanden (Schomburg 2011). Auch für die DIOs hat man eine veränderte Expression bei Tumorerkrankungen, besonders natürlich im Schilddrüsenkrebs, nachweisen können (Wawrzynska, Sakowicz et al. 2003; Ambroziak, Pachucki et al. 2005; de Souza Meyer, Dora et al. 2005).

1.6.4 Selenoprotein P (SEPP)

Das Selenoprotein P (SEPP) nimmt eine Sonderstellung unter den Selenoproteinen ein, da es bis zu zehn SeCys-Reste (im Menschen und in der Maus) in der Primärstruktur enthalten kann. Dabei findet sich nur ein SeCys in der N-terminalen Domäne des Proteins, die weiteren neun in einem kurzen Abschnitt der C-terminalen Domäne (Read,

Bellew et al. 1990). Nur dem N-terminalen SeCys-Rest wird derzeit eine hypothetische enzymatische Aktivität zugeordnet (Saito, Hayashi et al. 1999). So wurde z.B. gezeigt, dass SEPP Endothelzellen (Steinbrenner, Bilgic et al. 2006) und Astrozyten (Steinbrenner, Alili et al. 2006) vor oxidativem Schaden bewahren und die Oxidation von LDLs (*low density lipoproteins*) verhindern kann (Traulsen, Steinbrenner et al. 2004). Die bis zu neun C-terminalen SeCys-Reste dienen der Hauptaufgabe des SePP als Se-Speicher- und -Transportprotein. Drei der C-terminalen UGAs, die für den Einbau jeweils eines SeCys kodieren, können offenbar auch die Funktion eines Stoppkodons übernehmen, so dass drei zusätzliche Isoformen des SEPP entstehen können, wenn die Translation nach dem zweiten, dritten oder siebten UGA abbricht (Ma, Hill et al. 2002).



Abb. 1.6: Die Struktur des Selenoprotein P. SEPP kann bis zu 10 SeCys-Reste (grün) enthalten, einen im N-terminalen enzymatisch aktiven Bereich, bis zu 9 im C-terminalen Teil. Getrennt sind diese durch Histidin-reiche Bereiche, N-terminal findet sich ein Signalpeptid (SP) für die Sekretion (nach (Saito, Sato et al. 2004).

SEPP-mRNA findet sich zwar in vielen Organen, wie z.B. Niere oder Herz (Burk and Hill 1994), Hauptsyntheseort ist aber die Leber. Von dort wird SEPP als Glykoprotein in den Blutkreislauf sezerniert (Carlson, Novoselov et al. 2004), um die Selenversorgung peripherer Organen wie vor allem des Gehirns und der Hoden zu gewährleisten (Burk, Hill et al. 1991). Dies legt die Vermutung nach der Existenz von SEPP-Rezeptoren nahe und tatsächlich sind mit dem Apolipoprotein E-Rezeptor 2 (ApoER2/LRP8 = *low density lipoprotein receptor related protein 8*) und Megalin (LRP2) bereits zwei identifiziert worden (Olson, Winfrey et al. 2008; Valentine, Abel et al. 2008). Da ca. 60% des im Blut zirkulierenden Selens an SEPP fixiert ist, kann SEPP als Biomarker für den Selenstatus eines Individuums herangezogen werden und ist dabei sogar klassischen Markern wie der Gesamt-Se-Bestimmung oder der Bestimmung der Aktivität der plasmatischen GPX3 überlegen (Hollenbach, Morgenthaler et al. 2008; Hoeflich, Hollenbach et al. 2010).

Durch *SepP*-Knockout-Mäuse (Hill, Zhou et al. 2003; Schomburg, Schweizer et al. 2003) konnte inzwischen die Wichtigkeit der Selenversorgung durch SepP bezüglich Wachstum (Schweizer, Michaelis et al. 2004), Reproduktion (Olson, Winfrey et al. 2005), Gehirnfunktion (Schweizer, Schomburg et al. 2004; Valentine, Hill et al. 2005; Nakayama, Hill et al. 2007) und Immunsystem (Bosschaerts, Guilliams et al. 2008) deutlich gemacht werden. Pathophysiologisch ist vor allem eine massive Abnahme der SEPP-Konzentration

im Blut von Patienten mit Leberzirrhose (Burk, Early et al. 1998) oder mit Sepsis bekannt (Forceville, Mostert et al. 2009). Auch in kolorektalen Karzinomen (Al-Taie, Uceyler et al. 2004) und in Prostata Tumoren (Calvo, Xiao et al. 2002; Gonzalez-Moreno, Boque et al. 2011) findet sich *SEPP*-mRNA und Protein herunterreguliert. Außerdem konnten wir kürzlich in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Urologie der Charité Berlin zeigen, dass die *SEPP*-Konzentration im Serum von Prostatakrebs-Patienten verringert ist und dies sogar mit der Schwere der Erkrankung, also dem Tumorstadium, korreliert (Meyer, Hollenbach et al. 2009). Noch unpubliziert haben wir ebenfalls in Kooperation zeigen können, dass bei urogenitalen Tumoren die Serumkonzentrationen von *SEPP* mit dem Mortalitätsrisiko korrelieren (Posterpräsentation, 2. Symposium „Urologische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Urologie“ (Meyer, Endermann et al. 2011)).

Tab. 1.1: Humane Selenoproteine und ihre Funktion

Glutathion-Peroxidasen (GPX)	
GPX1 (cGPx)	Peroxidabbau im Zytosol
GPX2 (GI-GPx)	Peroxidabbau im Magen-Darm-Trakt
GPX3 (pGPx)	Peroxidabbau im Blut
GPX4 (PH-GPx)	Abbau von Membranperoxiden, Arachidonsäurestoffwechsel, Strukturprotein im reifen Spermium
GPX6	Peroxidabbau im Embryo und im Riechepithel
Thioredoxin-Reduktasen (TXNRD)	
TXNRD1	Bestandteil des zytosolischen Redoxsystems
TXNRD2/3	Bestandteil des mitochondrialen Redoxsystems
TGR	Bestandteil des testikulären Redoxsystem
Jod-Thyronin-Deiodasen (DIO)	
DIO1	Aktivierung und Inaktivierung von Schilddrüsenhormonen in Leber, Niere, usw.
DIO2	Aktivierung von T4 zu T3 vor allem im Gehirn
DIO3	Inaktivierung von T4 und T3 zu rT3 bzw. T2
Selenophosphat-Synthase 2 (SPS2)	
Methionin-Sulfoxid-Reduktase B (MRSB)	Reduktion von Methionin-Sulfoxid zu Methionin
Selenoprotein P (SEPP)	
Selenoprotein S	Se-Transporter und –Speicher im Plasma
Selenoprotein 15	Membranprotein im ER, Proteinfaltung
Selenoprotein 15	Proteinfaltung im ER
Selenoprotein N	assoziiert mit Rigid Spine Muskeldystrophie
Selenoprotein K	intrazelluläre Ca ²⁺ -Freisetzung in Immunzellen
Selenoproteine H,I,M,O,T,V und W	biologische Funktion weitgehend unbekannt

1.7 Selen und Krebs

Die Tatsache, dass das Spurenelement Selen chemopräventiv gegen Krebs wirken kann, ist heutzutage unumstritten (Combs and Gray 1998; Ip 1998; Whanger 2004; Rayman 2005). Bereits in den 70er Jahren konnte in epidemiologischen Studien ein inverser Zusammenhang zwischen dem Serum-Selenspiegel und der Krebsinzidenz und -mortalität gezeigt werden (Shamberger and Frost 1969; Schrauzer, White et al. 1977).

Mehrere Interventionsstudien in China zeigten unabhängig voneinander eine Verringerung der Krebsinzidenz nach erfolgter Se-Supplementation. Die erste Studie überhaupt, eine Langzeitinterventionsstudie über 8 Jahre in Quidong, einer Region nördlich von Shanghai, zeigte eine um die Hälfte reduzierte Leberkrebsinzidenz durch Na-Selenit-angereichertes Salz (Yu, Zhu et al. 1991). In einer separaten Studie konnte durch dieses angereicherte Salz auch die Inzidenz einer viralen Hepatitis, einem bedeutenden Risikofaktor für eine spätere Leberkrebserkrankung, verringert werden (Yu, Li et al. 1989). In weiteren Studien in China und Indien wurde die Selengabe kombiniert mit anderen Mineralien, Spurenelementen und Vitaminen (Blot, Li et al. 1993; Blot, Li et al. 1995; Prasad, Mukundan et al. 1995).

Als sicherster Beweis für die chemopräventiven Eigenschaften von Selen ist die prospektive, doppelt geblindete, Placebo-kontrollierte *Nutritional Prevention of Cancer* (NPC)-Studie anzusehen (Clark, Combs et al. 1996), die den Effekt einer gezielten Se-Supplementation auf die Entstehung von Rezidiven bei vormaligen Melanompatienten untersuchen sollte. Dabei erhielten 1312 Patienten über einen Zeitraum von durchschnittlich 4,5 Jahren eine Dosis von 200 µg Se/Tag in Form Se-angereicherter Hefe oder Placebo. Das primäre Studienziel wurde dabei zwar verfehlt (kein Effekt auf die Hautkrebsinzidenz), dennoch zeigte sich eine signifikante Verringerung der Inzidenzen für Lungen-, Prostata- und Darmkrebs sowie eine Verringerung der krebsassoziierten Sterblichkeit. Diese Effekte waren besonders deutlich im untersten Tertil der Studienteilnehmern, die mit einer Plasmaselenkonzentration von <106 ng/ml in die Studie eintraten. Verglichen mit europäischen Durchschnittswerten ist das amerikanische untere Tertil immer noch als überdurchschnittlich gut versorgt einzuordnen (Combs, Clark et al. 2001). Bei der Nachverfolgung der Studie wurden die Effekte auf die Gesamtkrebsinzidenz und -mortalität sowie auf die Prostatakrebsrate bestätigt, die Rate der Lungen- und Darmkrebserkrankungen zeigte sich allerdings nicht mehr signifikant erniedrigt (Duffield-Lillico, Reid et al. 2002).

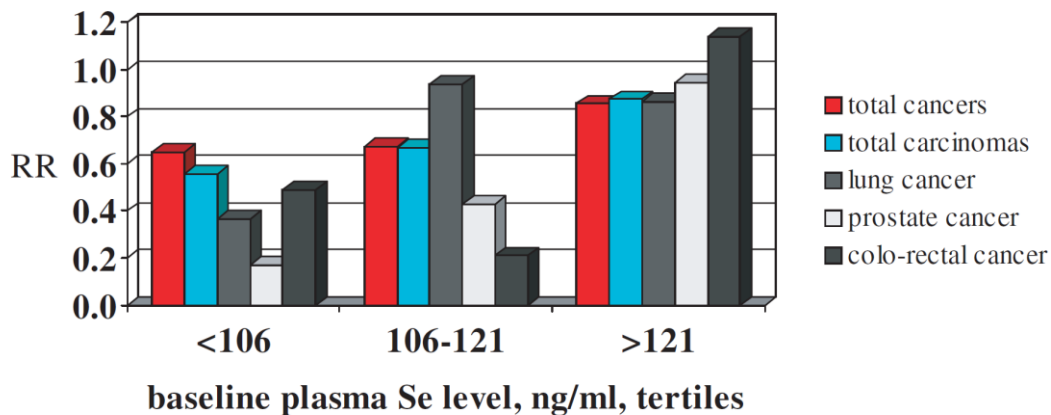


Abb. 1.7: Relatives Krebsrisiko (RR) der Studienteilnehmer der NPC-Studie. Durch die Se-Supplementation zeigte sich eine signifikante Verringerung für Lungen-, Prostata- und Darmkrebs, sowie für die gesamte Krebsinzidenz und -mortalität, insbesondere bei denjenigen Studienteilnehmern, die mit dem niedrigsten Se-Status (unteres Tertil, <106 ng/ml) in die Studie eingetreten sind (Combs, Clark et al. 2001).

Eine weitere große Studie in den USA konnte indes die durch die NPC-Studie ausgelösten hohen Erwartungen nicht erfüllen und wurde 2008 abgebrochen. Mit der SELECT (*Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial*)-Studie sollten die Effekte einer Se- und/oder Vitamin E-Supplementation auf die Prävention von Prostatakarzinomen untersucht werden (Klein, Thompson et al. 2000). Festgestellt wurde allerdings eine erhöhte Prostatakrebsinzidenz in der Vitamin E-Gruppe und ein erhöhtes Risiko für Diabetes Typ 2 in der Se-Gruppe, wenn auch beides nicht statistisch signifikant (Lippman, Klein et al. 2009).

Aus europäischer Sicht ist bedauerlich, dass eine ähnlich große Studie (PRECISE: *Prevention of Cancer by Intervention with Selenium*) abgesagt wurde (Rayman 2005), da die Ergebnisse der Amerikaner aufgrund der wesentlich besseren Grundversorgung mit Selen nicht ohne weiteres auf Europäer übertragbar sind.

Zusätzlich zeigen Meta-Analysen chemopräventive Effekte von Selen gegenüber Lungen- (Zhuo, Smith et al. 2004), Darm- (Bjelakovic, Nikolova et al. 2004; Bjelakovic, Nikolova et al. 2008) und Prostatakrebs (Etminan, FitzGerald et al. 2005), wobei im letzten Fall offenbar auch das Krebsstadium eine entscheidende Rolle spielt.

Um den präventiven Einfluss von Selen zu bestätigen und dessen molekulare und physiologische Mechanismen aufzuklären, wurden in der Vergangenheit eine Vielzahl von *in vivo* und *in vitro* Experimenten durchgeführt. Die Anzahl tierexperimenteller Arbeiten wurde bereits Ende des letzten Jahrhunderts auf weit über 100 geschätzt, wobei ca. 2/3 davon eine signifikante Reduktion der Tumorzinzidenz zeigen konnten. (Combs and Gray 1998).

In Zellkulturexperimenten wurde neben der antioxidativen und somit protektiven Rolle der bereits beschriebenen TXNRD und GPX, die z.B. krebsfördernde DNA-Schädigungen verhindern, vor allem die Wirkung verschiedener Selenverbindungen auf krebsrelevante Zellfunktionen wie Apoptose, Proliferation, Migration, usw. untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Selenverbindungen aus denen im Organismus monomethyliertes Selen gebildet wird, besonders antikanzerogen wirken (Ip and Ganther 1990; Ip 1998). Eine dieser Verbindungen ist Se-Methylselenocystein (SeMCYS), das vor allem von Se-anreichernden Pflanzen, wie Knoblauch, Brokkoli und Zwiebeln gebildet wird (Ip, Birringer et al. 2000). SeMCYS kann z.B. in murinen epithelialen Brustkrebszellen durch Aktivierung der Caspase 3 Apoptose vermitteln (Unni, Singh et al. 2001) oder durch Inhibierung der Zyklin-abhängigen Kinase 2 einen Zellzyklusarrest hervorrufen (Kaeck, Lu et al. 1997). Auch konnte nachgewiesen werden, dass methyliertes Se in Endothelzellen die Bildung von Mikrogefäßen, die Angiogenese, hemmt (Wang, Hu et al. 2008). Zudem wurde bereits die direkte Inhibition der MMP (Matrixmetalloproteinase) 2 und von VEGF (*vascular endothelial growth factor* = vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor, Signalmolekül für Gefäßneubildung) gezeigt (Jiang, Ganther et al. 2000).

Für Selenit ist ebenfalls eine p53-abhängige Aktivierung der Caspasen 8 und 9 und somit der Apoptose gezeigt worden (Jiang, Hu et al. 2004). Ebenso inhibiert es in humanen Fibrosarkomzellen die Fähigkeit an die Kollagenmatrix zu binden, hemmt die Expression von MMP 2 und 9 (Yoon, Kim et al. 2001) und nimmt somit auf wichtige Tumoreigenschaften wie die Fähigkeit zur Migration und Invasion Einfluss. Für SeMet konnte z.B. die Aktivierung des Tumorsuppressors p53 nachgewiesen werden (Seo, Kelley et al. 2002).

Genomweite Genexpressionsanalysen in menschlichen und tierischen Zelllinien zeigen ebenfalls, dass die Behandlung mit verschiedenen Selenformen zur Regulation von Genen führt, die vor allem die Zellzykluskontrolle und die Apoptose betreffen (El-Bayoumy and Sinha 2005; Hesketh 2008). Ähnliche Ergebnisse zeigten bereits Mikroarrayanalysen im Kolon von Mäusen, die über 90 Tage mit 1 ppm SeMet im Futter supplementiert wurden (Rao, Puschner et al. 2001).

Die Regulation von Selenoproteingenen in verschiedenen Tumorentitäten zeigt eine oftmals duale Rolle der Selenoproteine. Es wurde bereits darauf eingegangen, dass z.B. verschiedene GPX auf eine mögliche Tumorinitiation hemmend wirken, während ihre Funktion während der Tumorprogression eher fördernd sein kann. Weitaus komplexer wird die Charakterisierung der Funktion einzelner Selenoproteine bei Krebserkrankungen durch die Tatsache, dass für einige von ihnen SNPs (*single nucleotide polymorphisms*)

beschrieben sind, also Variationen einzelner Basenpaare im Gen und somit ggf. einzelner Aminosäuren im Protein.

So gibt es für das GPX1-Gen durch einen Polymorphismus im Kodon 198 eine Leucin (Leu)- und eine Prolin (Pro)-Variante, die offenbar verschieden auf eine Se-Supplementation reagieren und eine unterschiedliche Enzymaktivität zeigen (Hu and Diamond 2003). Einige Studien bringen die Leu-Variante mit einem erhöhten Krebsrisiko in Verbindung (Ratnasinghe, Tangrea et al. 2000; Ichimura, Habuchi et al. 2004; Sutton, Nahon et al. 2006), andere Studien wiederum konnten das nicht bestätigen (Cox, Hankinson et al. 2004; Hansen, Saebo et al. 2005).

Ein weiteres mit Krebserkrankungen assoziiertes Selenoprotein, das hier bisher keine Erwähnung fand, ist das SEP15, das offenbar eine Rolle spielt bei der Proteinfaltung und Qualitätskontrolle im Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Gladyshev, Jeang et al. 1998; Labunskyy, Ferguson et al. 2005; Labunskyy, Hatfield et al. 2007). Neuere Studien zeigen eine tumorfördernde Funktion, da eine *Sep15*-Defizienz in murinen Kolonkarzinomzellen dazu führt, dass das Tumorwachstum und die Fähigkeit zur Metastasierung nahezu vollständig inhibiert wird (Irons, Tsuji et al. 2010). Vom humanen *SEP15* sind ebenfalls SNPs bekannt, die sich vor allem in der Responsivität gegenüber einer Se-Supplementation und der Effizienz der SeCys-Insertion unterscheiden, da diese innerhalb des SECIS-Elements liegen (T/C Kodon 811, A/G Kodon 1125) und diese Eigenschaften durch das SECIS-Element mitbestimmt werden (Kumaraswamy, Malykh et al. 2000; Hu, Korotkov et al. 2001). Für die 1125A-Variante konnte beispielsweise gezeigt werden, dass diese in malignen Mesotheliomazellen die Se-induzierte Apoptose inhibiert (Apostolou, Klein et al. 2004).

Einer 2008 publizierten Studie zufolge sind bezogen auf Darmkrebserkrankungen vor allem SNPs in den Genen für SEPP und TXNRD1 von Bedeutung. Es wurden 772 Patienten, die an einer Screening-Studie für Prostata-, Lungen-, Darm- und Ovarialkrebs teilgenommen haben, bezüglich 44 genetischer Varianten für 6 Selenoproteingene (*GPX1-4*, *TXNRD1* und *SEPP*) mit 777 gesunden Probanden verglichen. Neben einer *TXNRD1*-Variante, die mit niedrigem Krebsrisiko in Verbindung gebracht werden konnte, waren vor allem vier *SEPP*-Varianten interessant, von denen drei signifikant assoziiert waren mit erhöhtem, eine mit verringertem Krebsrisiko. Für keine der getesteten *GPX*-Varianten konnte eine signifikante Assoziation nachgewiesen werden (Peters, Chatterjee et al. 2008).

1.8 Selen und Inflammation

Auch die antiinflammatorischen Eigenschaften des Selens könnten eine wichtige Bedeutung für den chemopräventiven Effekt auf eine mögliche Krebserkrankung haben. Krebserkrankungen sind oftmals assoziiert mit entzündlichen Prozessen, wobei Ursache und Wirkung nicht immer eindeutig feststellbar sind. So gelten z.B. chronisch entzündliche Darmerkrankungen als Risikofaktor für Kolonkarzinome und eine Hepatitis erhöht die Wahrscheinlichkeit, an einem hepatozellulären Karzinom zu erkranken. Umgekehrt können aber auch entstehende Tumore eine Immunantwort auslösen und somit inflammatorische Prozesse initiieren. Etabliert hat sich hier das Konzept der „Tumorüberwachung“ (Dunn, Old et al. 2004), dass einen Erfolg oder Misserfolg in der Bekämpfung durch Immunzellen u.a. davon abhängig macht, wie es zur Tumorentstehung kam (z.B. ob chemisch oder viral ausgelöst) und inwieweit maligne Zellen immunogene Epitope auf ihrer Zelloberfläche tragen, die sich von den körpereigenen Molekülen unterscheiden. Können nicht alle malignen Zellen unmittelbar eliminiert werden, kann es zunächst zu einer Art Gleichgewichtszustand kommen, in dem ein Selektionsdruck auf mutierende Tumorzellen ausgeübt wird. Diese können durch weitere genetische Veränderungen z.B. die Fähigkeit zur Antigenpräsentation (Algarra, Cabrera et al. 2000; Marincola, Jaffee et al. 2000) oder die Responsivität gegenüber IFN γ (stimuliert die Antigenpräsentation) (Kaplan, Shankaran et al. 1998) verlieren.

Durch Immunzellen wie T-Zellen oder Natürliche Killerzellen (NK) kommt es zur Ausschüttung von Zytokinen (z.B. IFN γ , TNF α oder IL1, 6), die nicht nur aktivierend auf andere Immunzellen wirken, sondern auch die Tumorzellen zum Überleben und Proliferieren anregen können (Karin and Greten 2005). Schlüsselmoleküle sind hierbei die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und STAT3, die, selbst angeregt durch proinflammatorische Zytokine, in Immunzellen die Expression von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen steuern, in Krebszellen aber Proliferation (c-Myc), Zellzyklus (Zykline), Angiogenese (VEGF) und antiapoptotische Signalwege kontrollieren (Karin 2006; Yu, Kortylewski et al. 2007; Grivennikov and Karin 2010). Unter der Kontrolle von NF- κ B steht u.a. auch das Enzym COX2 (Cyclooxygenase2), das aus Arachidonsäure entzündungsfördernde Prostaglandine synthetisiert. Einige Studien zeigen inzwischen, dass durch eine Langzeiteinnahme sogenannter NSAIDs (*non steroidal anti-inflammatory drugs*), wie z.B. Aspirin, die COX2-Aktivität gehemmt und dadurch das Risiko, an Krebs zu erkranken, deutlich gesenkt werden kann (Baron and Sandler 2000; Garcia-Rodriguez and Huerta-Alvarez 2001). Auch bei der Behandlung der familiären adenomatösen Polyposis (FAP), einer Erbkrankheit, bei der Betroffene schon in jungen Jahren Adenome im Kolon entwickeln, werden NSAIDs erfolgreich eingesetzt (Waddell, Ganser et al. 1989).

Auch dem Selen werden inzwischen antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben. So wurde bereits gezeigt, dass Selen die NF- κ B-Aktivität inhibieren (Makropoulos, Bruning et al. 1996), die Expression der proinflammatorischen Gene für COX2 und TNF α durch Inhibition des MAP Kinase-Signalweges hemmen (Zamamiri-Davis, Lu et al. 2002; Vunta, Belda et al. 2008) sowie die Synthese von 15d-PGJ2, einem antiinflammatorischen Prostaglandin, durch COX1 stimulieren kann (Vunta, Davis et al. 2007).

1.9 Mausmodelle

1.9.1 *SepP*-KO-Maus

Das Modell der *SepP*-KO-Maus hat entscheidend dazu beigetragen, die Funktion des Selenoprotein P zu verstehen und seine zentrale Bedeutung im Selenstoffwechsel zu unterstreichen (Hill, Zhou et al. 2003; Schomburg, Schweizer et al. 2003). Während heterozygote Mäuse phänotypisch unauffällig bleiben und sich normal entwickeln, zeigen *SepP*-KO Mäuse Entwicklungs-, Wachstums- und Leistungsstörungen. Sie sind kleiner, leichter und weniger beweglich als ihre heterozygoten und wildtypischen Geschwistertiere. Sie zeigen Ataxien und neurologische Störungen, die Männchen sind infertil und bei nicht adäquater Selenversorgung versterben diese Tiere nach wenigen Tagen bis Wochen. Die symptomfreien heterozygoten Tiere zeichnen sich nur durch einen verringerten Selengehalt im Blut und in den Organen, die über SepP mit Selen versorgt werden, wie Gehirn, Niere und Hoden, aus, während sich in der Leber selbst das mit der Nahrung aufgenommene Selen durch die verringerte SepP-Biosynthese anreichert. Auch ist eine daraus resultierende verminderte Expression von Se-abhängigen Enzymen wie GPx und TxnRd in den entsprechenden Organen zu beobachten (Schomburg, Schweizer et al. 2003).

1.9.2 *Apc*^{Min/+}-Maus

Das etablierte Tumormodell der *Apc*^{Min/+}-Maus (APC = Adenomatöse Polyposis Coli; Min = Multiple intestinale Neoplasien) ist das Tiermodell für die humane autosomal-dominante Erkrankung FAP (Familiäre Adenomatöse Polyposis) (Fodde and Smits 2001), die beim Menschen bereits ab dem zweiten Lebensjahr zur Adenombildung bevorzugt im Kolon führen kann, die dann im weiteren Verlauf maligne entarten können. Diese Erbkrankheit, bei der bereits ein Allel des Tumorsuppressors APC inaktiviert ist, ist zwar relativ selten, dennoch ist die *Apc*^{Min/+}-Maus auch als allgemeines Darmkrebsmodell anerkannt, da ca. 80% aller Darmerkrankungen auf Mutationen im APC-Gen beruhen (Powell, Zilz et al. 1992; Jen, Powell et al. 1994).

Der Tumorsuppressor APC ist Teil eines Multiproteinkomplexes, der im Zusammenspiel mit Axin, Glykogen Synthase Kinase (GSK) 3 β und Casein Kinase 1 α verantwortlich ist für die Ubiquitynylierung des laufend in der Zelle gebildeten β -Catenins und somit für dessen Abbau durch das Proteasom. Als Bestandteil des vor allem in der Entwicklungsbiologie gut charakterisierten Wnt-Signalweges, kommt es bei Wnt/Frizzled-Signalkaskaden bzw. bei Störungen im β -Catenin-Abbau zur β -Catenin-Akkumulation im Zytosol, zu einer Migration in den Zellkern und zur Aktivierung von β -Catenin-abhängigen Transkriptionsfaktoren der TCF/Lef-Familie (*T-cell factor/Lymphoid enhancer factor*) und damit zur Aktivierung von Zielgenen, die vor allem die Zellproliferation beeinflussen (Logan and Nusse 2004; Clevers 2006).

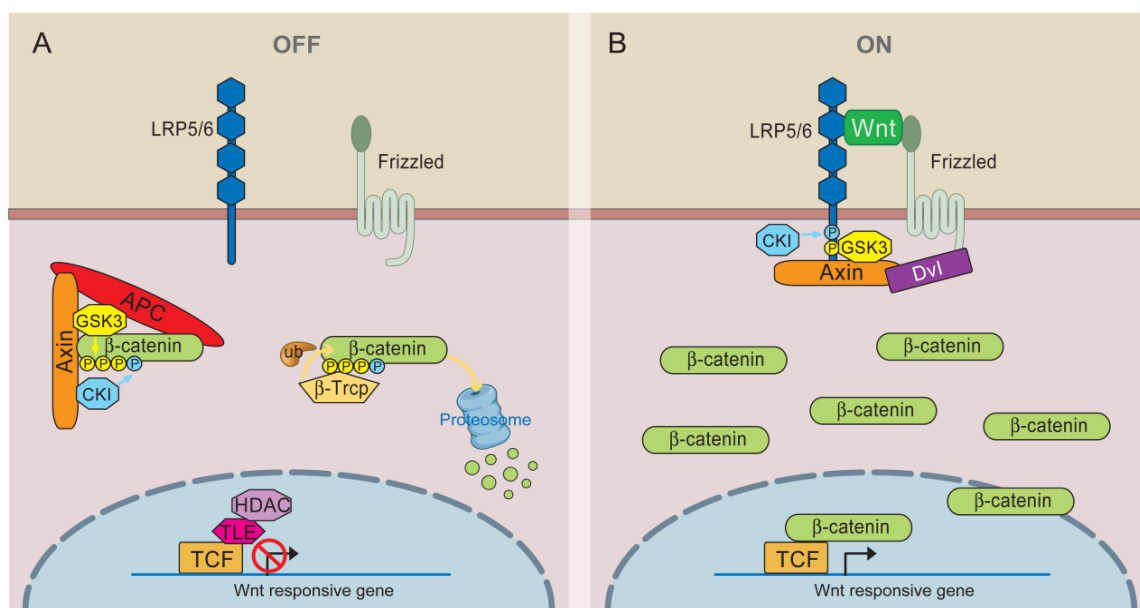


Abb. 1.8: Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg. Bei Abwesenheit eines Wnt-Signalmoleküls wird das fortlaufend in der Zelle gebildete β -Catenin im Multiproteinkomplex aus APC (*Adenomatous polyposis coli*), Axin, GSK (Glykogen Synthase Kinase) 3 β und CK (Casein Kinase) 1 α gebunden, phosphoryliert und anschließend durch β -TRCP (*Transducing repeat containing protein*) ubiquitynyliert, was eine Markierung zum Abbau im Proteasom darstellt. Der Transkriptionsfaktor TCF (*T-cell factor*) wird durch TLE/Groucho und HDAC (Histondeacetylase) an der Expression von Zielgenen gehindert. Bei der Bindung von Wnt an seine Rezeptoren Frizzled und LRP (*low density lipoprotein receptor related protein*) 5/6 kommt es zur Bindung des Adaptermoleküls Dvl (*dishevelled*) und zur Phosphorylierung des Rezeptors durch GSK 3 β und CK 1 α . Dadurch wird Axin rekrutiert und der Degradationskomplex zerfällt. β -Catenin akkumuliert im Zytosol und wandert in den Kern, wo es die Transkription durch TCF aktiviert (aus (MacDonald, Tamai et al. 2009)).

In der Maus wurde chemisch eine *nonsense*-Mutation in einem der beiden *Apc*-Allele induziert, die stabil auf die Nachkommen weitergegeben wird. Kommt es nun im Verlauf der Entwicklung auch zur Mutation im anderen Allel, kann dies zur Ausbildung von Adenomen führen. Dieser Mausstamm ist also einem erhöhten Krebsrisiko ausgesetzt. Man kann davon ausgehen, dass *Apc*^{Min/+}-Mäuse nach ca. 100-120 Tagen ca. 100 Adenome im Dünndarm entwickeln.

Darmkrebs ist die zweithäufigste Krebserkrankung nach Brustkrebs bei Frauen bzw. Prostatakrebs bei Männern, zusammengenommen sogar die häufigste Krebserkrankung in Deutschland, an der immer noch ein Großteil der Patienten verstirbt (Krebsregisterdaten des Robert Koch-Instituts für 2006). Die $Apc^{Min/+}$ -Maus stellt ein ausgezeichnetes Modell dar, um chemopräventive Effekte einer Se-Supplementation über das Futter auf das Krebsrisiko zu untersuchen (Lamprecht and Lipkin 2003), zumal Darmkrebs, wie oben aufgeführt, auch im Menschen als eine der Krebsarten beschrieben ist, auf die eine gute Selenversorgung chemopräventiv wirken kann.

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Mit dieser Arbeit sollte zunächst der Einfluss des Se-Speicher- und Transportproteins SepP und der Se-Versorgung im Hinblick auf die intestinale Tumorigenese im $Apc^{Min/+}$ -Mausmodell herausgearbeitet werden.

SNPs im humanen *SEPP* können eine unterschiedlich starke Expression des Proteins (Al-Taie, Seufert et al. 2002) und eine unterschiedliche individuelle Se-Verwertung hervorrufen (Meplan, Crosley et al. 2007). Die Assoziation von *SEPP*-Varianten mit einem signifikant erhöhten Darmkrebsrisiko (Peters, Chatterjee et al. 2008) legt die Bedeutung dieser unterschiedlichen individuellen genetischen Prädisposition nahe. Das Mausmodell der heterozygoten *SepP*-Maus soll eine Situation imitieren, in der die Tiere zwar gesund sind, dennoch im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine genetisch bedingte leicht verringerte Selenversorgung der Organe aufweisen, wie das bei humanen SNPs der Fall sein dürfte. Verkreuzt mit dem $Apc^{Min/+}$ -Mausmodell, das genetisch bedingt ein erhöhtes Risiko für Neoplasien im Darm in sich trägt, lässt sich also der Einfluss des *SepP*-Genotyps auf das Krebsrisiko untersuchen. In seiner Dissertation „Einfluss von Selenoprotein P auf die intestinale Tumorigenese im Mausmodell“ konnte Marten Michaelis 2008 in unserer Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass $SepP^{+/-} Apc^{Min/+}$ -Tieren im Vergleich zu wildtypischen $Apc^{Min/+}$ -Tieren zu einer erhöhten Tumorigenese neigen. Allerdings erfolgten diese Versuche ohne Kontrolle des Se-Status der Tiere, so dass keine Aussagen über den Zusammenhang von Se-Status, *SepP*-Genotyp und Krebsrisiko getroffen werden konnten.

Aus diesen Gründen war das Hauptziel dieser Arbeit, die Bedeutung der Selenversorgung für die intestinale Tumorigenese vor dem Hintergrund unterschiedlich starker *SepP*-Expression heraus zu arbeiten. Zu diesem Thema gibt es bereits eine Studie, in der die chemopräventive Wirkung von Selen in Form von Se-angereichertem Brokkoli im $Apc^{Min/+}$ -Mausmodell beschrieben wird (Davis, Zeng et al. 2002). Allerdings ist es schwer, anhand dieser Studie den Effekt der Selenversorgung im Vergleich zu anderen chemopräventiven

Brokkolibestandteilen heraus zu stellen. Überdies sollte der Schwerpunkt dieser Dissertation auf der Korrelation zwischen Selenversorgung und *SepP*-Genotyp liegen, um zu sehen, inwieweit sich die unterschiedlich starke *SepP*-Expression bei verschiedenen Selenkonzentrationen auf die Tumorigenese auswirkt. Ließe sich durch eine Se-Supplementation die *SepP*-Expression steigern (Xia, Hill et al. 2005) und das Darmkrebsrisiko verhindern, so wäre dies nicht nur im Hinblick auf die genetisch bedingten individuellen Faktoren, sondern auch auf die eher marginale Selenversorgung in Europa interessant, und könnte wichtige Informationen zur Chemoprävention beitragen.

Aufgrund der erniedrigten Se-, GPx- und TxnRd-Konzentrationen könnten inflammatorische Prozesse, die mit der Krebserkrankung einhergehen, begünstigt werden. In humanen Studien (Angstwurm, Engelmann et al. 2007; Hollenbach, Morgenthaler et al. 2008; Forceville, Mostert et al. 2009) und tierexperimentellen Arbeiten (Renko, Hofmann et al. 2009) wurde bereits eine negative Regulation der SEPP-Synthese durch Inflammation gezeigt. Daher sollte im weiteren Verlauf der Arbeit in einem Therapieansatz überprüft werden, wie sich die Hemmung der intestinalen Inflammation durch den in der Literatur bereits als wirksam beschriebenen COX2-Hemmer Sulindac (Boolbol, Dannenberg et al. 1996; Chiu, McEntee et al. 1997) auf das Krebsrisiko und die Se- und Genotyp-Effekte auswirkt. Die Hypothese dieses Forschungsansatzes geht davon aus, dass eine verbesserte Selenversorgung in Kombination mit einer COX2-Hemmung eine optimale Verringerung des Krebsrisikos bewirken könnte.

Somit sollte der Einfluss von insgesamt drei Risikofaktoren für die intestinale Tumorigenese betrachtet werden, nämlich (i) die genetische Prädisposition durch unterschiedlich gute *SepP*-Expression und die damit einhergehende unterschiedlich gut erfolgende Se-Versorgung der Organe, (ii) die Se-Versorgung über die Nahrung durch kontrolliert supplementierte Nagerdiäten und (iii) die adjunktive Unterdrückung inflammatorischer Prozesse durch Sulindac-vermittelte Cox2-Hemmung. Eine systematische Analyse histologischer, molekularbiologischer und nutritiver Biomarker sollte bei diesen Studien erfolgen, um mögliche molekulare Wirkmechanismen aufzuklären.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die benötigten Chemikalien in den höchsten Reinheitsgraden von folgenden Firmen bezogen: ABgene Thermofischer (Epsom, UK), Bio-Rad (München), Boehringer (Mannheim), Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostik (Mannheim), Serva Feinbiochemika (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), VWR International (Hannover).

2.1.2 Puffer und Lösungen

Soweit nicht gesondert aufgeführt, wurden Puffer und Lösungen nach dem Handbuch „Molecular Cloning“ (Sambrook und Russel 2001) hergestellt. Für das Ansetzen wurde Reinstwasser (H₂O bidest.) verwendet, das mit der Anlage „EASYpure UV™“ der Firma Barnstead International (Dubuque, Iowa, USA) aufbereitet wurde.

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien für den Laborbedarf wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen A. Hartenstein (Würzburg), B. Braun Biotech International (Melsungen), Becton Dickinson (Heidelberg), Merck Biosciences (Schwalbach), Carl Roth (Karlsruhe), Eppendorf (Hamburg), peqLab Biotechnologie (Erlangen), Sarstedt (Nümbrecht), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und VWR International (Hannover) bezogen.

2.1.4 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Tab. 2.1: Verwendete Reaktionssysteme

peqGold RNA-Pure™	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
iScript™ cDNA-Synthese Kit	Bio-Rad Laboratories, München
ABsolute™ QPCR SYBR® Green	ABgene, Epsom, UK
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Lincoplex Cytokine Immunoassay Kit	Millipore, Billerica, MA, USA
Vectastain® ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

2.1.5 Geräte

Tab. 2.2: Verwendete Geräte

Analysenwaage CP 423S	Sartorius, Göttingen
Autoklav Varioklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Binokular (Stereomikroskop SZ2)	Olympus, Hamburg
Elektrophoresekammer (horizontal)	Roth, Karlsruhe
Geldokumentationssystem	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Luminex 200	Millipore, Billerica, MA, USA
Magnetrührer M 32	GLW, Würzburg
Microdismembrator Modell U	B. Braun Biotech, Melsungen
Mikrowellenofen Micro	Whirlpool, Schorndorf
Mikroskop Axioskop 2	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Wilovert 30 Standard	Hund, Wetzlar
Netzgeräte EPS 601	Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA
PCR-Cycler Primus 25 und 96plus	MWG Biotech, Ebersberg
pH-Meter inoLab Benchtop	WTW, Weilheim
Photometer NanoDrop 1000	Thermo Scientific, Waltham USA
Pipetten 0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand, Wertheim
Plattenschüttler DELFIA Plateshake	PerkinElmer GmbH, Rodgau – Jügesheim
Präparierbesteck	FST GmbH, Heidelberg
qPCR-Cycler iCycler	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Reinstwasser-Anlage EASYpure UV™	Barnstead Int., Dubuque, Iowa, USA
Rotationsmikrotom RM 2125 RT	Leica Microsystems, Nussloch
Spectrophotometer U-2001	Hitachi, Deutschland
Schüttler Histologie	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
S2-Picofox	Bruker Nano GmbH, Berlin
Tischphotometer	Eppendorf, Hamburg
Tissuelyser	Qiagen, Hilden
Trockenschrank ST 6200	Heraeus Holding, Hanau
Tiefkühlschrank HFU 486	Heraeus Sepatech, Osterode
Vortex	Eppendorf, Hamburg
Waagen CP 2201, CP 323S, Ultramicro 4504 MP8	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg

2.1.6 Software

Tab. 2.3: Verwendete Software

AxioVision Rel. 4.7.	Carl Zeiss Microimaging, Göttingen
Bio-Rad iCycler iQ 3.0	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
EndNote X4	Thomson Reuters, New York, USA
GraphPad Prism 4	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
Luminex-Software	Millipore, Billerica, MA, USA
Microsoft Office 2007	Microsoft Deutschland, Unterschleißheim
Picofox-Software	Bruker Nano GmbH, Berlin
Primer 3 Version 4.0	http://frodo.wi.mit.edu
REST Version 1.9.12	http://rest.gene-quantification.info
Sigma Plot 10	Systat Software Inc., San Jose, CA, USA
SPSS 19	IBM Deutschland GmbH, Ehningen

2.1.7 Datenbanken

Tab. 2.4: Verwendete Datenbanken

BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
BLAT Search	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat
Electronic-PCR	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/e-pcr/
Mouse Genome Informatics	http://www.informatics.jax.org/
National Center for Biotechnology	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed

2.2 Methoden

2.2.1 Tierexperimentelles Arbeiten

2.2.1.1 Verwendete Mauslinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Tiere hatten einen C57Bl/6-Hintergrund. *Apc*^{Min/+}-Tiere wurden ehemals bezogen von The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA und in die hauseigene *SepP*-Zucht eingekreuzt.

2.2.1.2 Maushaltung und –zucht

Die Mauszucht erfolgte unter Einhaltung der deutschen und europäischen Richtlinien für Versuchstiere zunächst im hauseigenen Tierstall des Instituts für Experimentelle Endokrinologie (Aschheim Zondek-Haus am Campus Charité Mitte), nach dem Umzug des Instituts im März 2008 in der Tierhaltung des Forschungshauses am Campus Virchow

Klinikum. Die Mäuse wurden im zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus auf Standard-Nager-Diät gehalten (Haltungsfutter 1326, Zuchtfutter 1314, Altromin, Lage). Das Futter für die Versuchstiere wurde in Kooperation mit dem Deutschen Institut für Ernährungsforschung (DIfE) in Potsdam-Rehbrücke selbst gemischt, supplementiert und in Pellets gepresst. Dafür wurden einem Se-defizienten Basisfutter (Altromin C1045, 0,08 ppm Se) verschiedene Konzentrationen (0,15 bzw. 0,6 ppm) gelöstes Na-Selenit, Sigma, und Wasser zugemischt und dieses pelletiert.

Die Versuchsgruppen (Genehmigungsnummer LAGeSo (Landesamt für Gesundheit und Soziales) Berlin G 171/06) wurden derart gezüchtet, dass das defekte *Min*-Allel aufgrund der geringen Lebenserwartung der Tiere vorzugsweise vom Vater übertragen wurde, während für *SepP* Mutter oder Vater heterozygot sein durften (σ : *SepP*^{+/+} *Apc*^{Min/+} x ♀ : *SepP*^{+/-} oder σ : *SepP*^{+/-} *Apc*^{Min/+} x ♀ : *SepP*^{+/+}).

2.2.1.3 Präparation der Versuchstiere und Tumoranalyse

Im Alter von 120 Tagen wurden die Versuchstiere durch CO₂-Begasung getötet. Es wurde zunächst der Brustkorb geöffnet, die Lebervene durchtrennt und das in den Brustraum fließende Blut entnommen. Die zur Analyse vorgesehenen Organe wurden entnommen, in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in N₂^{flüssig} schockgefroren und bei -80°C gelagert. Das Blut wurde nach ca. einstündiger Inkubation auf Eis zentrifugiert (10000 g, 10 min, 4°C), das Serum abpipettiert und ebenfalls bis zur weiteren Analyse bei -80°C eingefroren.

Der Gastrointestinaltrakt wurde entnommen, auf Whatman®-Papier in drei gleich lange Dünndarmabschnitte und den Dickdarm aufgeteilt. Die Abschnitte wurden longitudinal aufgeschnitten und mit einem weichen Pinsel und PBS vom Darminhalt befreit. Nach dem Fixieren (1-2 Tage, 4°C) wurden die Därme in Färbelösung 2-3 min gefärbt und bis zu einem guten Kontrast in PBS wieder entfärbt.

10 x PBS: 137 mM NaCl, 4,3 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 2,7 mM KCl,
 1,4 mM KH₂PO₄, pH 7,4 einstellen mit HCl
 Fixierungslösung: 4% (v/v) Formaldehyd in 1 x PBS
 Färbelösung: 0,01% (w/v) Methylenblau in 1 x PBS

2.2.1.4 Bestimmung von Tumoranzahl und -größe

Das Auszählen der Tumore in den einzelnen Darmabschnitten wurde unter einem Binokular und mit Hilfe einer selbst angefertigten Schablone vorgenommen, mit der sich die Tumore nach Durchmesser (0,5-3 mm) unterteilen ließen. Es wurden stets die Mittelwerte der Tumoranzahlen und Tumorgößen aus zwei Zählungen gebildet.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Genotypisierung

2.2.3.1.1 Isolation genomischer DNA

Für die Genotypisierung der Tiere wurde die genomische DNA aus den Ohrstanzen verwendet, die beim Markieren der Tiere anfielen. Dazu wurden diese in PCR-Tubes mit 50 µl ALK-Puffer versetzt und für ca. 2 h bei 95°C im Thermocycler inkubiert. Das Lysat wurde danach mehrfach resuspendiert, mit 50 µl NEUT-Puffer versetzt, gevortext und konnte dann direkt in der PCR eingesetzt werden.

ALK-Puffer (Alkalische Lyse-Puffer): 25 ml H₂O bidest., 62,5 µl 10 M NaOH,
10 µl 0,5 M EDTA, pH 12

NEUT-Puffer (Neutralisations-Puffer): 24 ml H₂O bidest., 1 ml 1 M Tris-HCl,
45 µl 37% HCl

2.2.3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Genotypisierung der *SepP*- und *Apc*^{Min/+}-Genotypen wurden die in Tabelle 2.5 angegebenen Primer verwendet. Die aus den Ohrstanzen isolierte DNA wurde nach folgendem im Labor etablierten Protokoll in der PCR eingesetzt.

Reaktionsansatz

H ₂ O	18,25 µl
10 x PCR-Puffer ^a	2,5 µl
MgCl [25 mM]	1 µl
dNTPs [10 mM] ^b	0,5 µl
Primer 1,2,3 [10 µM]	je 1 µl
Taq-Polymerase ^a [5U/µl]	0,2 µl
cDNA [ca.50 ng/µl]	1 µl

Gesamt 26,45 µl

^a Genecraft (Lüdinghausen); ^b Amersham (Freiburg)

PCR-Programm

Initiale Denaturierung 94°C 15 min

45 Zyklen

Denaturierung 94°C 15 sec

Primer-Annealing 53°C 15 sec

Elongation 72°C 15 sec

Finale Elongation 72°C 3 min

2.2.3.1.3 Agarosegelelektrophorese

5 µl aus der PCR-Reaktion wurden mit 1 µl DNA-Probenpuffer versetzt und in einem 2%-igen Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel mit SB-Puffer, bei 220 V für ca. 30 min elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend unter UV-Licht fotografiert und mit Hilfe eines mitgeführten Größenstandards (1 kb DNA Ladder Generuler™ Plus, Fermentas, Kanada) ausgewertet.

SB-Puffer (20 x): 36,5 mM Borsäure, 10 mM NaOH in H₂O bidest.,
pH 8,5 einstellen mit H₃BO₃

DNA-Probenpuffer (6 x): 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 30% (w/v) Glycerin
in H₂O bidest.

2.2.3.1.4 Genotypisierungsprimer

Die Primer für die *SepP*-Genotypisierung beruhen auf einem im Labor bereits etablierten Protokoll (Schomburg, Schweizer et al. 2003), für die *Apc*^{Min/+}-Genotypisierung wurde den Empfehlungen von The Jackson Laboratory gefolgt.

Tab. 2.5: Verwendete Primer für die Genotypisierung

Gen	Sequenz	Fragmentgröße
<i>SepP</i> vorn	ataggacaacctcagcaatgtg	
R- <i>SepP</i> vorn_p200	caagtatcagctggcttgaaga	wt = 200 bp
R- <i>lacZ</i> vorn_p262	cgggcctcttcgctattac	het = 262 bp
F- <i>mApc</i> jax	gccatcccttcacgtag	
F- <i>mApc</i> 2jax	ttctgagaaagacagaagtta	wt = 600 bp
R- <i>mApc</i> jax	ttccacttggcataaggc	Min/+ = 1000 / 600 / 340 bp

2.2.3.2 Genexpressionsanalysen

2.2.3.2.1 RNA-Isolation aus Tumoren

Für die Isolierung von RNA aus Tumoren durften die Därme vorher nicht fixiert und gefärbt werden. Nach der Entnahme wurden die Darmabschnitte auf Whatman®-Papier direkt mit RNAlater gesäubert und in RNAlater bei 4°C maximal zwei Wochen gelagert. Unter dem Binokular wurden gut sichtbare Tumore (>2 mm) sowie ähnlich große Normalgewebestücke mit Skalpell und Pinzette abpräpariert und bei -20°C eingefroren.

Die Isolation der RNA erfolgte nach der Guanidinisothiocyanat (GTC)-Methode (Chomczynski and Sacchi 1987) mit peqGold RNA-Pure™, Peqlab Biotechnologie, Erlangen, nach Herstellerangaben. Eine Spatelspitze des in RNAlater eingelegten Gewebes wurde in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße mit 1 ml peqGold RNA-Pure™ versetzt, eine Keramik-Kugel hinzugegeben und im Tissue-Lyser, Qiagen, für 5 min geschüttelt, wobei das Gewebe nahezu vollständig zerstört wurde. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde abermals für 15 sec geschüttelt und für 10 min bei RT inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (14000 g, 5 min, 4°C) wurde die obere wässrige Phase entnommen. Die Zugabe von 500 µl Isopropanol und Inkubation für 15 min auf Eis führte zum Ausfällen der RNA. Nach erneuter Zentrifugation (14000 g, 5 min, 4°C) wurde das Pellet mit 75%-igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in DEPC-H₂O gelöst (55°C, 5-10 min im Thermoblock). Die RNA-Konzentration konnte anschließend photometrisch im NanoDrop 1000 bei 260 nm bestimmt werden, die Reinheit der RNA zeigte hierbei das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm, das zwischen 1,6 und 2 liegen sollte.

RNAlater: 6,1 M (NH₄)₂SO₄, 10 mM EDTA, 25 mM Na₃-Citrat (1M), pH 5,2 mit H₂SO₄
 DEPC-H₂O: 0,1% (w/v) DEPC in H₂O bidest., 24 h offen unter dem Abzug inkubieren, dann autoklavieren

2.2.3.2.2 RNA-Isolation aus eingefrorenem Gewebe

Die gefrorenen Organe wurden mit einem Mikrodismembrator in gefrorenem Zustand gepulvert und wieder bei -80°C gelagert. Dazu wurden sie auf Trockeneis vorgekühlt, mit einem Hammer grob zerkleinert und in gekühlten Teflongefäßen zusammen mit einer Wolframkarbidkugel so lange geschüttelt, bis die Gewebestücke pulverisiert waren.

Zur RNA-Isolation wurde eine Spatelspitze dieses Gewebepulvers und eine Keramik-Kugel in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Diese Arbeiten erfolgten auf Trockeneis mit vorgekühlten Materialien, um ein schnelles Auftauen des Gewebepulvers zu verhindern. Nach Zugabe von 1 ml peqGold RNA-Pure™ erfolgte die RNA-Isolierung wie in 2.2.3.2.1 beschrieben.

2.2.3.2.3 RNA-Aufreinigung mittels RNEasy®-Säulchen

Die RNA aus Tumorgewebe, die später für die Genchip-Analyse verwendet werden sollte, wurde nach der Isolation mit peqGold RNA-Pure™ zusätzlich über RNEasy®-Säulchen, Qiagen, aufgereinigt. Dabei wurde streng nach Herstellerprotokoll „RNA-Cleanup“ vorgegangen. Die RNA wurde anschließend in 30 µl DEPC-H₂O aufgenommen und die Konzentration im NanoDrop 1000 bestimmt.

2.2.3.2.4 Genchip-Analyse

Für vergleichende Genexpressionsanalysen werden Microarrays verwendet, die auch als Genchips bezeichnet werden. Mit diesen Genchips ist es möglich, das gesamte mRNA-Profil einer RNA-Präparation, z.B. aus Tumorgewebe, zu analysieren und zu vergleichen, ob bestimmte Gene zwischen den zu untersuchenden Gruppen unterschiedlich reguliert sind. Die Affymetrix GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Arrays, die für diese Arbeit verwendet wurden, repräsentieren ca. 39000 Mausgene bzw. Transkripte, deren Sequenzen aus den Datenbanken dbEST, GenBank® und RefSeq ausgewählt wurden.

Die RNA-Isolation aus dem Tumorgewebe erfolgte wie oben beschrieben. Dabei wurde für einen Ansatz ein Pool von ca. 8-10 Tumoren aus einer Maus verwendet. Nach erfolgter RNA-Isolation und zusätzlicher Aufreinigung über RNEasy®-Säulchen wurde auch die RNA gepoolt. Die reverse Transkription, die Biotin-Markierung der RNA sowie die Hybridisierung der Genchips wurde von Frau Dr. Ungethüm im Labor für Funktionelle Genomforschung (LFGF) der Charité Berlin durchgeführt. Die Auswertung der Hybridisierungsereignisse mit dem Programm GCOS 1.4 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) wurde freundlicherweise von Dr. Kuban (LFGF) vorgenommen. Ein Vergleich der um mindestens das 1,5-fache regulierten Gene zwischen den einzelnen Gruppen konnte anschließend in MS-Excel durchgeführt werden.

2.2.3.2.5 cDNA-Synthese

Die reverse Transkription von RNA in cDNA wurde mit dem iScript™-System, Bio-Rad Laboratories, München, nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurde 1 µg RNA (mit DEPC-H₂O vorverdünnt auf 15 µl) mit 4 µl 5 x Reaktionspuffer (enthält Random-Hexamer- und Oligo-dT-Primer) und 1 µl Reverser Transkriptase vermischt (Gesamtansatz 20 µl) und im Thermocycler inkubiert. Danach wurde die cDNA verdünnt (20 µl cDNA + 180 µl H₂O) und bei -20°C gelagert.

Reaktionsansatz

1 µg RNA in DEPC-H ₂ O	15 µl
5 x Reaktionspuffer	4 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
Gesamt	20 µl

cDNA-Programm

5 min	25°C
30 min	42°C
5 min	85°C

2.2.3.2.6 Real Time-PCR

Mit der Real Time-PCR lassen sich cDNA-Mengen quantitativ vergleichen, was Aussagen über die Regulation bestimmter Gene unter verschiedenen Bedingungen erlaubt. Dabei werden einzelne Gene mit spezifischen Primern amplifiziert. Durch Zugabe eines in DNA-Doppelstränge interkalierenden Farbstoffes (SYBR-Green I) kann durch Fluoreszenzdetektion kontinuierlich die Kinetik der Amplifikationsreaktion gemessen werden. Die PCR wurde mit dem ABsolute™ QPCR SYBR® Green-Mastermix der Firma ABgene im 96-well-Format nach einem vorher festgelegten Plattenlayout nach folgendem Schema angesetzt und im Bio-Rad iCycler gemessen.

Reaktionsansatz

SYBR-Green-Mastermix	12,5 µl
H ₂ O	7 µl
Primer 1 [10 µM]	0,25 µl
Primer 2 [10 µM]	0,25 µl
cDNA	5 µl
Gesamt	25 µl

qPCR-Programm

Initiale Denaturierung 95°C 15 min

45 Zyklen

Denaturierung 95°C 15 sec

Primer-Annealing 58°C 30 sec

Elongation 72°C 30 sec

Finale Elongation 72°C 3 min

Die durch die Bio-Rad Software ermittelten Daten (Ct-Werte (*cycle of threshold*)) wurden mit Hilfe der Analysesoftware „REST“ (*Relative Expression Software Tool*, Version 1.9.12) (Pfaffl, Horgan et al. 2002) statistisch ausgewertet, dabei wurde auf den *housekeeper* β -*Aktin* normalisiert. Die PCR-Effizienz wurde durch drei verschiedene Verdünnungsstufen einer cDNA-Probe ermittelt.

2.2.3.2.7 Real Time-Primer

Die für die Real Time-PCR verwendeten Primer wurden mit Hilfe der Software Primer3 Version 4.0 erstellt und von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Die zugrunde liegenden cDNA-Sequenzen wurden anhand der Mouse Genome Informatics Datenbank ermittelt. Mögliche Intron-Exon-Übergänge wurden mittels BLAT Search bestimmt, da Intron-überspannende Primer angefertigt wurden, um Detektion genomischer DNA zu vermeiden. Als Spezifikationen wurden eine optimale Fragmentlänge von 100-300 bp, eine optimale Annealingtemperatur von 58°C und eine optimale Primerlänge von 22 bp vorgegeben. Die Primer wurden anschließend mittels e-PCR und BLAST überprüft.

Tab. 2.6: Verwendete Primer für die Real Time-PCR

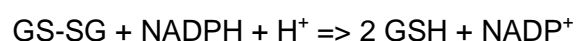
Gen	Primer_fw	Primer_rev	Fragmentgröße
<i>β-Catenin</i>	agctggcctggttgatactgac	ctaaaaccattcccaccctaccaa	130 bp
<i>Tcf</i>	aaaaacatcaagaatccaccac	acagaagatacagggtgagtc	152 bp
<i>c-Myc</i>	aatcctgtacctcgtccgattcc	tcttgctcttctcagagtcgct	150 bp
<i>Sepp</i>	gtgaagaagccattaagatcg	attctctgaaggcttactgctg	204 bp
<i>Gpx2</i>	cttacctgccaagtcggttctac	gatctcctcgttctgacagttc	242 bp
<i>Gpx1</i>	cgatctcagtgccgttgcc	cagttctcctgatgtccgaactggt	204 bp
<i>SelH</i>	ggtcattgagcattgtacgag	tctcaattcttcaaccacctc	248 bp
<i>SelM</i>	atgacagtgaatgcctaag	gagtgaggattcgctctagttc	151 bp
<i>Dio1</i>	ccagtacttctggtttgtcctg	gaggcaaagtcattctacgagtc	231 bp
<i>Fabp1</i>	aattgcagagccaggagaac	gcttgacgactgccttgac	231 bp
<i>Sep15</i>	atggtcgcctaactaacactc	cagacgccgctgaaacg	227 bp
<i>SelS</i>	ctaatgcccaagtgaaaaac	ttggggatgacagatgaagtag	176 bp
<i>SelW</i>	cagctcaaggagaagctagaac	ggaacttgctctctgtatccac	160 bp
<i>TxnRd1</i>	caaattgacaagaaagtgctg	agtcattgcttctctgtcttc	197 bp
<i>TxnRd2</i>	gcaaattgcatctttggtcac	cttctccagattcaaagtctg	214 bp
<i>Lrp2</i>	gaaggagaggatgagaacaatg	atatctggcagtcacgaaatc	184 bp
<i>Lrp8</i>	acaaccagtgtagaggaaaac	ttcaagacttaatgccactcg	290 bp
<i>Tnfa</i>	cgtggaactggcagaagag	ggctacaggctgtcactc	253 bp
<i>Il6</i>	gaaatcgtgaaatgagaaaag	gactctggctttgtcttcttg	243 bp
<i>Cox2</i>	gccagccttcacccatcag	gaccaggcaccagaccaaagac	186 bp
<i>Mcpt1</i>	atacatgggagactctgggggacc	ggcttgagaaatctgtctcaggct	190 bp
<i>Mcpt2</i>	gagattattggtggttgagg	ctccaaggatgacactgatttc	172 bp
<i>Cpa3</i>	tgtttcaaggattaaaattgg	tacattgaatacaggcagaacg	245 bp
<i>c-Kit</i>	atcacatcaaaaacgtgaag	taaggaggtgactgtttcagg	163 bp

2.2.4 Bestimmung der Glutathion-Peroxidase-Aktivität

Glutathion-Peroxidasen (GPX) reduzieren Peroxide (R-OOH) Glutathion (GSH)-abhängig zu ihren Alkoholen und oxidiertem Glutathion (GS-SG):



Das oxidierte Glutathion kann nun von der Glutathion-Reduktase (GR) unter NADPH-Verbrauch wieder zu GSH reduziert werden:



Um die GPX-Aktivität in einem Gewebehomogenat oder im Serum zu messen, kann dieses System *in vitro* nachgestellt werden. Werden dabei alle Reaktionspartner im Überschuss zur Verfügung gestellt, ist allein die in der Probe enthaltene Glutathion-Peroxidase limitierend und somit der Verbrauch von NADPH, der spektralphotometrisch bestimmt werden kann, proportional zur GPX-Aktivität in der Probe. In Küvetten wurden zweimal 500 µl Reaktionsmix (zur Bestimmung der GPX-Aktivität im Duplikat) und einmal 400 µl Reaktionsmix + 100 µl Mercapto-Succinat-Lösung (100 nM) (gehemmte Reaktion zur Messung der GPX-unabhängigen NADPH-Hydrolyse) vorgelegt. Anschließend wurde das Gesamtvolumen mit H₂O bidest. auf 1 ml aufgefüllt und die Probe hinzugegeben (ca. 2 µl Mausserum). Die Reaktion wurde mit 10 µl 0,07% tertiär-Butylhydroperoxid gestartet und im Photometer bei 340 nm gemessen. Dabei wurden innerhalb von drei Minuten sieben Messpunkte erfasst, die lineare Extinktionsabnahme sollte dabei nicht größer sein als 10%. Die GPX-Aktivität errechnet sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten für NADPH wie folgt (der Abzug der Aktivität der gehemmten Probe ist in dieser Formel nicht berücksichtigt):

$$\frac{\text{GPX-Aktivität}}{[\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}]} = \frac{\Delta E_{340}/\text{min} \times V_{\text{Ansatz}}[\text{l}]}{\epsilon_{340}[\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}] \times d[\text{cm}] \times m_{\text{Protein}}[\text{mg}]}$$

ΔE_{340}	Extinktionsänderung bei 340 nm [min^{-1}]
ϵ_{340}	molarer Extinktionskoeffizient für NADPH+H ⁺ ($\epsilon_{340 \text{ nm}}=6200 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)
V_{Ansatz}	Gesamtansatzvolumen (1 ml)
m_{Protein}	Protein pro Ansatz [mg]
d	Küvettdurchmesser (1 cm)
Reaktionsmix	0,2 M Tris, 1 mM EDTA, 0,33 mg/ml NADPH, 1,42 mg/ml GSH, 2 U/ml GR, pH 8,0

2.2.5 Messung von Zytokinen aus Mausserum

Die Messung von Zytokinen aus Mausserum erfolgte mit der Sandwich-ELISA-basierten Multiplex/Lincoplex-Methode mit der aus einer Probe bis zu 30 Zytokine gleichzeitig bestimmt werden können. Dabei wird ein Antigen von zwei Arten immobilisierter Antikörper detektiert, einerseits von biotinylierten und andererseits von mit Polymerkügelchen gekoppelten. Diese haben unterschiedliche Farbkodierungen je nach Antikörperspezies.

Der Immuno-Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden 50 µl Mausserum zunächst mit einem Gemisch der Kügelchen-gekoppelten Antikörper ü.N. in

einer Mikrotiterplatte inkubiert. Nach Absaugen und Waschen wurden anschließend entsprechende biotinylierte Detektionsantikörper hinzugegeben. Nach einer nun folgenden Inkubation mit Streptavidin-Phycoerythrin-Komplex und weiteren Waschschrritten erfolgte die Quantifizierung im Luminex 200. Die Proben wurden durch eine Kapillare gesaugt, so dass immer nur eine Kugel pro Messpunkt erfasst wurde. Anhand der Farbcodierung der Kügelchen (Zuordnung des Antigens) und der Phycoerythrin-assoziierten Fluoreszenzstärke (Konzentration des Antigens) konnte die Konzentration der Zytokine im Vergleich zu mitgelieferten Standardpräparaten bestimmt werden.

2.2.6 Histologie

2.2.6.1 Einbetten von Därmen in Paraffin

Aufgrund der erhöhten Tumorlast wurden jeweils die dritten (distalen) Abschnitte der fixierten und Methylenblau-gefärbten Därme nach Art einer „Swiss Roll“ (mit der Innenseite nach innen) (Park, Reid et al. 1987) aufgerollt in Einbettkassetten überführt und bis zur weiteren Behandlung in PBS gelagert. Das Entwässern und das Einbetten in Paraffin erfolgte am Institut für Pathologie der Charité am Campus Mitte mit freundlicher Unterstützung von Frau Gabriele Fernahl nach Standardprotokoll. Die Paraffinblöcke wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.6.2 Herstellung von Paraffinschnitten

Mit einem Rotationsmikrotom, Leica Microsystems, wurden 2 µm dicke Gewebeschnitte der in Paraffin eingebetteten Darmabschnitte angefertigt. Dabei wurden die Schnitte im 45°C Wasserbad gestreckt und auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Nach dem Trocknen ü.N. bei 37°C im Trockenschrank konnten die Schnitte bei RT gelagert werden.

2.2.6.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die HE-Färbung ist eine der am weitesten verbreiteten Routinefärbemethoden für morphologische Untersuchungen von Gewebeschnitten. Hämatoxylin färbt basophile Strukturen wie Zellkerne und das Endoplasmatische Retikulum blau, während Eosin alle basischen eosinophilen Strukturen wie das Zellplasma rot färbt. Die Schnitte wurden dazu zunächst entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert.

absteigende Alkoholreihe

Xylol	2 x 10 min
EtOH 100%	2 x 5 min
EtOH 96%	2 x 3 min
EtOH 70%	1 min
EtOH 40%	1 min

Es folgte die Kernfärbung mittels 1:10 verdünnter Hämatoxylinlösung für 5 min und anschließendes Bläuen der Färbung unter fließendem Leitungswasser für 3 min. Nach Spülen mit H₂O bidest. wurde in gleicher Weise mit Eosin das Zellplasma gefärbt. Nun mussten die Schnitte wieder über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert werden, bevor sie mit Entellan[®]Neu (Merck, Darmstadt) eingedeckt und ü.N. getrocknet wurden.

aufsteigende Alkoholreihe

EtOH 96%	2 x 1 min
EtOH 100%	2 x 1 min
Xylol	2 x 1 min

Hämatoxylinlösung: 0,2% (w/v) Mayer's Hämatoxylin (Chroma, Münster), 6,25% (w/v) Kalialaun, 6,25% (w/v) Chloralhydrat, 0,125% (w/v) Zitronensäure, kristallin, 0,025% (w/v) Natriumjodat NaIO₃

Eosinlösung: 1,25% (w/v) Eosin Yellowish (Chroma, Münster), 70% (v/v) EtOH, direkt vor Gebrauch 4% (v/v) Eisessig

2.2.6.4 Chloracetatesterase-Färbung

Die Chloracetatesterase-Färbung dient zur Sichtbarmachung von neutrophilen Granulozyten und Gewebsmastzellen (Leder 1970). Das Prinzip beruht darauf, dass durch die Aktivität eines Enzyms ein lösliches Substrat in einen unlöslichen Farbstoff umgewandelt wird.

Zunächst mussten Pararosanilinlösung und Na-Nitritlösung zu gleichen Teilen (je 300 µl) gemischt und für 60 sec inkubiert werden. Danach wurde 90 ml Na-Phosphatpuffer hinzugefügt und ein pH-Wert von 6,3 eingestellt. Nach der Zugabe von 5 ml der frisch angesetzten Substratlösung wurde das Gemisch sofort filtriert und dazu verwendet, die vorher entparaffinierten Schnitte für 30 min bei RT zu färben. Nach viermaligem Waschen mit H₂O bidest. für je 5 min konnte noch eine fünfminütige Toluidinblau-Kernfärbung angeschlossen werden. Nach erneutem viermaligem Waschen wurden die Schnitte schließlich wie oben beschrieben in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und eingedeckt.

Pararosanilin-Lösung, 4%-ig:	0,4 g Pararosanilin in 8,4 ml H ₂ O bidest + 1,6 ml 2 N HCl
Na-Nitritlösung, 4%-ig:	4% (w/v) Na-Nitrit in H ₂ O bidest.
Phosphatpuffer 0,07 mol/l:	A: 0,946 g Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei) /100 ml, B: 1,045 g NaH ₂ PO ₄ /100 ml, 30 ml A + 70 ml B => pH 6,5
Substrat-Lösung:	0,03 g Naphthol AS-D Chloracetat, 3 ml NN-dimethylformamid
Toluidinblau-Stock-Lösung:	0,5 g Toluidine blue O Sigma, 50 ml 70% EtOH
NaCl-Lösung, 1%-ig:	1% (w/v) NaCl in H ₂ O bidest., pH 2,2 mit HCl einstellen
Toluidinblau-Färbelösung:	10% Toluidinblau-Stock-Lösung + 90% NaCl-Lösung, 1%-ig

2.2.6.5 Immunhistologie

Zum eindeutigen Nachweis von Mastzellen wurde ein fluoreszenzmarkierter anti-CD117-Antikörper (c-Kit), eBioscience, San Diego, USA, verwendet. Die Schnitte wurden zunächst wie oben beschrieben entparaffiniert und anschließend zur hitzeinduzierten Antigen-Demaskierung mit Citratpuffer, pH 6,0 (DAKO) für 2 x 5 min bei 450 W in der Mikrowelle erhitzt. Einer Vorinkubation mit PBST für 15 min folgte dreimaliges Waschen mit PBSG und danach eine Blockierung unspezifischer Bindestellen mittels 1,5% NGS (*normal goat serum*), Vectastain[®] ABC-Kit, Vector Laboratories, USA. Die Inkubation mit dem FITC-markierten anti-CD117-Antikörper (1:25 in PBS) erfolgte bei 4°C ü.N.. Einem erneuten dreimaligen Waschen mit PBSG schloss sich eine DAPI-Färbung (1:30000 in PBS) für 1 min an. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in die DNA an und dient daher der Sichtbarmachung der Zellkerne. Nach erneutem Waschen wurde mit ImmuMount (Shandon, USA) eingedeckt. Die Präparate wurden im Dunkeln bei 4°C gelagert.

10 x PBS:	80 g NaCl, 2 g KCl, 17,8 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 2,4 g KH ₂ PO ₄ in 1 l H ₂ O bidest., pH 7,4
PBST:	0,5% (w/v) Triton X100 in 1 x PBS
PBSG:	0,1 M Glycin in 1 x PBS
PBS/HS:	10% Horse Serum in 1 x PBS
PBS/NaCl:	0,25 M NaCl in 0,01 M PBS

2.2.7 Total-Reflexions-Röntgenfluoreszenz-Analyse (TRFA)

Die TRFA beruht auf dem physikalischen Prinzip, dass Röntgenbestrahlung von Materie die Emission von spezifischer Fluoreszenzstrahlung zur Folge hat. Dabei ist die Wellenlänge und Energie der Fluoreszenzstrahlung charakteristisch für die in der Probe vorhandenen Elemente, die Intensität der Fluoreszenzstrahlung wiederum ist proportional zur Konzentration des entsprechenden Elements. Da die Bestrahlung in einem extrem

flachen Winkel erfolgt, muss die Probe als dünner Film auf einen reflektierenden Probenträger aufgebracht werden. Zur internen Standardisierung wird ein Element in bekannter Konzentration (in diesem Fall Gallium (Ga)) zugefügt. Alle Messungen erfolgten im S2 Picofox, Bruker, mit einer durchschnittlichen Messzeit von 1000 sec.

Beim Aufarbeiten der Proben sind folgende Besonderheiten zu beachten:

Serum: Um den Gehalt von Spurenelementen, insbesondere Selen, im Mausserum zu messen, wurde dieses 1:2 mit HPLC-H₂O verdünnt und ein Ga-Standard in der Konzentration 1 mg/l zugefügt. 8 µl der Probe wurden auf einen Quarzglas-Objekträger pipettiert und bis zum vollständigen Trocknen des Tropfens bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Messung.

Gewebe: Eine Spatelspitze Gewebe wurde in ein vorgekühltes 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß eingewogen, mit zwei Teilen 65% HNO₃ + Ga-Standard [1 mg/l] versetzt und für 45 min im Heizblock bei 60°C inkubiert. Nach vollständigem Lösen des Gewebes wurden 8 µl der Probe auf vorher mit 2 µl Silikon beschichtete Quarzglas-Objekträger aufgebracht und bis zum Trocknen der Probe bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Messung.

Futter: Das Futter wurde fein gemörsert und in kleinen Mengen (30-50 mg) in Glasröhrchen eingewogen und mit vier Teilen 65% HNO₃ + Ga-Standard [1 mg/l] versetzt. Nach Zugabe von Siedesteinchen wurden die Proben für 1 h bei 150°C aufgekocht, danach auf Silikon beschichtete Objekträger pipettiert und nach dem Trocknen gemessen.

2.2.8 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS. Die Daten wurden zunächst auf Normalverteilung überprüft (Kolmogorov-Smirnov Test) und dann entsprechend mittels Student's t-Test für normalverteilte bzw. Mann-Whitney-U-Test für nicht normalverteilte Daten getestet. Die verwendeten Tests sind in den einzelnen Abbildungen aufgeführt, Grafiken wurden mit SigmaPlot 10 bzw. GraphPad Prism 4 angefertigt. Die Fehlerbalken der Diagramme stellen, soweit nicht als Standardabweichung (*SD = standard deviation*) angegeben, jeweils den Standardfehler des Mittelwertes (*SEM = standard error of the mean*) dar. Signifikanzen sind angegeben mit *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss des *SepP*-Genotyps auf die Tumorigenese in *Apc^{Min/+}*-Mäusen

Das in der Leber gebildete Se-Transport- und -Speicherprotein SEPP nimmt eine zentrale Rolle in der Selenversorgung der Organe ein. Studien haben gezeigt, dass SNPs im *SEPP*-Gen einen schlechteren Se-Metabolismus zur Folge haben und mit einem erhöhten Krebsrisiko assoziiert werden können. *SepP^{+/-}*-Mäuse stellen ein geeignetes Modell für eine genetisch bedingte leicht eingeschränkte Selenversorgung bei sonst einwandfreier Gesundheit dar. Um den Einfluss von *SepP* auf die Tumorigenese zu untersuchen, wurden *SepP^{+/-}*-Mäuse mit *Apc^{Min/+}*-Mäusen, die wiederum ein Modell für ein erhöhtes Krebsrisiko darstellen, verkreuzt. Die daraus hervorgegangenen Jungtiere, die sich theoretisch aus gleichen Teilen *SepP^{+/+} Apc^{Min/+}*- (im Folgenden einfach als *Apc^{Min/+}*-Mäuse bezeichnet) und *SepP^{+/-} Apc^{Min/+}*-Mäusen zusammensetzten, wurden ab dem Tag des Absetzens von der Mutter (Tag 21) auf Futter mit definiertem, als adäquat zu bezeichnenden Se-Gehalt von 0,15 ppm (RDA = *recommended dietary allowance*), gehalten. Dieses wurde in Kooperation mit dem Deutschen Institut für Ernährungsforschung (DIfE) in Potsdam-Rehbrücke eigenhändig hergestellt und die Präzision dieser Anreicherung mittels TRFA-Messung überprüft. Nach 120 Tagen kontrollierter Fütterung wurden die Tiere getötet und der Gastrointestinaltrakt für die Tumoranalysen präpariert. Die Tumoranzahl sowie die Größe der Tumore wurden durch zweimaliges Auszählen bestimmt, um die Mittelwerte beider Zählungen und Größenbestimmungen zu bilden. Dies geschah in enger Zusammenarbeit mit meinem Kollegen Dipl. Biol. Thomas Behrends.

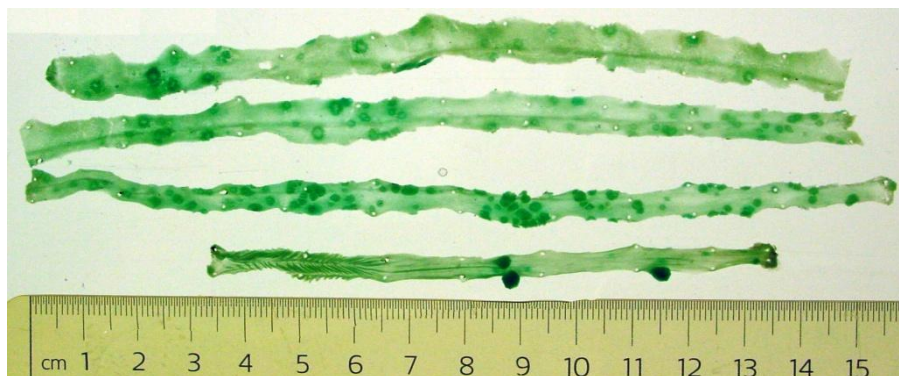


Abb. 3.1: Darmpräparat einer *Apc^{Min/+}*-Maus. Beispiel für ein fixiertes, Methylenblau-gefärbtes Darmpräparat einer *Apc^{Min/+}*-Maus (aus Dissertation von Marten Michaelis). Zu sehen sind von oben nach unten die drei Dünndarmabschnitte und der Kolon. Tumore heben sich durch das Kontrastmittel deutlich vom gesunden Darmgewebe ab und konnten mit einer Schablone ausgezählt werden.

Abbildung 3.2 zeigt die Tumoranzahl von $Apc^{Min/+}$ -Mäusen (blau) und von $SepP^{+/-}Apc^{Min/+}$ -Mäusen (rot) aufgetragen gegen die festgestellten Tumorgößen. Die Kurven zeigen eine deutliche Verschiebung des Größenspektrums der Tumore; $SepP^{+/-}Apc^{Min/+}$ -Mäuse zeigten eine deutlich höhere Anzahl von Tumoren mit größerem Durchmesser (>2 mm) als $Apc^{Min/+}$ -Vergleichstiere. In $Apc^{Min/+}$ -Mäusen wurden im Mittel 155 Tumoren gezählt, die meisten davon wiesen eine Größe von maximal 1,5 mm im Durchmesser auf. In $SepP^{+/-}Apc^{Min/+}$ -Mäusen dagegen, die sich in der Tumoranzahl selbst nicht wesentlich unterschieden (160 im Mittel), wurden weniger kleine, dafür mehr große Tumore gezählt (im Falle der im Durchmesser >2 mm großen Tumore zum Teil sogar signifikant mehr), so dass aus einer nahezu gleichen Tumoranzahl eine insgesamt größere Gesamttumorfläche resultierte (Abbildung 3.3).

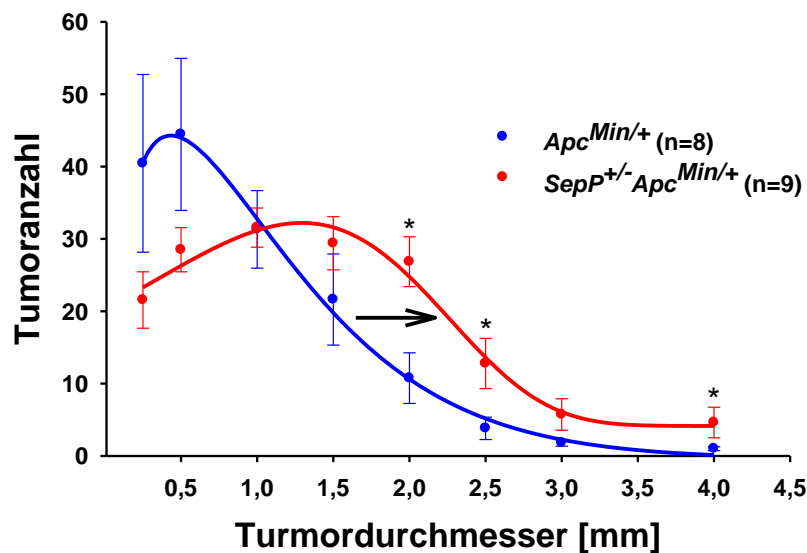


Abb. 3.2: Einfluss des $SepP$ -Genotyps auf die Tumorigenese nach RDA-Diät. Die Tumoranzahl und Tumorgöße wurden im Dünndarm von $Apc^{Min/+}$ -Mäusen nach 120 Tagen bei Se-adäquater Diät (0,15 ppm Se/RDA) ermittelt. In $SepP^{+/-}Apc^{Min/+}$ -Mäusen war eine deutliche, teilweise statistisch signifikante Verschiebung hin zu größeren Tumoren zu beobachten. (* = $p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test)

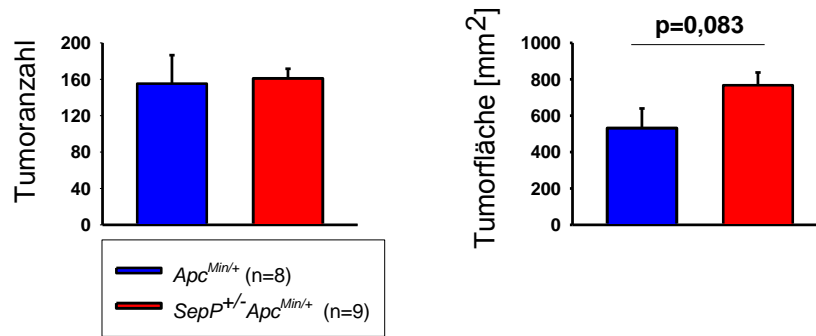


Abb. 3.3: Einfluss des *SepP*-Genotyps auf Tumoranzahl und Gesamttumorfläche nach RDA-Diät. Beim Vergleich der Tumorigenese von *Apc^{Min/+}*- und *SepP^{+/-} Apc^{Min/+}*-Mäusen nach 120 Tagen auf Se-adäquater Diät ergab sich bei gleicher Tumoranzahl durch die in Abb. 3.2 gezeigte Verschiebung hin zu größeren Tumoren eine insgesamt vergrößerte Gesamttumorfläche.

Die hier dargestellten Sachverhalte dienen im weiteren Verlauf der Arbeit als Grundlage für Fütterungsversuche mit verschiedenen Se-Konzentrationen, um den Einfluss des Se-Status auf die Tumorigenese zu untersuchen, einerseits in *SepP*-wildtypischen Tieren und andererseits in den Tieren, in denen der Se-Metabolismus durch den *SepP*-Genotyp leicht eingeschränkt ist. Sie untermauern den Grundgedanken, dass diese genetische Prädisposition (ähnlich wie bei humanen SNPs) mit erhöhtem Krebsrisiko einhergeht.

3.2 Einfluss des Se-Gehalts der Nahrung auf die Tumorigenese in *Apc^{Min/+}*-Mäusen

3.2.1 Se-Supplementation von *Apc^{Min/+}*-Mäusen

Um den Effekt einer Se-Supplementation selbst auf die intestinale Tumorigenese in *Apc^{Min/+}*-Mäusen zu betrachten, wurden diese ab Tag 21 (nach dem Absetzen von der Mutter) mit Futter gefüttert, das mit 0,6 ppm das Vierfache der empfohlenen Se-Dosis (RDA) in Form von Na-Selenit enthält. Abbildung 3.4 zeigt, dass die Tumoranzahl in den supplementierten Tieren (rot) im Vergleich zu den RDA-Kontrolltieren (grün) statistisch signifikant verringert war. Das betraf vor allem Tumore in der Größe bis 2 mm Durchmesser, größere Tumore waren in beiden Futtergruppen bei *SepP*-wildtypischen *Apc^{Min/+}*-Mäusen selten zu finden.

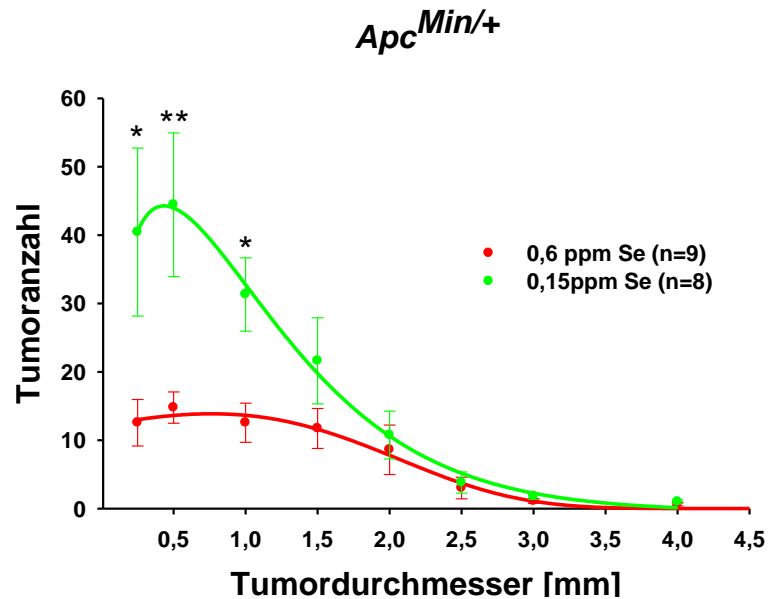


Abb. 3.4: Einfluss einer Se-Supplementation auf die Tumorigenese in *Apc^{Min/+}*-Mäusen. Bestimmt wurden die Tumoranzahl und Tumorgöße im Dünndarm von *Apc^{Min/+}*-Mäusen nach 120 Tagen, die 0,6 ppm Se (rot) ab Tag 21 erhielten, im Vergleich zu einer adäquaten Se-Diät (0,15 ppm/grün). Die Tumoranzahl der Tumore bis zu einem Durchmesser von 2 mm war deutlich erniedrigt, zum Teil statistisch signifikant bzw. sehr signifikant. (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, Mann-Whitney-U-Test)

Abbildung 3.5 veranschaulicht ebenfalls den signifikanten Erfolg der Se-Supplementation. Im Mittel standen 65 Tumore bei diesen Tieren einem Mittelwert von 155 Tumoren bei Tieren der RDA-Gruppe gegenüber. Dem entsprechend war auch die Gesamttumorfläche aller Tumore im Darm deutlich verringert.

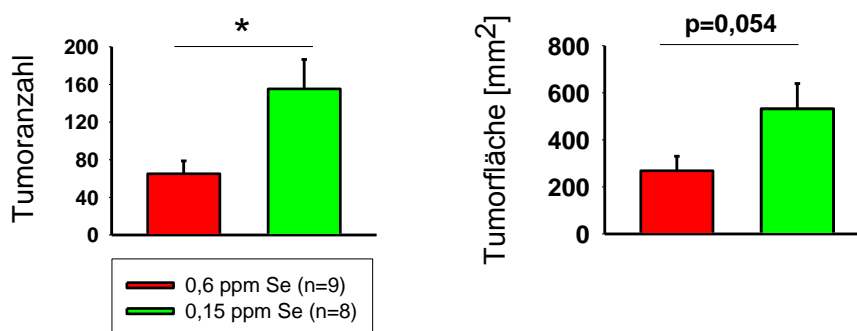


Abb. 3.5: Einfluss einer Se-Supplementation auf Tumoranzahl und Gesamttumorfläche in *Apc^{Min/+}*-Mäusen. Ein Vergleich der Tumorigenese von *Apc^{Min/+}*-Mäusen nach 120 Tagen, die ab Tag 21 mit 0,6 ppm (rot) bzw. 0,15 ppm (grün) Na-Selenit im Futter gefüttert wurden, zeigte, dass die Tumoranzahl in supplementierten Tieren signifikant erniedrigt war. Die Gesamttumorfläche war dem entsprechend ebenfalls deutlich verringert. (* = $p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test)

3.2.2 Se-Supplementation von *SepP*^{+/-} *Apc*^{Min/+}-Mäusen

Um der Überlegung nachzugehen, dass der Effekt des eingeschränkten Se-Metabolismus durch die *SepP*-Heterozygotie und der daraus resultierenden erhöhten Tumorigenese möglicherweise durch eine erhöhte Selenversorgung über das Futter kompensiert werden könnte, wurden analog auch *SepP*^{+/-} *Apc*^{Min/+}-Mäuse mit derselben Na-Selenit-Konzentration von 0,6 ppm Se supplementiert. Nach 120 Tagen zeigte sich hier der Effekt der erhöhten Se-Versorgung noch ausgeprägter als in obiger Abbildung. Die Anzahl der Tumore war bei fast allen Größenordnungen signifikant erniedrigt. Supplementierte Tiere (rot) hatten weniger und kleinere Tumore im Darm, grafisch wird das auch in diesem Fall durch eine Verschiebung der Kurven klar erkennbar (Abbildung 3.6). Dennoch wurde nicht ganz das Niveau der supplementierten *SepP*-wildtypischen *Apc*^{Min/+}-Mäuse erreicht, auch bei Se-reicher Ernährung blieb der Genotypeneffekt erhalten, war aber, anders als bei adäquater Versorgung nicht mehr so ausgeprägt (Vergleich Abbildung 3.4 und 3.6).

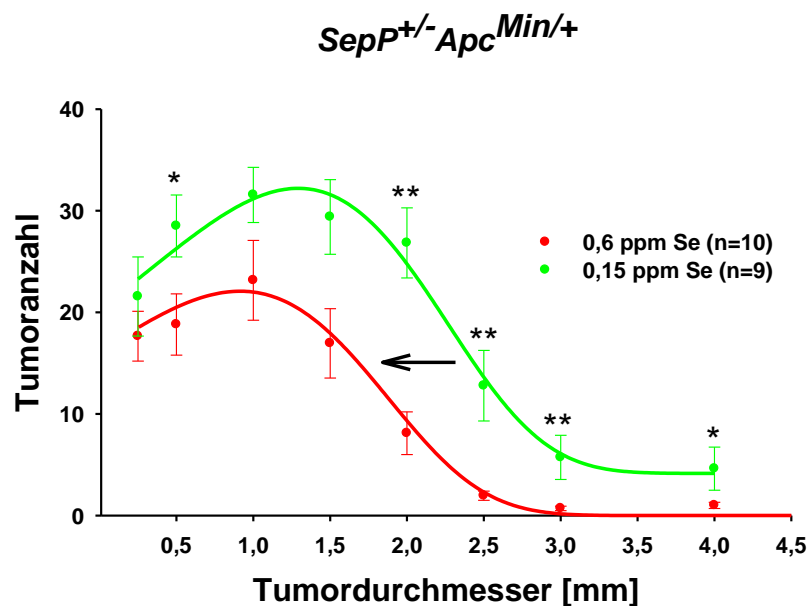


Abb. 3.6: Einfluss einer Se-Supplementation auf die Tumorigenese in *SepP*^{+/-} *Apc*^{Min/+}-Mäusen. Bestimmt wurden die Tumoranzahl und Tumorgöße im Dünndarm von *SepP*^{+/-} *Apc*^{Min/+}-Mäusen nach 120 Tagen, die 0,6 ppm Se (rot) ab Tag 21 erhielten, im Vergleich zu einer adäquaten Se-Diät (0,15 ppm/grün). Die Tumoranzahl aller Größenordnungen war deutlich verringert, zum Teil statistisch signifikant bzw. sehr signifikant. (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, Mann-Whitney-U-Test)

Abbildung 3.7 zeigt die signifikante Verringerung der Tumoranzahl in supplementierten *SepP*^{+/-} *Apc*^{Min/+}-Mäusen nach 120 Tagen (im Mittel 88) gegenüber Tieren gleichen Genotyps, die Se-adäquat versorgt wurden (im Mittel 160). Da sich Tumore aller Größenordnungen in dieser Gruppe sehr signifikant erniedrigt zeigten, war dies auch für die Gesamttumorfläche im Darm der Fall.

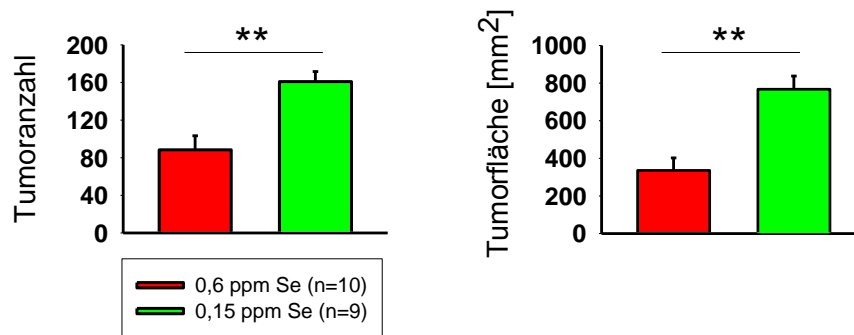


Abb. 3.7: Einfluss einer Se-Supplementation auf Tumoranzahl und Gesamttumorfläche in *SepP^{+/-} Apc^{Min/+}*-Mäusen. Der Vergleich der Tumorigenese von *SepP^{+/-} Apc^{Min/+}*-Mäusen nach 120 Tagen, die ab Tag 21 mit 0,6 ppm (rot) bzw. 0,15 ppm (grün) Na-Selenit im Futter gefüttert wurden, zeigte eine sehr signifikante Verringerung der Tumoranzahl und somit auch der Gesamttumorfläche in supplementierten Tieren. (** = $p < 0,01$, Mann-Whitney-U-Test)

Fazit: Eine Se-Supplementation ab Tag 21 mit dem Vierfachen der empfohlenen Se-Dosis führte in *Apc^{Min/+}*-Mäusen zu einer signifikant erniedrigten Tumoranzahl. Im Falle eines genetisch bedingten schlechteren Se-Metabolismus in *SepP^{+/-} Apc^{Min/+}*-Mäusen war dieser Effekt noch ausgeprägter.

3.2.3 Bestimmung des Se-Satus der Versuchstiere

Zur Bestimmung des Se-Status der Versuchstiere wurde zum einen ein Aliquot des bei der Präparation nach 120 Tagen gewonnenen Serums direkt mittels TRFA bestimmt, zum anderen wurde die Enzymaktivität der plasmatischen Glutathion-Peroxidase (pGPx) aus dem Rest des Serums nach einmaligem Einfrieren und Auftauen bestimmt.

Abbildung 3.8 zeigt die Unterschiede in der Serum-Se-Konzentration zwischen *SepP*-heterozygoten und -wildtypischen *Apc^{Min/+}*-Mäusen der verschiedenen Futtergruppen. In *SepP*-heterozygoten Tieren wurde dabei eine Se-Konzentration im Blut festgestellt, die etwa der Hälfte der Se-Konzentration in den Wildtyptieren entspricht. Ein diätätischer Effekt war hierbei nicht erkennbar. Die Aktivität der plasmatischen Glutathion-Peroxidase blieb unbeeinflusst, sowohl vom Selengehalt des Futters, als auch von der Versorgung durch *SepP* über das Blut.

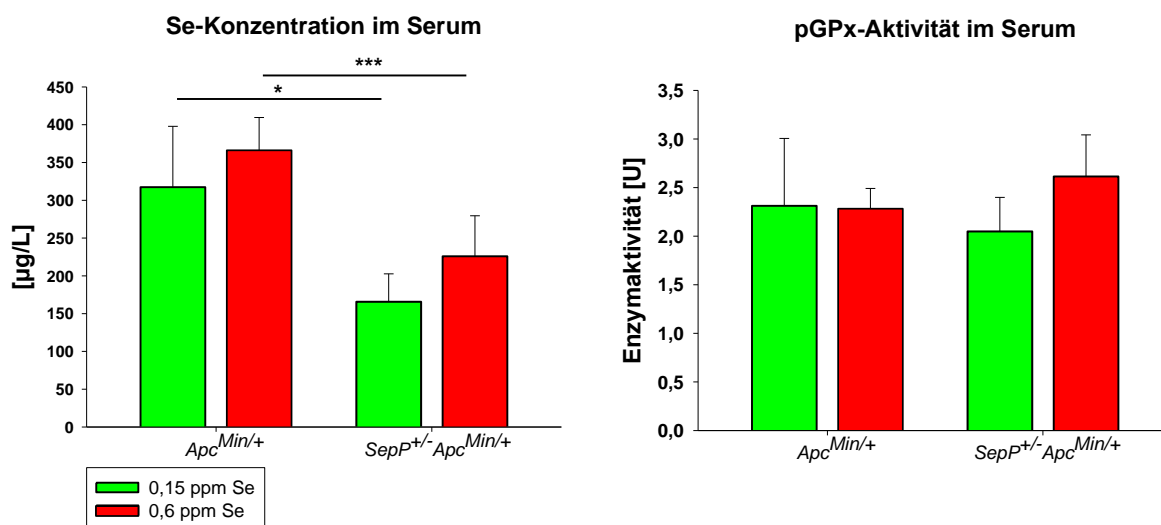


Abb. 3.8: Se-Konzentration und pGPx-Aktivität im Serum von *Apc^{Min/+}*- und *SepP^{+/-} Apc^{Min/+}*-Mäusen. Durchgeführt wurde eine Se-Bestimmung mittels TRFA und eine Enzymaktivitätsmessung mittels GPx-Assay aus Mausserum nach 120 Tagen, nach Fütterung mit 0,15 ppm Se (grün) bzw. 0,6 ppm Se (rot). Bei der Se-Konzentration zeigte sich eine Verringerung um etwa die Hälfte in *SepP*-heterozygoten Tieren unabhängig vom Futter. Die Aktivität der pGPx blieb in allen Gruppen unbeeinflusst. (MW \pm SD, * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$, t-Test)

3.2.4 Se-defiziente Fütterung von *Apc^{Min/+}*- und *SepP^{+/-} Apc^{Min/+}*-Mäusen

Eine Se-Supplementation zeigte einen chemopräventiven Effekt auf die Tumorigenese in *Apc^{Min/+}*-Mäusen. Um zu untersuchen, ob eine Versorgung, die unterhalb der empfohlenen Se-Dosis liegt, die Situation verschlechtern würde, wurden *Apc^{Min/+}*-Mäuse und *SepP^{+/-} Apc^{Min/+}*-Mäuse ab Tag 21 mit dem Se-defizienten Basisfutter, das nur ungefähr die Hälfte der empfohlenen Se-Dosis enthielt (0,08 ppm), gefüttert. Bei beiden Genotypen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen. Tumoranzahl, Tumorfläche und Verteilung der Größenordnungen waren in den marginal versorgten Tieren fast identisch zu den entsprechenden Se-adäquat gefütterten Tieren gleichen Genotyps (Abbildungen 3.9 und 3.10).

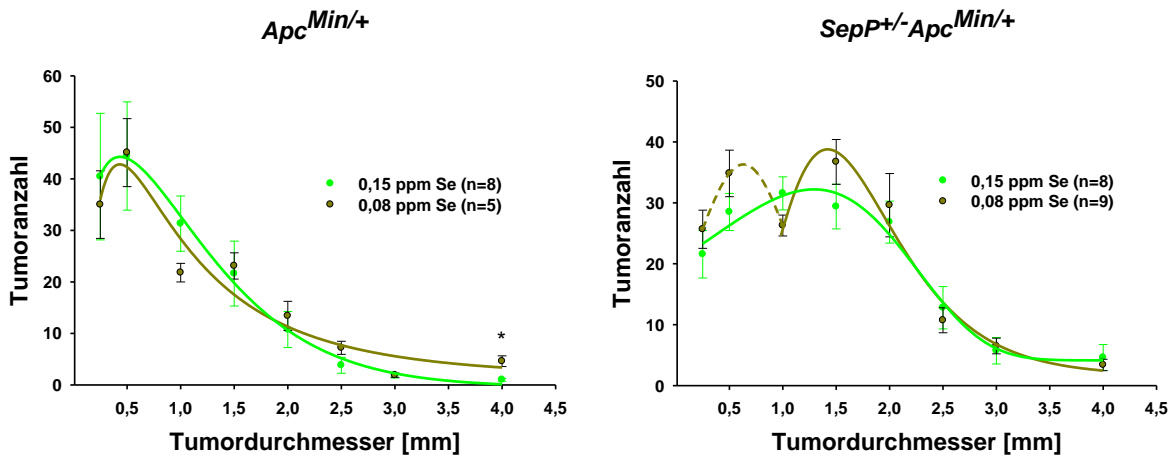


Abb. 3.9: Einfluss einer Se-Defizienz auf die Tumorigenese. Bestimmt wurden die Tumoranzahl und Tumorgöße im Dünndarm von *Apc^{Min/+}*- bzw. *SepP^{+/-}Apc^{Min/+}*-Mäusen nach 120 Tagen, nach einer Se-defizienten Fütterung (0,08 ppm/olivgrün) ab Tag 21 im Vergleich zu einer adäquaten Se-Diät (0,15 ppm/grün). Die Tumoranzahl und Verteilung der Größen war innerhalb der Genotypen nahezu identisch.

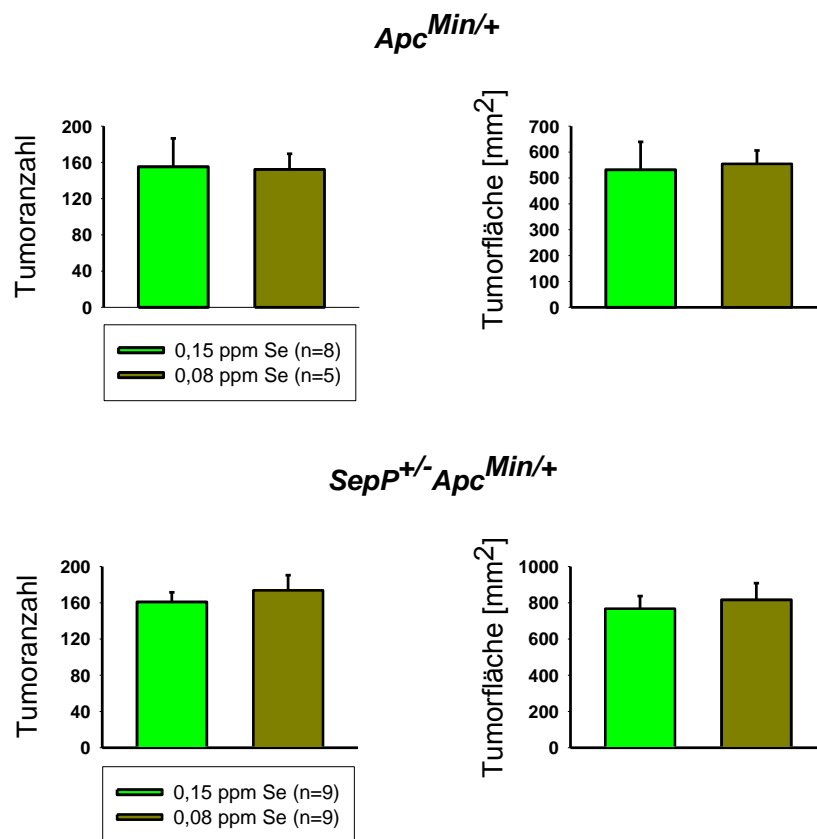


Abb. 3.10: Einfluss einer Se-Defizienz auf die Tumoranzahl und die Gesamttumorfläche. Beim Vergleich der Tumorigenese von *Apc^{Min/+}*- und *SepP^{+/-}Apc^{Min/+}*-Mäusen nach 120 Tagen, die ab Tag 21 mit 0,08 ppm (olivgrün) bzw. 0,15 ppm (grün) Na-Selenit im Futter gefüttert wurden, zeigten sich keine signifikanten Veränderung durch die Se-Unterversorgung zwischen den Genotypen.

3.3 Strategien zur Therapie der Tumorigenese von *Apc*^{Min/+}-Mäusen

3.3.1 Se-Supplementation als Therapie-Strategie

Nachdem sich durch eine Se-Supplementation ab Tag 21 eine signifikante Reduktion der intestinalen Tumorigenese erreichen ließ, stellte sich die Frage, ob sich auch eine Erhöhung der Se-Zufuhr über die Nahrung zu einem späteren Zeitpunkt positiv auf den Verlauf der Krebserkrankung auswirken kann. Damit würde man zwischen einem Effekt des Spurenelements auf Tumorumitiation und Tumorprogression unterscheiden können, Selen also als adjuvantes Therapeutikum und nicht als Präventivum verstehen. Daher wurden sowohl *Apc*^{Min/+}-, als auch *SepP*^{+/-}*Apc*^{Min/+}-Mäuse zunächst auf Se-adäquater Diät (0,15 ppm Se) gehalten und erst ab Tag 60 mit Se-reicher (0,6 ppm Se) Nahrung gefüttert. Zu diesem Zeitpunkt sollten sich bereits Adenome im Dünndarm der Mäuse gebildet haben, so dass ein möglicher therapeutischer Effekt im Vergleich zu den Tieren, die die gesamte Zeitdauer von 120 Tagen Se-adäquat gefüttert wurden, erkennbar wäre.

Es zeigten sich allerdings bei beiden Genotypen keine signifikanten Effekte auf Tumoranzahl und Tumorflächen (Abbildungen 3.11 und 3.12). Bei den *SepP*-wildtypischen *Apc*^{Min/+}-Mäusen zeigte sich eine leichte, nicht statistisch signifikante, Verringerung der Anzahl kleiner Tumore, die sich allerdings nicht widerspiegelt beim Vergleich der errechneten Gesamttumorfläche. Diese nimmt hingegen bei *SepP*^{+/-}*Apc*^{Min/+}-Tieren tendenziell zu, begründet durch einen leichten, allerdings ebenfalls nicht signifikanten, Anstieg der Tumoranzahl bei Tumoren fast aller Größenordnungen.

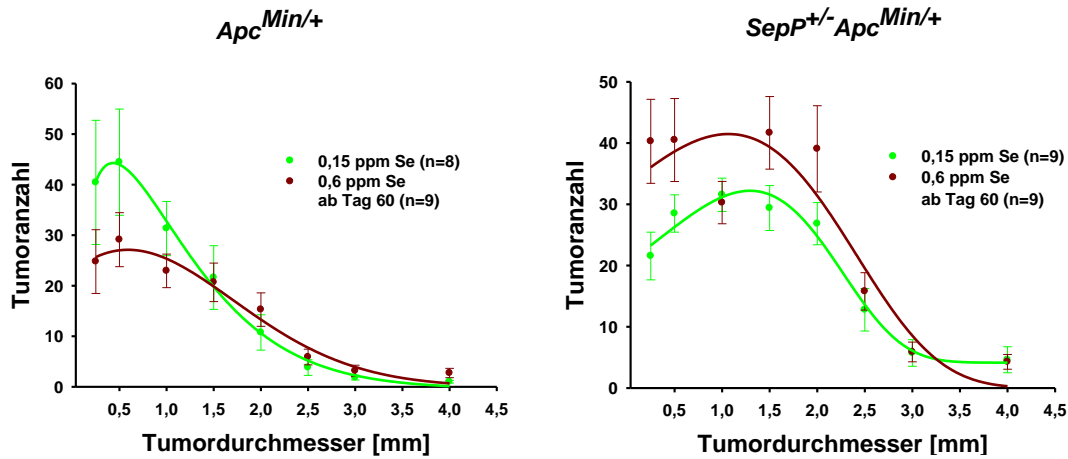


Abb. 3.11: Einfluss einer Se-Supplementation als Therapie-Strategie auf die Tumorigenese. Bestimmt wurden die Tumoranzahl und Tumorgöße im Dünndarm von *Apc^{Min/+}*- bzw. *SepP^{+/-} Apc^{Min/+}*-Mäusen nach 120 Tagen, die ab Tag 60 0,6 ppm Se (dunkelrot) erhielten, im Vergleich zu einer konstanten adäquaten Se-Diät (0,15 ppm/grün). Es waren keine signifikanten Veränderungen zu beobachten, in *Apc^{Min/+}*-Tieren war die Anzahl kleiner Tumore leicht verringert, in *SepP^{+/-} Apc^{Min/+}*-Tieren war die Anzahl der Tumore nahezu aller Größen leicht erhöht.

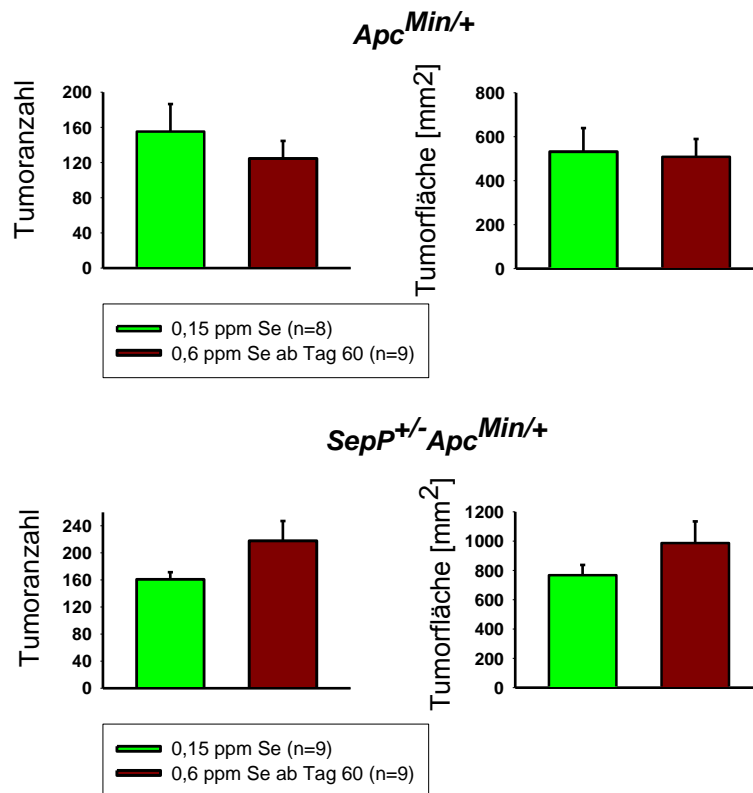


Abb. 3.12: Einfluss einer Se-Therapie auf die Tumoranzahl und die Gesamttumorfläche. Beim Vergleich der Tumorigenese von *Apc^{Min/+}*- und *SepP^{+/-} Apc^{Min/+}*-Mäusen nach 120 Tagen, die ab Tag 60 mit 0,6 ppm (dunkelrot) bzw. durchgehend mit 0,15 ppm (grün) Na-Selenit im Futter gefüttert wurden, zeigte sich eine leichte Reduktion der Tumoranzahl in *Apc^{Min/+}*-Mäusen. Bei *SepP^{+/-} Apc^{Min/+}*-Mäusen erhöhte sich dagegen die Tumoranzahl und dadurch auch die Tumorfläche - dieser Effekt war allerdings nicht signifikant.

3.3.2 NSAID-Therapie

Eine generelle Therapierbarkeit der Tumorprogression im Dünndarm von $Apc^{Min/+}$ -Mäusen ist bereits an anderer Stelle gezeigt (Boolbol, Dannenberg et al. 1996). Dabei haben sich besonders sogenannte NSAIDs (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*), zu denen z.B. auch Aspirin gehört, als besonders effektiv erwiesen, da sie durch eine Cox2-Inhibition die Prostaglandinproduktion hemmen. Somit verhindern sie das Ausschütten von Entzündungsmediatoren und verzögern so die Krebsentwicklung. Zum einen sollte die Wirkung eines solchen NSAIDs, Sulindac, in unserem Tiermodell überprüft werden und zum anderen der erwartete therapeutische Effekt mit Hilfe einer zusätzlichen Se-Gabe verstärkt werden. Dazu wurden zunächst sowohl $SepP$ -wildtypische $Apc^{Min/+}$ - als auch $SepP^{+/-}Apc^{Min/+}$ -Mäuse vor dem Hintergrund einer Se-adäquaten Diät nach 60 Tagen bis zum Endpunkt bei 120 Tagen mit 80 ppm Sulindac (gelöst im Trinkwasser) versorgt.

Wie in Abbildung 3.13 zu erkennen ist, hat die Behandlung mit 80 ppm Sulindac über das Trinkwasser in $Apc^{Min/+}$ -Mäusen keinen nachweisbaren Effekt auf die Tumorigenese, wohingegen die Situation bei $SepP^{+/-}Apc^{Min/+}$ -Mäusen tendenziell verschlimmert wurde. Hier zeigte sich zwar eine leichte Reduktion der Anzahl größerer Tumore (>1,5 mm), dafür war die Zahl kleiner Tumore in zwei Größenkategorien signifikant erhöht.

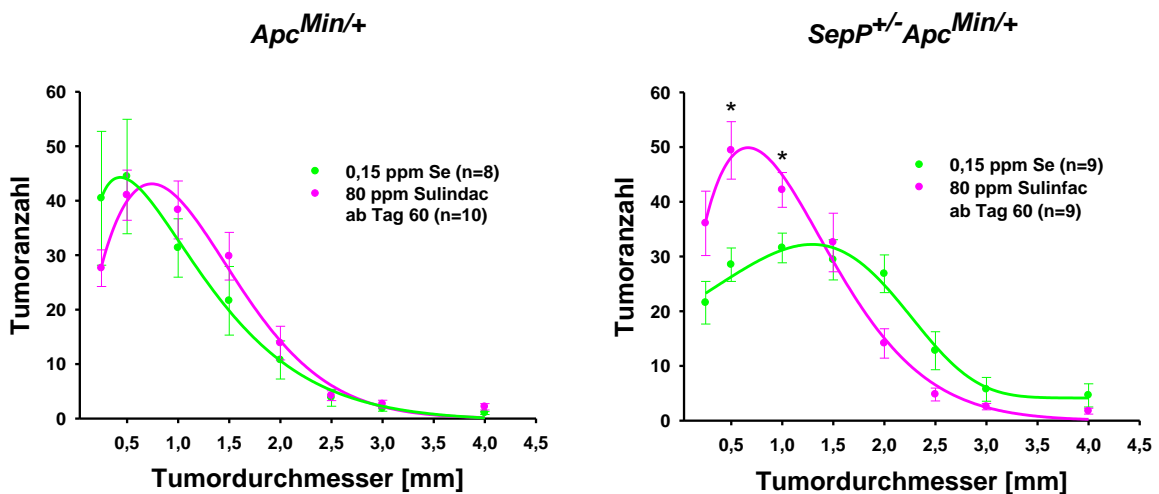


Abb. 3.13: Einfluss einer Sulindac-Therapie auf die Tumorigenese. Bestimmt wurden die Tumoranzenzahl und Tumorgöße im Dünndarm von $Apc^{Min/+}$ - bzw. $SepP^{+/-}Apc^{Min/+}$ -Mäusen nach 120 Tagen, die eine Sulindac-Therapie (80 ppm Sulindac über das Trinkwasser/pink) ab Tag 60 erhielten, im Vergleich zu einer konstanten adäquaten Se-Diät (0,15 ppm/grün) ohne Behandlung. Es waren keine Veränderungen in $Apc^{Min/+}$ -Tieren zu beobachten, in $SepP^{+/-}Apc^{Min/+}$ -Tieren dagegen war die Anzahl der kleinen Tumore hingegen signifikant erhöht. (* = $p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test)

Eine Gegenüberstellung der Tumoranzenzahl und Tumorflächen von behandelten und unbehandelten Tieren (Abbildung 3.14) zeigt deutlich, dass die Sulindac-Behandlung keinen offensichtlichen Effekt hervorgerufen hat. Bei $Apc^{Min/+}$ -Mäusen war die

Tumoranzahl nahezu identisch mit der unbehandelten Kontrollgruppe, die Tumorfläche war aufgrund der Kurvenverschiebung zwar leicht erhöht, allerdings ist hier kein signifikanter Unterschied festzustellen. Bei $SepP^{+/-}Apc^{Min/+}$ -Mäusen gab es zwar im Bereich der kleinen Tumore eine teilweise signifikante Erhöhungen der Tumorzahl in den behandelten Tieren, was allerdings durch weniger größere Tumore wieder ausgeglichen wurde, so dass es im Endeffekt keine signifikanten Unterschiede gab zwischen behandelten und unbehandelten Tieren.

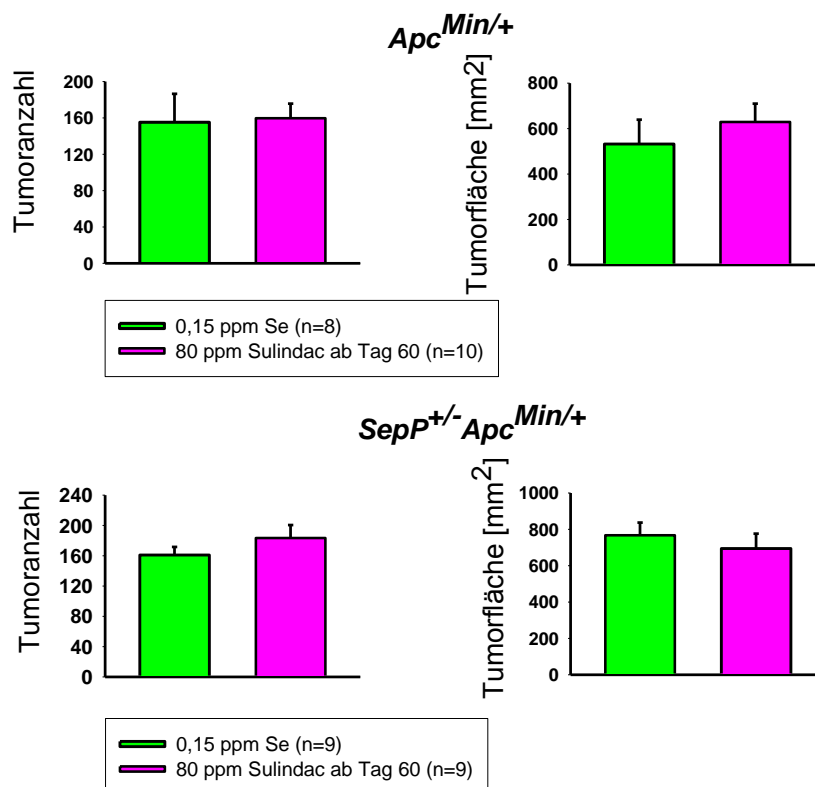


Abb. 3.14: Einfluss einer Sulindac-Therapie auf die Tumoranzahl und die Gesamttumorfläche. Beim Vergleich der Tumorigenese von $Apc^{Min/+}$ - und $SepP^{+/-}Apc^{Min/+}$ -Mäusen nach 120 Tagen, die ab Tag 60 mit 80 ppm Sulindac (pink) behandelt bzw. durchgehend ohne weitere Behandlung mit 0,15 ppm Na-Selenit (grün) im Futter gefüttert wurden, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tieren. Tendenziell gab es eher den negativen Effekt einer vergrößerten Tumorfläche in behandelten $Apc^{Min/+}$ -Mäusen und einer erhöhten Tumoranzahl in behandelten $SepP^{+/-}Apc^{Min/+}$ -Mäusen.

3.3.3 Kombination von Sulindac- und Se-Therapie

Ausgehend von der Erwartung des Erfolges einer Sulindac-Therapie aufgrund bereits bekannter Beispiele wurde parallel auch eine kombinierte Therapie aus 80 ppm Sulindac im Trinkwasser und 0,6 ppm Na-Selenit in der Nahrung ab Tag 60 vor dem Hintergrund einer adäquaten Ernährung bis zu diesem Zeitpunkt gestartet.

Analog zu den vorangegangenen Therapieansätzen war auch bei der kombinierten Therapie in $Apc^{Min/+}$ -Mäusen kein Unterschied feststellbar. In $SepP^{+/-}Apc^{Min/+}$ -Mäusen

wurde wieder eine leichte Erhöhung der Anzahl kleiner Tumore festgestellt, diesmal allerdings war die Anzahl größerer Tumore zumindest teilweise signifikant erniedrigt, so dass die Gesamttumorfläche auch hier unbeeinflusst blieb (Abbildungen 3.15 und 3.16).

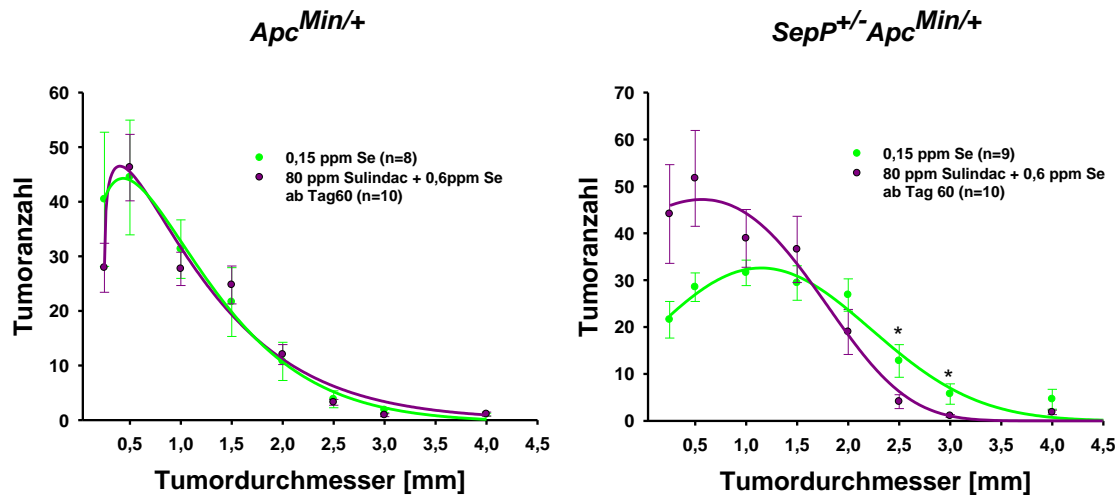


Abb. 3.15: Einfluss einer kombinierten Sulindac-Se-Therapie auf die Tumorigenese. Bestimmt wurden die Tumoranzahl und Tumorgöße im Dünndarm von *Apc^{Min/+}*- bzw. *SepP^{+/-} Apc^{Min/+}*-Mäusen nach 120 Tagen, die eine kombinierte Sulindac-Se-Therapie (80 ppm Sulindac über das Trinkwasser und 0,6 ppm Se über die Nahrung/lila) ab Tag 60 erhielten, im Vergleich zu einer adäquaten Se-Diät (0,15 ppm/grün) ohne Behandlung. Es waren keine Veränderungen in *Apc^{Min/+}*-Tieren zu beobachten, in *SepP^{+/-} Apc^{Min/+}*-Tieren dagegen war die Anzahl der kleinen Tumore leicht erhöht, die der größeren im Fall von zwei Größenkategorien signifikant erniedrigt. (* = $p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test)

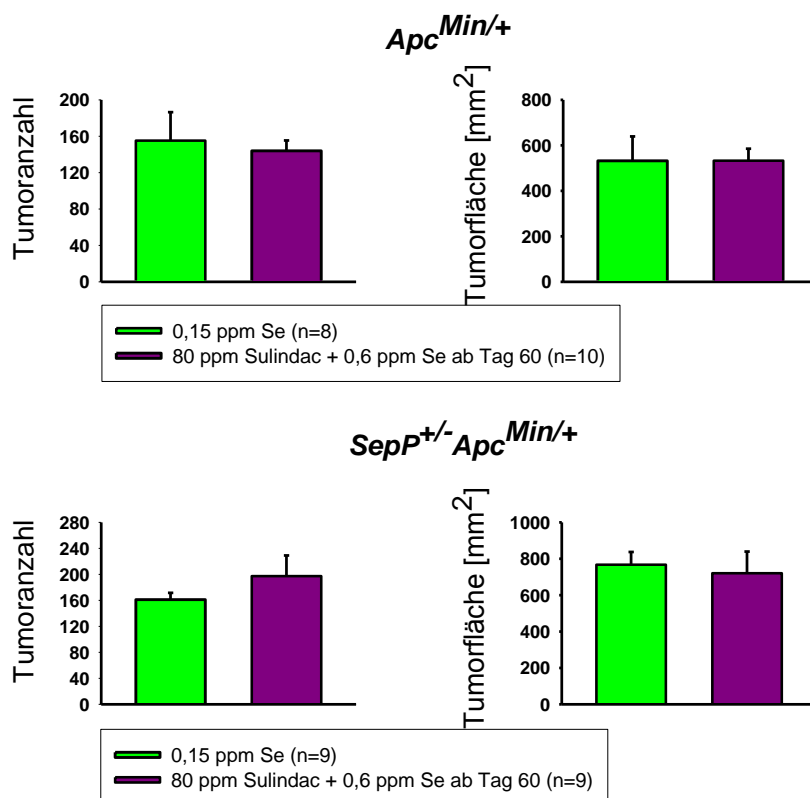


Abb. 3.16: Einfluss einer kombinierten Sulindac-Se-Therapie auf die Tumoranzahl und die Gesamttumorfläche. Beim Vergleich der Tumorigenese von *Apc^{Min/+}*- und *SepP^{+/-} Apc^{Min/+}*-Mäusen nach 120 Tagen, die ab Tag 60 mit 80 ppm Sulindac und 0,6 ppm Se (lila) behandelt bzw. durchgehend ohne weitere Behandlung mit 0,15 ppm (grün) Na-Selenit im Futter gefüttert wurden, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tieren. Tendenziell gab es eher den negativen Effekt einer erhöhten Tumoranzahl in *SepP^{+/-} Apc^{Min/+}*-Mäusen.

3.4 Tumoranalysen

3.4.1 Se-Konzentrationen im Tumor und gesundem Normalgewebe

Die ausbleibenden Effekte nicht nur der Sulindac-Behandlung, sondern auch der Se-Therapie ab Tag 60, die in *SepP*-heterozygoten Tieren sogar eine leichte Verschlechterung der Situation hervorrief, führte zu der Frage, ob die Tumorigenese unter Se-reichen Bedingungen gefördert wird, möglicherweise sogar Selen benötigt und anreichert. Daher wurden Gewebeproben der fixierten und gefärbten Darmpräparate entnommen, und diese mittels TRFA auf ihren Se-Gehalt hin analysiert.

Die Ergebnisse in Abbildungen 3.17 bestätigen die Hypothese, das Tumorgewebe enthielt in fast allen Fällen etwa doppelt so viel Se bezogen auf die eingewogene Gewebeprobe wie das gesunde Normalgewebe. Es kommt also tatsächlich zu einer Anreicherung des Spurenelements in den Tumoren, unabhängig vom *SepP*-Genotyp oder von der zugeführten Nahrung. Dabei spielte es keine Rolle, an welcher Stelle des Darms das Gewebe entnommen wurde. Über den gesamten Darm verteilt gab es keine signifikanten

Unterschiede im Selengehalt der einzelnen Abschnitte, weder zwischen den Futtergruppen, noch zwischen den Genotypen. Der mittlere Selengehalt eines gesunden Darms liegt bei ca. 0,2 ppm Se, entspricht also den Werten für das Normalgewebe kranker Tiere (eigene Messungen).

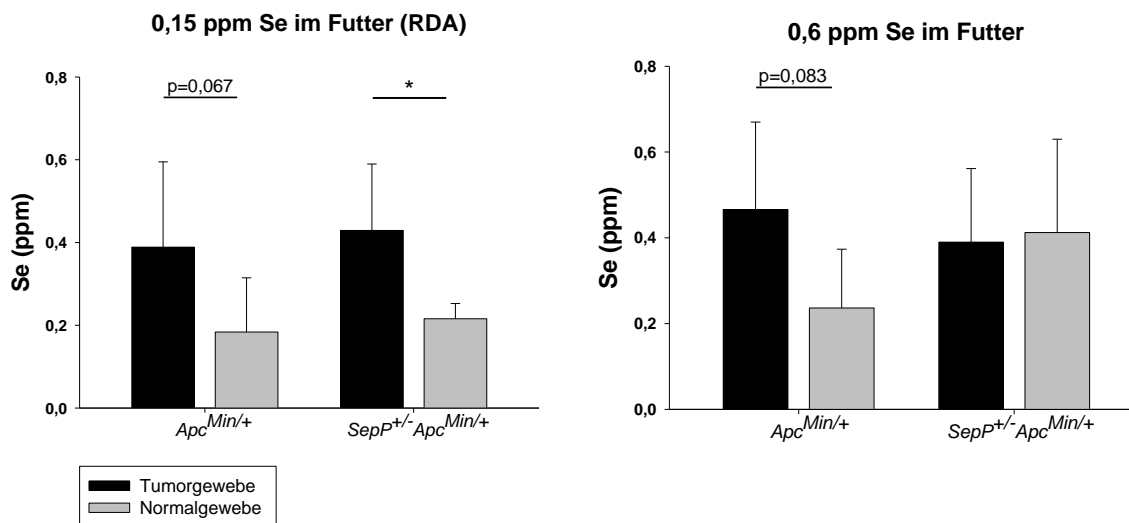


Abb. 3.17: Vergleich des Se-Gehalts von Tumor und Normalgewebe. Der Se-Gehalt wurde mittels TRFA im Tumor und Normalgewebe des Dünndarms von *Apc^{Min/+}*- und *SepP^{+/-}Apc^{Min/+}*-Mäusen, die mit 0,15 ppm Se bzw. 0,6 ppm Se gefüttert wurden, bestimmt. Das Tumorgewebe enthielt außer im Fall der heterozygoten Tiere auf 0,6 ppm Se in der Regel doppelt so viel Se wie das umliegende Normalgewebe. (MW \pm SD, * = p < 0,05, Student's t-Test, n=6 für 0,15 ppm, n=4 für 0,6 ppm)

3.4.2 Molekularbiologische Untersuchungen von Tumorgewebe

In der bereits angeführten Dissertation „Einfluss von Selenoprotein P auf die intestinale Tumorigenese im Mausmodell“ von Marten Michaelis wurden Genexpressionsanalysen isolierter RNA aus Tumor-Pools (8-10 Tumore) durchgeführt, um den Unterschied im Tumorwachstum zwischen *SepP*-wildtypischen und *SepP*-heterozygoten *Apc^{Min/+}*-Mäusen erklären zu können. Gefunden wurde u.a. eine differentielle Expression von Mastzell-spezifischen Genen. Dieses Ergebnis mit Gewebeproben aus oben erläuterten Fütterungsexperimenten konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Es wurde RNA aus in RNAlater konserviertem Gewebe (8-10 Tumore pro Tier) isoliert und für eine Genexpressionsanalyse je drei Tumor-RNA-Proben pro Futter und Genotyp gepoolt. Die Biotinylierung und Hybridisierung auf den Microarray-Chip (GeneChip[®] Mouse Genome 430 2.0 Array, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) wurden von Frau Dr. U. Ungethüm vom Labor für Funktionelle Genomforschung (LFGF) der Charité Berlin vorgenommen. Die Normalisierung der Signale auf zuerst alle Hybridisierungsereignisse

und im Anschluss auf ein Set von *housekeeping*-Genen wurde freundlicherweise von Dr. R. Kuban (LFGF) durchgeführt.

Nach einer Einschränkung auf eine Regulation um mindestens den Faktor 1,5 und einer Gruppierung aller differentiell exprimierter Gene war festzustellen, dass sich die Tumore weder zwischen den Genotyp- noch zwischen den Futtergruppen in der Regulation charakteristischer, tumorrelevanter Signalwege unterschieden.

Im Folgenden wurden dennoch einige bekannte Markergene einer genaueren Untersuchung mittels Real Time-PCR unterzogen, um die Genchip-Daten mit hypothesenbasierten Kandidatengenen zu verifizieren.

Hierzu wurde RNA aus Tumor-Pools von ca. 8-10 Tumoren, die bei -20°C in RNAlater gelagert wurden, wie beschrieben isoliert. Außerdem wurde zum Vergleich auch RNA aus Gewebepulver von gesundem Normalgewebe isoliert, hierfür wurden bei -80°C gelagerte (dritte) Dünndarmabschnitte von gesunden Mäusen herangezogen. Anschließend wurde die RNA in cDNA (iScript™, Bio-Rad) umgeschrieben und pro Gruppe n = 5 Proben in Doppelbestimmung mittels Real Time-PCR im iCycler (Bio-Rad) analysiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms „REST“, die Ergebnisse im Folgenden wurden bezogen auf das gesunde Normalgewebe und normalisiert auf den *housekeeper* β -Aktin und werden angegeben als Zweierlogarithmus (2log) der absoluten Genregulation mit den vom Programm errechneten Signifikanzen.

3.4.2.1 Differentielle Expression von Genen des Wnt-Signalweges

Tabelle 3.1 zeigt die Hochregulierung der Genexpression von β -Catenin und dem nachgeschalteten Transkriptionsfaktor *Tcf* in den Tumoren bezogen auf gesundes Normalgewebe, hervorgerufen durch das mutierte Tumorsuppressorgen *Apc*. Auch die Genexpression von *c-Myc*, einem Transkriptionsfaktor, der Zellproliferation und -differenzierung kontrolliert und u.a. von *Tcf* reguliert wird, war in den Tumoren hochreguliert. Das Ausmaß des Effektes ist in der Tabelle als 2log dargestellt; im Falle von *c-Myc* bedeutet der Wert von 2,39 in der *Apc*^{Min/+}/0,15 ppm Se-Gruppe z.B. eine $2^{2,39} = 5,24$ -fache höhere Genexpression als im Normalgewebe gesunder Se-adäquat versorgter C57Bl/6-Wildtypiere. Es war allerdings kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der Futtergruppen oder Genotypen feststellbar.

	0,15 ppm Se		0,6 ppm Se	
	<i>Apc</i> ^{Min/+}	<i>SepP</i> ^{+/-} <i>Apc</i> ^{Min/+}	<i>Apc</i> ^{Min/+}	<i>SepP</i> ^{+/-} <i>Apc</i> ^{Min/+}
<i>β-Catenin</i>	1,17	1,19*	1,12**	1,12***
<i>Tcf</i>	3,22***	2,06	2,65***	3,08***
<i>c-Myc</i>	2,39*	2,08*	1,89***	1,80***

Tab. 3.1: Differentielle Expression von Genen des Wnt-Signalweges im Tumorgewebe. Vergleich der Genexpression von *Apc*^{Min/+}- und *SepP*^{+/-} *Apc*^{Min/+}-Mäusen, die mit 0,15 ppm Se bzw. 0,6 ppm Se gefüttert wurden, bezogen auf gesundes Darmgewebe Se-adäquat (0,15 ppm Se) versorgter Mäuse. Im Tumorgewebe waren signifikante Unterschiede zum Normalgewebe feststellbar, es gab aber keine Unterschiede beim Vergleich der Genotyp- und Futtergruppen. (n=5/Gruppe, 2log (absolute Genregulation), * = p <0,05, ** = p <0,01, *** = p <0,001)

3.4.2.2 Differentielle Expression von Selenoprotein-Genen

Tabelle 3.2 zeigt eine Reihe von Selenoproteinen, die in den Tumoren im Vergleich zu gesundem Gewebe reguliert wurden. Dabei konnten bereits bekannte Expressionsmuster bestätigt werden. So wurde in allen Gruppen im Tumor *SepP* herunter- und *GPx2* heraufreguliert. *GPx1*, *SelH* sowie *Fabp1* waren ebenfalls heraufreguliert, *SelM* und *Dio1* zeigten eine negative Regulation. Eine Se-abhängige Genregulation, wie sie für *GPx1*, *SelH*, *SelM* und *SelW* an anderer Stelle gezeigt wurde (Kipp, Banning et al. 2009), konnte hier ebenso wenig gezeigt werden wie eine Abhängigkeit vom *SepP*-Genotyp.

	0,15 ppm Se		0,6 ppm Se	
	<i>Apc</i> ^{Min/+}	<i>SepP</i> ^{+/-} <i>Apc</i> ^{Min/+}	<i>Apc</i> ^{Min/+}	<i>SepP</i> ^{+/-} <i>Apc</i> ^{Min/+}
<i>SepP</i>	-3,47	-4,48*	-2,71*	-3,73*
<i>Gpx2</i>	0,94	0,64	0,80*	0,73*
<i>Gpx1</i>	1,81*	1,49***	1,60**	1,64***
<i>SelH</i>	1,87*	1,91*	1,56***	1,52***
<i>SelM</i>	-0,88	-0,79	-0,93	-0,99**
<i>Dio1</i>	-1,86	-2,48*	-1,51	-2,30*
<i>Fabp1</i>	2,93	3,77*	4,52	5,42**

Tab. 3.2: Differentielle exprimierte Selenoproteingene im Tumorgewebe. Vergleich der Genexpression von *Apc*^{Min/+}- und *SepP*^{+/-} *Apc*^{Min/+}-Mäusen, die mit 0,15 ppm Se bzw. 0,6 ppm Se gefüttert wurden, bezogen auf die gesundes Darmgewebe Se-adäquat (0,15 ppm Se) versorgter Mäuse. Im Tumorgewebe waren signifikante Unterschiede zum Normalgewebe feststellbar, es gab aber keine Unterschiede beim Vergleich der Genotyp- und Futtergruppen. (n=5/Gruppe, 2log (absolute Genregulation), * = p <0,05, ** = p <0,01, *** = p <0,001)

Das in der Literatur mit Tumorwachstum in Verbindung gebrachte *Sep15* sowie die in Tumoren aus *Apc*^{Min/+}-Mäusen beschriebenen *SelS* und *SelW* finden sich in diesem Versuchsansatz nicht signifikant reguliert im Vergleich zu gesundem Normalgewebe.

Auch eine Regulation der Genexpression der Thioredoxin-Reduktasen wurde nicht festgestellt (Tabelle 3.3).

	0,15 ppm Se		0,6 ppm Se	
	<i>Apc</i> ^{Min/+}	<i>SepP</i> ^{+/-} <i>Apc</i> ^{Min/+}	<i>Apc</i> ^{Min/+}	<i>SepP</i> ^{+/-} <i>Apc</i> ^{Min/+}
<i>Sep15</i>	0,00	-0,14	-0,22	0,95
<i>SelS</i>	-0,53	-0,60	-0,75	0,25
<i>SelW</i>	0,18	-0,15	0,17	0,18
<i>TxnRd1</i>	0,33	0,25	0,42	0,50
<i>TxnRd2</i>	0,54	0,56	0,40	0,33

Tab. 3.3: Nicht differentielle exprimierte Selenoproteingene im Tumorgewebe. Vergleich der Genexpression von *Apc*^{Min/+}- und *SepP*^{+/-} *Apc*^{Min/+}-Mäusen, die mit 0,15 ppm Se bzw. 0,6 ppm Se gefüttert wurden, bezogen auf gesundes Darmgewebe Se-adäquat (0,15 ppm Se) versorgter Mäuse. Im Tumorgewebe waren hier keine signifikanten Unterschiede feststellbar, weder zum Normalgewebe, noch beim Vergleich der Genotyp- und Futtergruppen. (n=5/Gruppe, 2log (absolute Genregulation))

3.4.2.3 Differentielle Expression von SepP-Rezeptor-Genen

Um zu untersuchen, ob die gezeigte Selenanreicherung im Tumorgewebe durch einen möglicherweise erhöhten Selentransport durch SepP verursacht sein könnte, wurde auch die Expression der bekannten SepP-Rezeptoren *Lrp2* (Megalin) und *Lrp8* (ApoER2) analysiert (Tabelle 3.4). Dabei konnte für *Lrp2* keine signifikante differentielle Genexpression festgestellt werden, wohingegen *Lrp8* in allen Gruppen im Tumorgewebe bezogen auf gesundes Normalgewebe heraufreguliert wurde. Unterschiede, hervorgerufen durch den *SepP*-Genotyp oder den Selengehalt des Futters waren zwar nicht vorhanden, nichtsdestotrotz könnte diese Regulation für die gemessene Se-Anreicherung im Tumor verantwortlich sein.

	0,15 ppm Se		0,6 ppm Se	
	<i>Apc</i> ^{Min/+}	<i>SepP</i> ^{+/-} <i>Apc</i> ^{Min/+}	<i>Apc</i> ^{Min/+}	<i>SepP</i> ^{+/-} <i>Apc</i> ^{Min/+}
<i>Lrp2</i>	-0,15	-0,37	-0,53	-0,03
<i>Lrp8</i>	2,46*	2,39***	2,15***	2,22***

Tab. 3.4: Differentielle Expression von SepP-Rezeptorgenen im Tumorgewebe. Vergleich der Genexpression von *Apc*^{Min/+}- und *SepP*^{+/-} *Apc*^{Min/+}-Mäusen, die mit 0,15 ppm Se bzw. 0,6 ppm Se gefüttert wurden, bezogen auf gesundes Darmgewebe Se-adäquat (0,15 ppm Se) versorgter Mäuse. Im Tumorgewebe zeigte sich nur *Lrp8* signifikant reguliert, es gab aber keine Unterschiede beim Vergleich der Genotyp- und Futtergruppen. (n=5/Gruppe, 2log (absolute Genregulation), * = p < 0,05, *** = p < 0,001)

3.4.2.4 Differentielle Expression von Inflammationsmarker-Genen

Als nächstes wurde die Hypothese geprüft, ob das unterschiedlich starke Wachstum und die unterschiedlich starke Differenzierung der Tumore mit dem Grad der Inflammation zusammenhängen. Daher wurden spezifische Inflammationsmarker untersucht. Die Gene für die beiden Zytokine *Tnfa* und *Il6* zeigten sich in allen Tumoren im Vergleich zu gesundem Gewebe hochreguliert. Auch *Cox2*, verantwortlich für die Produktion von proliferationsfördernden Prostaglandinen, war in allen Gruppen hochreguliert. Vom *SepP*-Genotyp oder dem verabreichten Futter waren diese Regulationen allerdings wieder unbeeinflusst. Nicht signifikant reguliert im Vergleich zu gesundem Gewebe zeigte sich *Tgfβ* (Tabelle 3.5).

	0,15 ppm Se		0,6 ppm Se	
	<i>Apc</i> ^{Min/+}	<i>SepP</i> ^{+/-} <i>Apc</i> ^{Min/+}	<i>Apc</i> ^{Min/+}	<i>SepP</i> ^{+/-} <i>Apc</i> ^{Min/+}
<i>Tnfa</i>	2,42*	2,06*	2,51**	2,49*
<i>Il6</i>	6,08*	5,20*	5,96***	7,73***
<i>Cox2</i>	2,62***	2,79***	2,21**	2,31***
<i>Tgfβ</i>	0,69	0,64	0,16	0,73

Tab. 3.5: Differentielle Expression von Inflammationsmarkergenen im Tumorgewebe. Vergleich der Genexpression *Apc*^{Min/+}- und *SepP*^{+/-} *Apc*^{Min/+}-Mäusen, die mit 0,15 ppm Se bzw. 0,6 ppm Se gefüttert wurden, bezogen auf gesundes Darmgewebe Se-adäquat (0,15 ppm Se) versorgter Mäuse. Im Tumorgewebe waren außer für *Tgfβ* signifikante Unterschiede zum Normalgewebe feststellbar, es gab aber keine Unterschiede beim Vergleich der Genotyp- und Futtergruppen. (n=5/Gruppe, 2log (absolute Genregulation), * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001)

3.4.2.5 Differentielle Expression Mastzell-spezifischer Genen

Aufgrund der bereits mehrfach angeführten Vorarbeiten wurden auch einige Mastzell-spezifische Gene auf ihre mögliche Regulation im Tumor hin analysiert. Hierbei zeigte sich eine deutlich signifikante Hochregulation der Gene für die Mastzell-spezifischen Proteasen 1 und 2 (*Mcpt1* und 2) sowie der Gene für die Carboxypeptidase 3 (*Cpa3*) und für den Mastzell-spezifischen Differenzierungsmarker c-Kit, einem Oberflächenprotein (CD117). Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gen- oder Ernährungsgruppen gab es aber auch in diesem Fall nicht (Tabelle 3.6).

	0,15 ppm Se		0,6 ppm Se	
	<i>Apc</i> ^{Min/+}	<i>SepP</i> ^{+/-} <i>Apc</i> ^{Min/+}	<i>Apc</i> ^{Min/+}	<i>SepP</i> ^{+/-} <i>Apc</i> ^{Min/+}
<i>Mcpt1</i>	8,23***	5,86***	7,65***	8,27***
<i>Mcpt2</i>	8,50***	6,80***	8,02**	8,30***
<i>Cpa3</i>	8,39***	7,08***	8,29**	8,79**
<i>c-Kit</i>	1,45	1,17	1,23**	0,73**

Tab. 3.6: Differentielle Expression Mastzell-spezifischer Gene im Tumorgewebe. Vergleich der Genexpression von *Apc*^{Min/+}- und *SepP*^{+/-} *Apc*^{Min/+}-Mäusen, die mit 0,15 ppm Se bzw. 0,6 ppm Se gefüttert wurden, bezogen auf gesundes Darmgewebe Se-adäquat versorgter Mäuse. Im Tumorgewebe waren signifikante Unterschiede zum Normalgewebe feststellbar, es gab aber keine Unterschiede beim Vergleich der Genotyp- und Futtergruppen. (n=5/Gruppe, 2log (absolute Genregulation), ** = p <0,01, *** = p <0,001)

3.4.3 Histologische Untersuchungen der Darmpräparaten

In den vorangegangenen Experimenten zeigte sich sowohl ein Einfluss des Genotyps, als auch ein Einfluss der Se-Versorgung über die Nahrung auf die intestinale Tumorigenese in *Apc*^{Min/+}-Mäusen. Um der Frage nachzugehen, ob sich diese makroskopischen Unterschiede des unterschiedlich starken Tumorwachstums auch auf mikroskopischer Ebene, also beim Vergleich einzelner Tumore miteinander, widerspiegeln würden, wurden histopathologische Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurden Darm-Paraffinschnitte von aufgerollten dritten Abschnitten des Dünndarms (in diesem Bereich ist generell die Tumorlast am höchsten) verwendet.

Diese Schnitte wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Wilko Weichert pathologisch begutachtet und die Tumore nach dem Grad der Entartung in „gut differenzierte (*low grade*)“ und „schlecht differenzierte (*high grade*)“ Tumore eingeteilt. Letztere zeigen keine klare Gewebestruktur mehr, das Wachstum der Zellen und die Organisation des Epithels ist als eher diffus und ungerichtet zu bezeichnen, der Tumor ist wenig differenziert, also entartet, wohingegen ein gut differenzierter Tumor noch eine klare Gewebestruktur erkennen lässt (Abbildung 3.18).

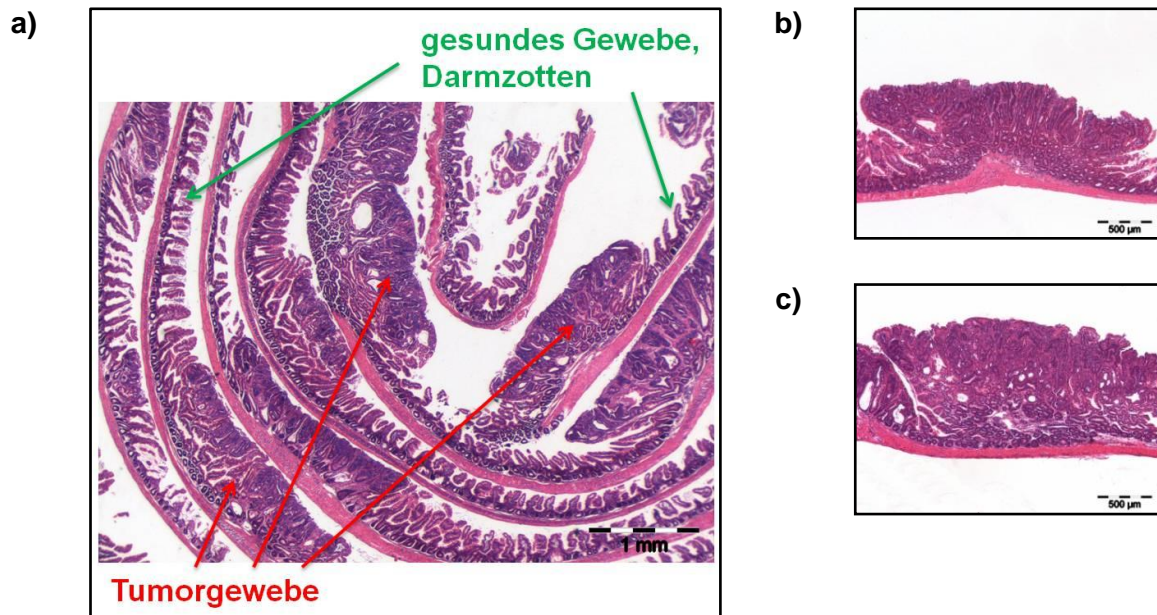


Abb. 3.18: Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines $Apc^{Min/+}$ -Darmschnitts. Beispiel für einen HE-gefärbten 2 μ m Schnitt einer Darm-Swiss-Roll (a). Die Tumore sind deutlich vom gesunden Gewebe unterscheidbar. Einzelne Tumore können so pathologisch begutachtet und in „gut differenziert (*low grade*)“ (b) und „schlecht differenziert (*high grade*)“ (c) Tumore unterteilt werden.

3.4.3.1 Pathologische Begutachtung der Entartung des Tumorgewebes

Pathologisch wurden zunächst die Gesamtzahl aller Tumore in einem Schnitt und danach die Anzahl der entarteten, schlecht differenzierten Tumore bestimmt. Grafisch dargestellt in Abbildung 3.19 ist der mittlere prozentuale Anteil der „schlecht differenzierten“ Tumore pro Schnitt aufgeteilt nach Genotyp und Futter.

Dabei ist ein deutlicher Genotyp-Effekt bei den Se-adäquat versorgten Tieren zu erkennen. In heterozygoten Tieren lag der prozentuale Anteil der entarteten Adenome bei ca. 60%, im Vergleich zu ca. 20% in Wildtyptieren. *SepP*-heterozygote Tiere entwickelten also nicht nur mehr und größere Tumore (siehe 3.1), sondern auch die Entartung schritt schneller voran. Dieser Genotyp-Effekt wurde durch eine Supplementation mit 0,6 ppm Se nahezu aufgehoben, der prozentuale Anteil entarteter Tumore glich hier dem der Se-adäquat versorgten Wildtyptiere. Bei diesen Wildtyptieren war die Se-Konzentration der Nahrung offenbar nicht entscheidend für die Entartung, hier war keinerlei Unterschied erkennbar.

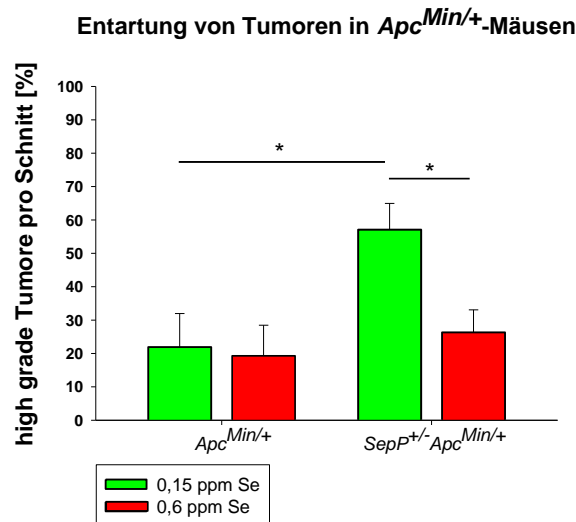


Abb. 3.19: Einfluss von Selen und des *SepP*-Genotyps auf die Tumorentartung. Die histopathologische Begutachtung der HE-gefärbten Darm-Paraffinschnitten aus *Apc^{Min/+}*- und *SepP^{+/-}Apc^{Min/+}*-Mäusen, die mit 0,15 ppm Se bzw. 0,6 ppm Se gefüttert wurden, wurde statistisch ausgewertet. Dargestellt ist der prozentuale Anteil entarteter Adenome bezogen auf die Gesamtumoranzahl pro Schnitt. Bei Se-adäquat versorgten Tieren war ein signifikanter Effekt des Genotyps zu beobachten, der durch eine Se-Supplementation ebenso signifikant wieder verringert wurde. (MW \pm SD, * = $p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test, $n=6$ bzw. 7 (*SepP^{+/+}*), $n=8$ (*SepP^{+/-}*))

3.4.3.2 Nachweis von Mastzellen im Tumorgewebe

Bereits 2008 konnte Marten Michaelis in einem Vorversuch zeigen, dass Mastzellen in den Tumoren von *Apc^{Min/+}*-Mäusen nachgewiesen werden können. Mastzellen gehören zu den prominentesten Immunzellen, die in Tumorgewebe einwandern. Dabei wird ihnen eine eher das Tumorstadium fördernde Rolle zugeschrieben, da sie zum einen Proteasen produzieren, die die extrazelluläre Matrix angreifen, zum anderen, weil sie Wachstumsfaktoren und Zytokine ausschütten können, die u.a. zur Aktivierung der Angiogenese führen (Ribatti and Crivellato 2011). Daher erschien es sinnvoll, eine mögliche Mastzellinvasion im Hinblick auf die unterschiedlich starke Entartung der Tumore vor allem bei *SepP*-heterozygoten Tieren zu untersuchen. Die Analyse mittels Real Time-PCR zeigte zwar keine unterschiedliche Regulierung Mastzell-spezifischer Gene innerhalb der einzelnen Gruppen, dennoch waren gerade die Mastzellproteasen von allen untersuchten Genen die am stärksten herauf regulierten.

Von 2 μ m dicken Darmparaffinschnitten wurden Chloracetatesterase-Färbungen angefertigt. Diese Färbemethode weist ein Enzym nach, das spezifisch ist für Mastzellen sowie neutrophile Granulozyten. Durch diese Färbung erscheinen die nachzuweisenden Zellen rot vor blauem Hintergrund. Die Schnitte wurden am Mikroskop Axioskop 2 ausgewertet. Mit Hilfe der zugehörigen Software *Axiovision* konnten die Flächen der Tumore ermittelt und so die Anzahl der positiven Zellen pro Tumor bzw. pro Tumorfächeneinheit gezählt werden. Dabei wurde ein signifikanter Unterschied zwischen

den Genotypen deutlich. Sowohl die *SepP*-heterozygoten *Apc*^{Min/+}-Mäuse, die Se-adäquat versorgt wurden, als auch die supplementierten Tiere gleichen Genotyps wiesen eine etwa doppelt so hohe Anzahl an Mastzellen auf als die entsprechenden Kontrolltiere. Ein durch die Supplementation hervorgerufener Effekt ließ sich allerdings nicht feststellen (Abbildung 3.20).

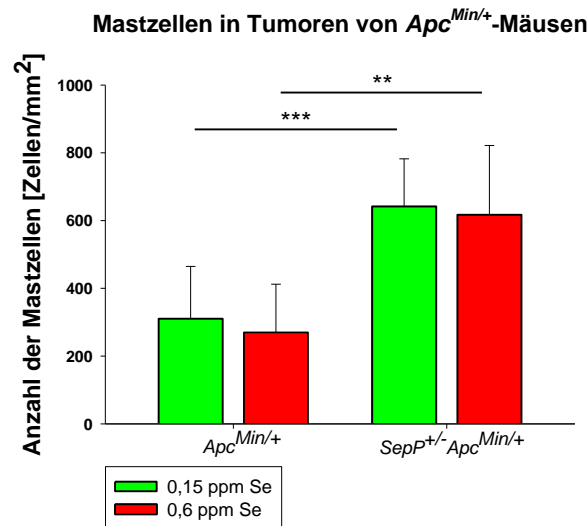
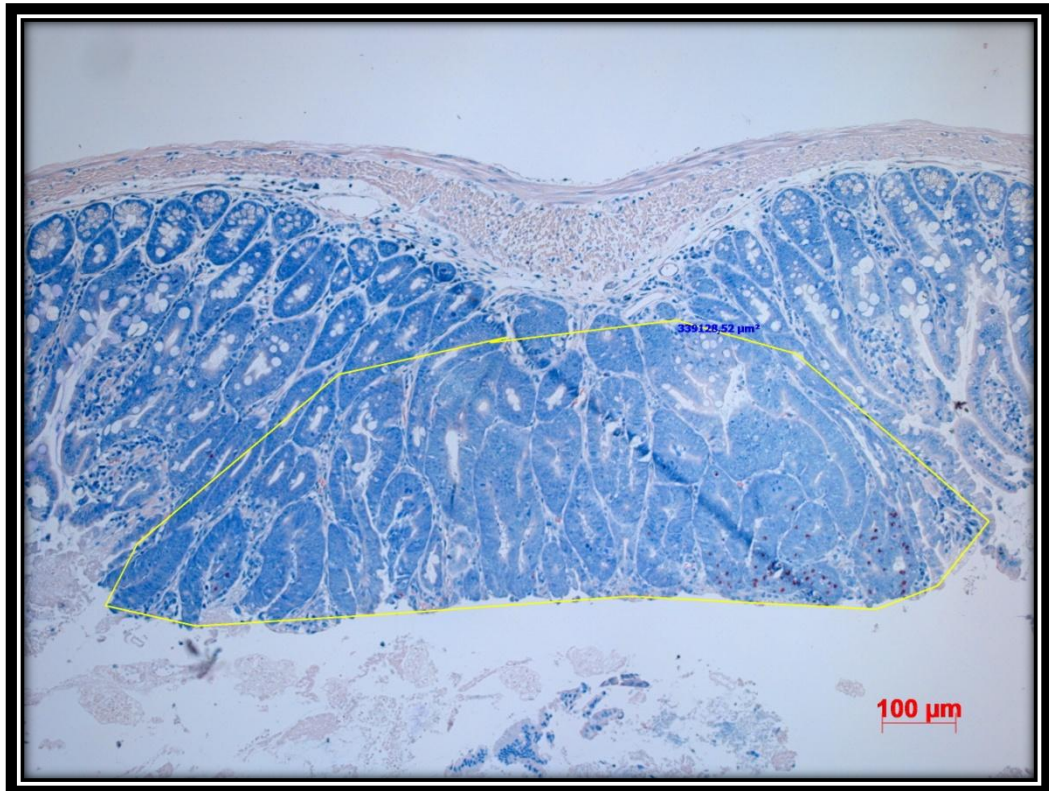


Abb. 3.20.: Anzahl von Mastzellen pro Tumorfläche in *Apc*^{Min/+}-Mäusen. Dargestellt ist die Auswertung der Chloracetatesterase-Färbungen. In *SepP*^{+/-} *Apc*^{Min/+}-Mäusen, die mit 0,15 ppm bzw. 0,6 ppm Se gefüttert wurden, war gleichermaßen eine signifikant höhere Anzahl von Mastzellen im Gegensatz zu den entsprechenden *SepP*-Wildtypen zu beobachten. (MW ± SD, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001, Student's t-Test, n=5 (*SepP*^{+/+}) und n=10 (*SepP*^{+/-}) für 0,15 ppm, n=8 bzw. n=9 für 0,6 ppm)

Auf den nachfolgenden Seiten sind repräsentative Abbildungen der Chloracetatesterase-Färbungen dargestellt. Mastzellen sind durch enzymatische Umwandlung des Pararosanilinfarbstoffes rot angefärbt, das umliegende Gewebe erscheint durch eine Toluidinblau-Gegenfärbung blau. Gelb umrandet ist die Fläche des Tumors, in der die Mastzellanzahl bestimmt wurde. Abbildung 3.21 zeigt Tumore aus Se-adäquat ernährten Mäusen, während Abbildung 3.22 Tumore aus Se-supplementierten Tieren zeigt. In beiden Fällen ist deutlich zu erkennen, dass jeweils in den Tumoren der *SepP*-heterozygoten *Apc*^{Min/+}-Mäuse etwa doppelt so viele Mastzellen pro Fläche in das Gewebe eingewandert sind als bei den entsprechenden Wildtyptieren.

a)

Apc^{Min/+}



b)

SepP^{+/-}
Apc^{Min/+}

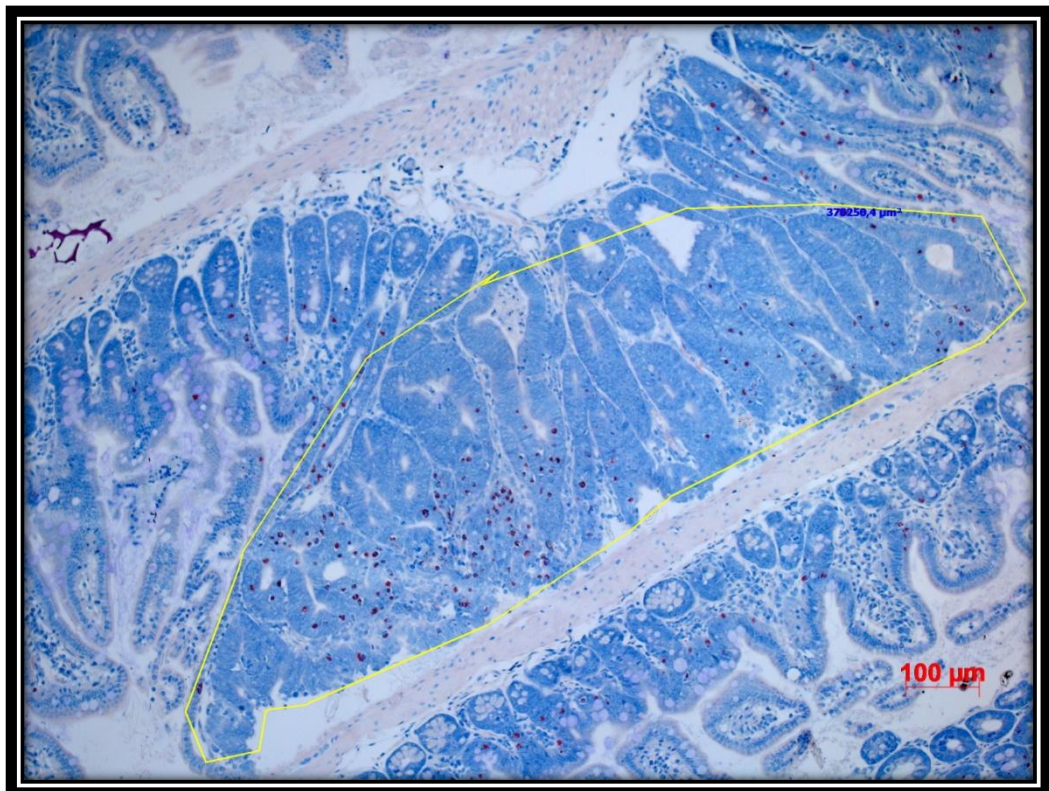


Abb. 3.21: Chloracetatesterase-Färbung von Darmparaffinschnitten Se-adäquat ernährter *Apc*^{Min/+}-Mäuse. Tumor einer *Apc*^{Min/+}-Maus (a) und einer *SepP*^{+/-}*Apc*^{Min/+}-Maus (b), die mit 0,15 ppm Se gefüttert wurden. Mastzellen heben sich rot gefärbt vor blauem Hintergrund ab.

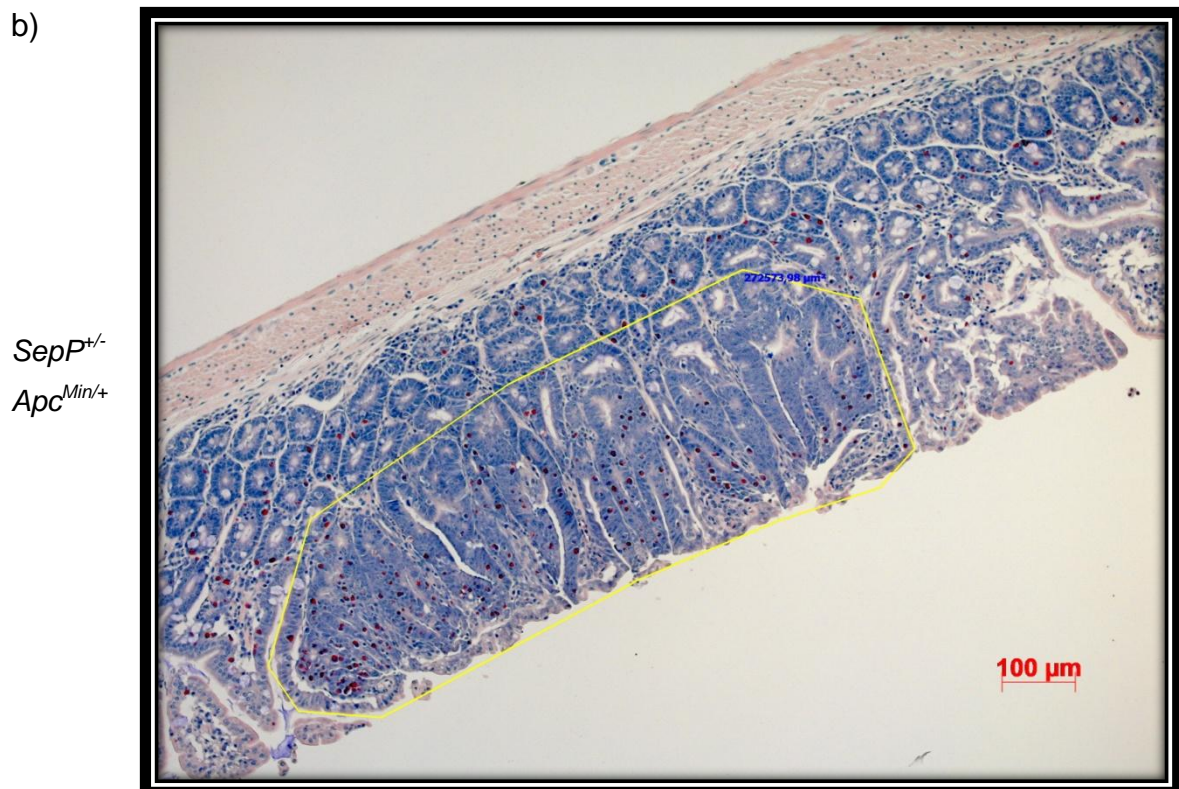
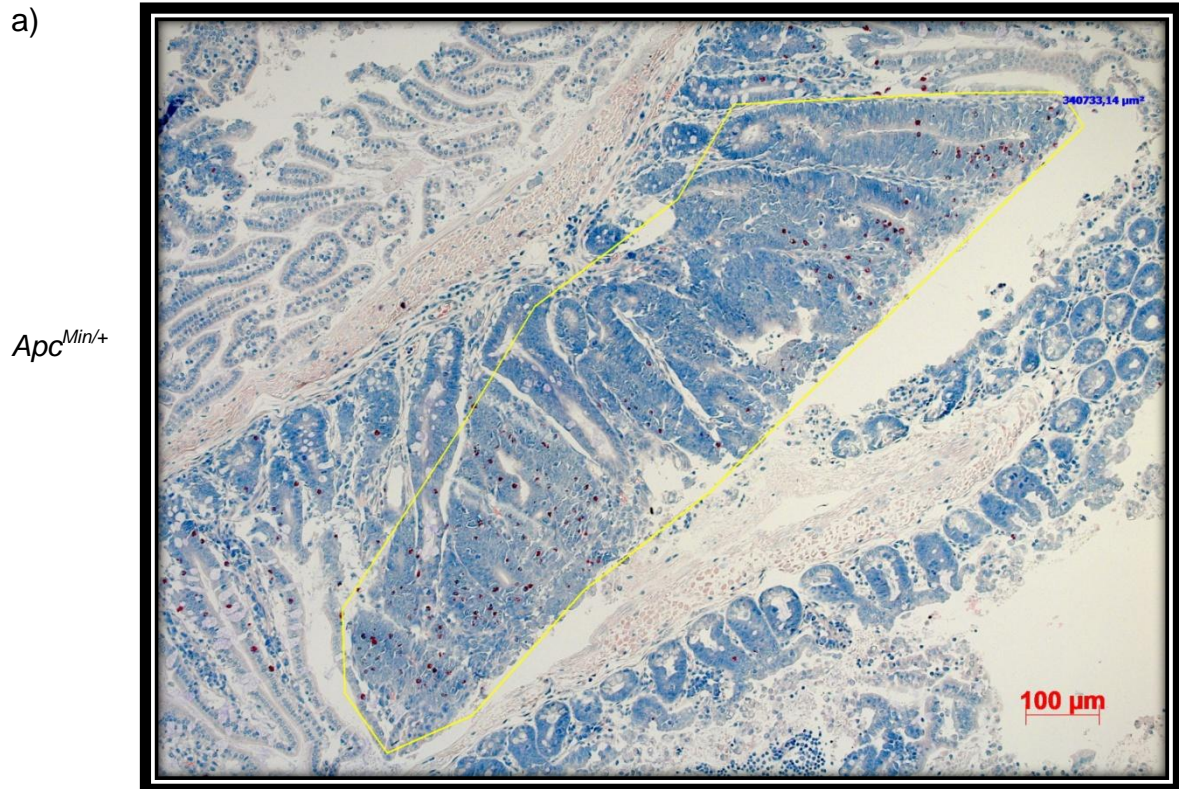
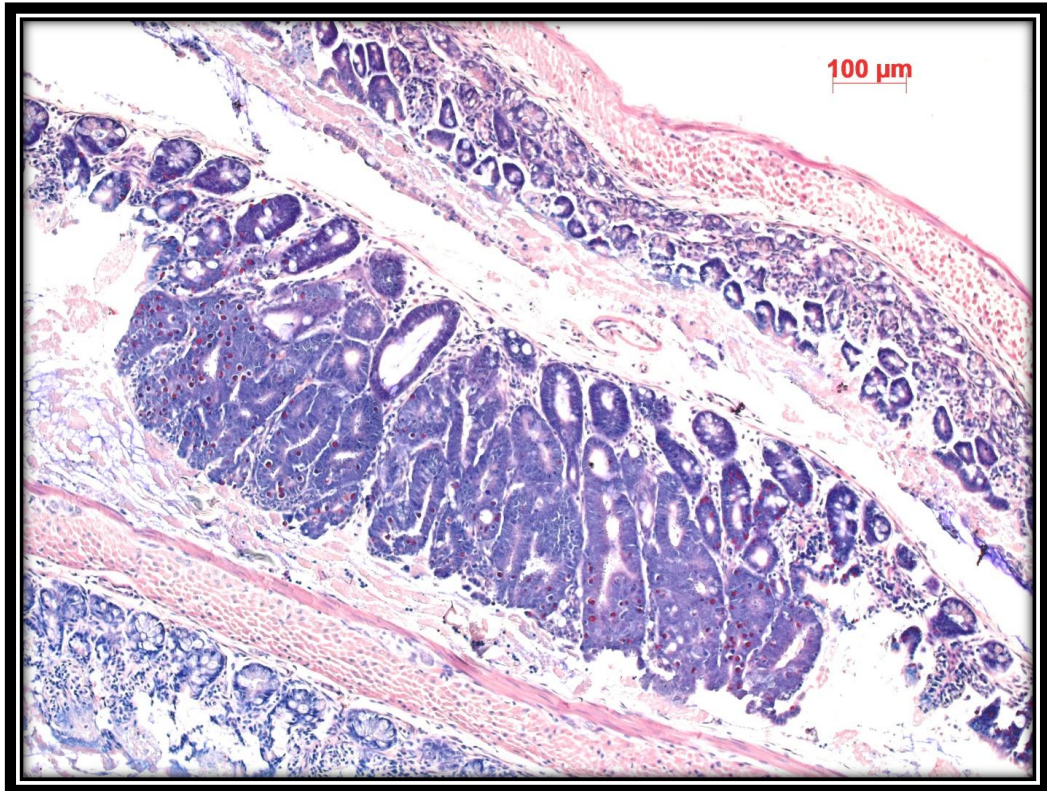


Abb. 3.22: Chloracetatesterase-Färbung von Darmparaffinschnitten Se-supplementierter *Apc^{Min/+}*-Mäuse. Tumor einer *Apc^{Min/+}*-Maus (a) und einer *SepP^{+/-} Apc^{Min/+}*-Maus (b), die mit 0,6 ppm Se supplementiert wurden. Mastzellen heben sich rot gefärbt vor blauem Hintergrund ab.

Wie bereits oben angeführt, werden auch neutrophile Granulozyten durch die Chloracetatesterase-Färbung nachgewiesen. Zum eindeutigen Nachweis einer spezifischen Mastzellfärbung, wurden Serienschnitte von Darmparaffinpräparaten angefertigt, um jeweils einen Schnitt mittels Chloracetatesterase-Färbung und den folgenden mit einem fluoreszenzmarkierten anti-CD117-Antikörper zu färben. CD117 (c-Kit) ist ein Oberflächenprotein hämatopoetischer Stammzellen. Es ist ein Zytokin-Rezeptor für den Mastzell-Wachstumsfaktor (auch Stammzellofaktor, SCF), der entscheidend ist für die Zelldifferenzierung. Unter anderem dient er als Marker für Mastzellen der Haut und des Verdauungstraktes.

In Abbildung 3.23 sind beispielhaft zwei solche Serienschnitte dargestellt. Es ist klar zu erkennen, dass die Verteilung der Zellen, die durch den fluoreszenzmarkierten CD117-Antikörper angefärbt wurden, nahezu identisch ist mit den durch die Chloracetatesterase nachgewiesenen Zellen. Es wurden insgesamt fünf Serienschnitte pro Gruppe (je zwei Genotyp- und Futtergruppen, also insgesamt $n = 20$ Serienschnittpaare) angefertigt und gefärbt. Stichprobenweises Auszählen ergab, dass sich auch die Zellzahlen pro Tumorphäche bei beiden Färbungen nicht unterschieden.

a)



b)

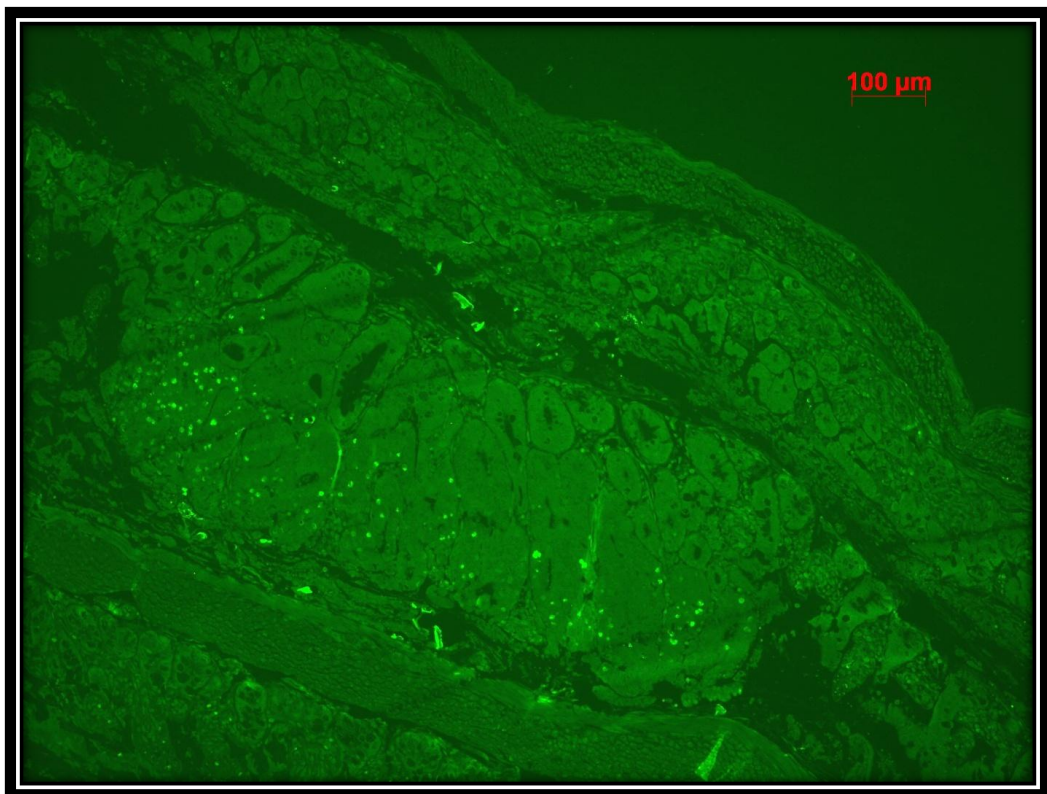


Abb. 3.23: Vergleich der Chloracetatesterase-Färbung mit der CD117-Immunhistologie. Gegenübergestellt sind zwei Arten des Mastzellnachweises durch (a) eine Chloracetatesterase-Färbung und (b) eine CD117-Immunhistologie im 2 μm Serienschnitt. Die Verteilung der Zellen sowie die Zellzahlen stimmten bei beiden Verfahren überein (repräsentatives Ergebnis für n = 20 Serienschnittpaare).

3.5 Nachweis von Zytokinen im Serum von $Apc^{Min/+}$ -Mäusen

Die erhöhte Mastzellinvasion in Tumore $SeppP$ -heterozygoter $Apc^{Min/+}$ -Tieren legte Unterschiede in der Immunantwort gegen die Krebserkrankung nahe. Daher wurden in einem Multiplex/Lincoplex-Ansatz gleichzeitig die Konzentrationen der Zytokine Il10, Il6, Tnfa und Mcp1 im Serum, das den Mäusen bei der Präparation entnommen wurde, bestimmt. Für diesen Versuch wurden jeweils 8 Seren pro Genotyp- und Futtergruppe, sowie 9 Seren gesunder Tiere (C57Bl/6) verwendet und nach Herstellerprotokoll im Luminex vermessen.

Die Konzentrationen von Il10 und Mcp1 unterschieden sich in den erkrankten Tieren weder untereinander, noch von den gesunden Kontrolltieren. Für Tnfa war zwar ein signifikanter Unterschied zwischen $Apc^{Min/+}$ -Mäusen und Kontrolltieren nachweisbar, allerdings unterschieden sich diese untereinander ebenfalls nicht. Nur für das Zytokin Il6 konnte neben einem hoch signifikanten Unterschied aller $Apc^{Min/+}$ -Tiere zu den gesunden Kontrollen zusätzlich ein signifikanter Unterschied zwischen Se-adäquat ernährten $Apc^{Min/+}$ - und $SeppP^{+/-} Apc^{Min/+}$ -Mäusen festgestellt werden, bei den supplementierten Tieren zeigte sich dieser Unterschied tendenziell.

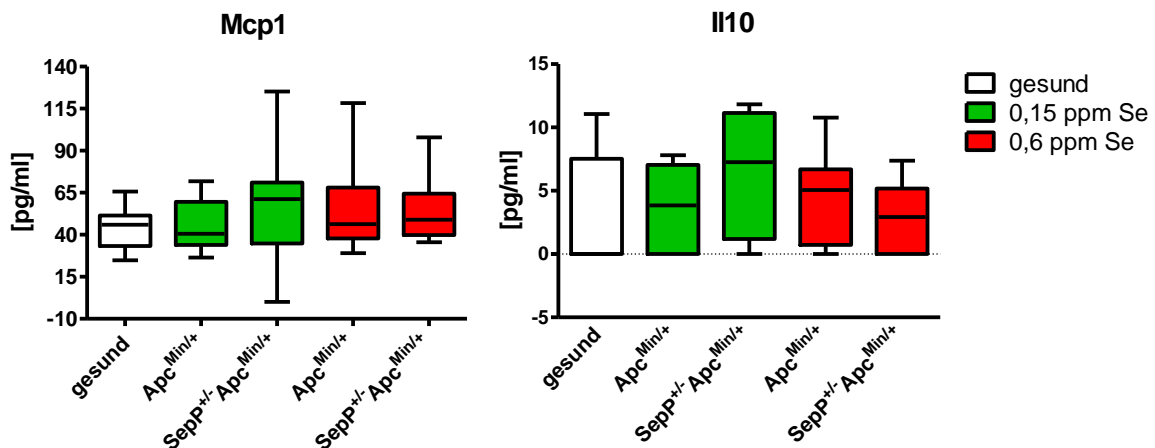


Abb. 3.24: Serumkonzentrationen von Mcp1 und Il10 im Serum von $Apc^{Min/+}$ -Mäusen. Mcp1 und Il10 wurden mittels Luminex-Messung im Serum von $Apc^{Min/+}$ - und $SeppP^{+/-} Apc^{Min/+}$ -Mäusen, die 120 Tage mit 0,15 ppm Se (grün) bzw. 0,6 ppm Se (rot) gefüttert wurden, bestimmt. In keiner der Gruppen zeigten sich Unterschiede zu gesunden Kontrolltieren (n = 8-9).

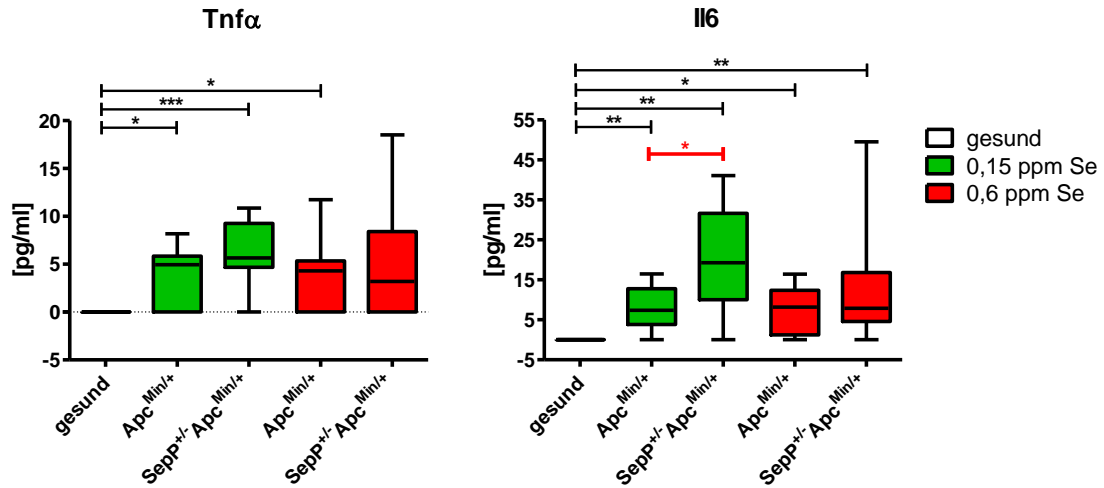


Abb. 3.25: Serumkonzentrationen von Tnfa und Il6 im Serum von $Apc^{Min/+}$ -Mäusen. Tnfa und Il6 wurden mittels Luminex-Messung im Serum von $Apc^{Min/+}$ - und $SepP^{+/+}Apc^{Min/+}$ -Mäusen, die 120 Tage mit 0,15 ppm Se (grün) bzw. 0,6 ppm Se (rot) gefüttert wurden, bestimmt. Neben signifikanten Unterschieden von erkrankten Tieren zu den entsprechenden gesunden Kontrolltieren zeigte sich eine signifikante Erhöhung von Il6 im Serum von Se-adäquat versorgten $SepP$ -heterozygoten Tieren. Bei entsprechenden supplementierten Tieren war dieser Unterschied nur tendenziell zu erkennen. (n = 8-9, * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001, Student's t-Test)

Fazit: Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass eine Se-Supplementation ab Tag 21, im Gegensatz zu den getesteten Selen- oder Sulindac-Therapiestrategien nach bereits begonnener Bildung intestinaler Neoplasien nach 60 Tagen, einen signifikanten Einfluss auf die Tumorigenese im Dünndarm der $Apc^{Min/+}$ -Mäuse hatte, gemessen an den Tumorzahlen und Tumorgrößen nach 120 Tagen. Die Supplementation konnte auch den genetisch bedingten Nachteil eines eingeschränkten Se-Metabolismus in $SepP$ -heterozygoten $Apc^{Min/+}$ -Mäusen, der sich durch ein stärkeres Tumorwachstum manifestierte, verringern. Im Falle dieser Tiere konnte zudem eine höhere Entartung des Tumorgewebes nachgewiesen werden, die durch eine Se-Supplementation ebenfalls vermindert wurde. Transkriptionsanalysen machten deutlich, dass sich die Tumore aus den unterschiedlichen Genotyp- und Futtergruppen genetisch nicht unterschieden. Dennoch zeigten Tumore aus $SepP$ -heterozygoten Tieren eine doppelt so hohe Anzahl an in das Gewebe eingewanderten Mastzellen und einen erhöhten Il6-Spiegel im Serum.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Spurenelements Selen und des *SepP*-Genotyps auf die intestinale Tumorigenese im *Apc^{Min/+}*-Mausmodell untersucht. Wie bereits einleitend dargestellt hat das Selen geschichtlich betrachtet einen positiven Wandel durchgemacht vom Kanzerogen zu einem protektiven Element. Zwar diskutieren neuere Studien auch mögliche Nachteile einer erhöhten Selenaufnahme, wie z.B. ein erhöhtes Diabetes-Risiko, was letztlich sogar zum Abbruch der SELECT-Studie geführt hat (Lippman, Klein et al. 2009), dennoch sind gerade die chemopräventiven Eigenschaften von Selen vielfach nachgewiesen. Besonders positive Effekte zeigten sich hierbei auf humane Lungen-, Prostata- und Darmkrebserkrankungen (Combs, Clark et al. 2001). Darmkrebs ist nach Prostatakrebs bei Männern und Brustkrebs bei Frauen die häufigste Krebserkrankung, an der immer noch ein Großteil der Betroffenen stirbt (Krebsregisterdaten des Robert Koch-Instituts für 2006). Daher schien das *Apc^{Min/+}*-Mausmodell geeignet, um die erwarteten protektiven Eigenschaften des Selens zu untersuchen und mögliche Mechanismen zur Wirkungsweise bei Darmkrebserkrankungen aufzuklären.

Aktuelle Studien zeigen zudem, dass auch eine genetische Prädisposition eine wichtige Rolle bei der Beurteilung des individuellen Krebsrisikos spielen könnte. SNPs in verschiedenen Selenoproteingen konnten mit einem erhöhten bzw. erniedrigten Risiko für bestimmte Tumorerkrankungen assoziiert werden. Besonders interessant für diese Arbeit war dabei die Assoziation eines SNPs im Selenoprotein P-Gen mit erhöhtem Darmkrebsrisiko (Peters, Chatterjee et al. 2008).

Die etablierte hauseigene heterozygote *SepP*-Maus stellt ein gut geeignetes Modell dar, die Auswirkungen eines genetisch bedingten eingeschränkten Se-Metabolismus zu untersuchen. *SepP^{+/-}*-Mäuse sind gesund und phänotypisch unauffällig, verfügen aber, bedingt durch einen verringerten Se-Transport durch *SepP*, über geringere Se-Konzentrationen im Blut und den peripheren Organen. Dadurch bedingt ist auch die lokale Expression von Selenoproteinen, wie Gluthation-Peroxidasen oder Thioredoxin-Reduktasen eingeschränkt (Schomburg, Schweizer et al. 2003). Dieses Maus-Modell wurde für diese Arbeit erfolgreich mit dem etablierten Maus-Tumormodell der *Apc^{Min/+}*-Maus verkreuzt, um der Theorie nachzugehen, dass der mögliche Risikofaktor des *SepP*-Gendefekts (bzw. der Effekt eines SNPs beim Menschen) durch eine Se-Supplementation kompensiert und somit das Risiko für eine Darmkrebserkrankung vermindert werden könnte.

Die Tiere wurden nach dem Absetzen von der Mutter bis zu einem definierten Tötungszeitpunkt von 120 Tagen mit drei verschiedenen Se-Konzentrationen (0,08 bzw. 0,15 bzw. 0,6 ppm) gefüttert. Diese Versuchsdauer erlaubte durch bereits fortgeschrittene Tumorigenese ein makroskopisches Auswerten von Tumorzahlen und -größen, ohne den Tieren unnötiges Leiden zuzumuten, wie z.B. die Komplikation eines Darmverschlusses bei fortschreitendem Alter, der allerdings bei unseren Arbeiten durch die gewählten Bedingungen bei keinem der Versuchstiere zu beobachten war.

Die Analyse eines kompletten *SepP*-Knockouts auf die intestinale Tumorigenese wäre ebenfalls interessant und wünschenswert gewesen, war aber aufgrund der Schwere des *SepP*^{-/-}-Phänotyps nicht möglich. Im Gegensatz zu den gesunden heterozygoten Tieren, versterben diese Tiere bereits nach etwa 40-60 Tagen, einem Zeitpunkt, zu dem im Darm von *Apc*^{Min/+}-Mäusen zwar bereits eine Bildung von Neoplasien stattgefunden hat, diese aber noch nicht so weit fortgeschritten wären, um eine vergleichende makroskopische Analyse zu ermöglichen.

4.1 Einfluss des *SEPP*-Genotyps auf die Tumorigenese

4.1.1 *SEPP*-Konzentrationen im Blut

Beim Vergleich der Konzentrationen von im Blutkreislauf zirkulierendem *SEPP* zwischen Krebspatienten und gesunden Kontrollen konnten wir bereits einen Zusammenhang nachweisen. Bei Prostatakrebs-Patienten war der Serum-*SEPP*-Gehalt deutlich niedriger als bei gesunden Kontrollen und zeigte eine Abhängigkeit von der Schwere der Erkrankung (Meyer, Hollenbach et al. 2009), die mit dem Gleason-Score (GS) angegeben wird, der ein Maß für die Entartung des malignen Gewebes ist (GS<7: gut bis mittelgradig differenziert, GS>=7: mittelgradig bis schlecht differenziert).

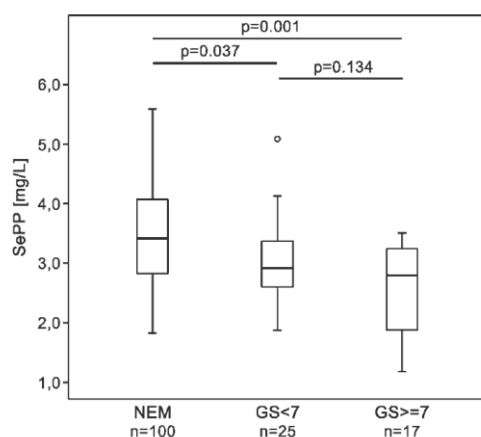


Abb. 4.1: Serum-*SEPP*-Konzentrationen bei Prostatakrebspatienten und gesunden Kontrollen. Bei Erkrankten war die *SEPP*-Konzentration im Serum signifikant erniedrigt, dies ging tendenziell mit der Schwere der Erkrankung einher. p-Werte wie angegeben, Mann-Whitney-U-Test, GS = Gleason Score, NEM = „no evidence of malignancy“ = kein bösartiger Tumor (aus (Meyer, Hollenbach et al. 2009)).

Bei Nierenkrebserkrankungen haben wir diesen Zusammenhang ebenfalls beobachtet; da es sich hier um eine retrospektive Analyse der Serumproben vom Diagnosezeitpunkt handelte, konnten wir die SEPP-Konzentrationen auch mit dem Überleben vergleichen. Dabei stellte sich heraus, dass SEPP auch mit dem Mortalitätsrisiko in diesen Tumorpatienten korreliert (Meyer, Endermann et al., Manuskript in Vorbereitung). Inwieweit dieser erniedrigte SEPP-Status aber als Prädisposition oder als Folge der Erkrankung einzuordnen ist, kann über solche Analysen nicht geklärt werden. Deshalb haben wir diese Fragestellung im Mausmodell untersucht.

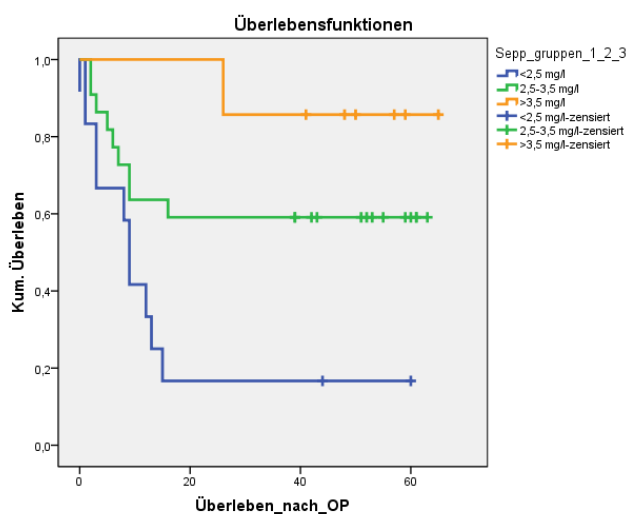


Abb. 4.2: Überlebensrate von Patienten mit Nierenzellkarzinom in Abhängigkeit zur Serum-SEPP-Konzentration. Gezeigt ist das Überleben von Patienten mit Serum-SEPP Konzentrationen von <2,5 mg/l (blau) bzw. 2,5-3,5 mg/l (grün) bzw. >3,5 mg/l (orange). Eine geringe SEPP-Konzentration war assoziiert mit einer deutlich verkürzten Überlebensrate $p = 0,005$, Logrank-Test (Mantel-Cox) (aus (Meyer, Endermann et al., Manuskript in Vorbereitung)).

4.1.2 SEPP-mRNA im Gewebe

Eine Herunterregulation von SEPP-mRNA im Tumorgewebe ist ebenfalls mehrfach gezeigt worden (Al-Taie, Uceyler et al. 2004) und konnte auch in dieser Arbeit durch Real Time-PCR-Analysen in allen Genotyp- und Futtergruppen festgestellt werden (wobei keine Unterschiede zwischen den Gruppen auftraten). Dieser lokale Effekt könnte durch Mediatoren im Tumormilieu verursacht werden, da *in vitro* eine negative Regulation des SEPP-Promotors durch Zytokine gezeigt wurde (Dreher, Jakobs et al. 1997). So hemmt z.B. das antiinflammatorische Zytokin TGF β die SEPP-mRNA- bzw. Proteinsynthese in HepG2-Zellen (humanen Leberzelllinie) (Mostert, Dreher et al. 1999). Außerdem verringern auch die proinflammatorischen Zytokine TNF α , IFN γ sowie IL1 β die SEPP-Promotoraktivität und -Expression in dergleichen Leberzelllinie (Hesse-Bahr, Dreher et al. 2000). Es stellt sich die Frage, ob die zuvor beschriebene reduzierte Konzentration des zirkulierenden Serum-SEPPs auch durch diese Zytokin-vermittelte Regulation der Transkription erklärt werden kann. Da die Leber das zentrale Organ für die SEPP-Synthese ins Blut darstellt, könnten tumorbedingte inflammatorische Zytokine hier tatsächlich eine verringerte Expression von SEPP verursachen und damit zu den oben beobachteten geringen Serumkonzentrationen beitragen. Diese Hypothese wurde im

Mausmodell in dieser Arbeit anhand der Luminex-Messungen von Tnf α , Mcp1, Il10 und Il6 überprüft. Zumindest im Fall von Il6 konnte dabei eine signifikante Erhöhung im Serum erkrankter Tiere nachgewiesen werden, allerdings nur im Fall der *SepP*-heterozygoten, Se-adäquat versorgten Tiere, so dass diese Hypothese noch einer genaueren Betrachtung bedarf.

Dass umgekehrt eine reduzierte SEPP-Expression, bedingt durch einen unvorteilhaften Genotyp, die Tumorigenese begünstigt, konnte bisher nur aus SNP-Analysen gefolgert werden. Humane Gensequenzanalysen legen eine individuelle Prädisposition gegenüber Krebserkrankungen durch unterschiedliche *SEPP*-Varianten nahe.

Mit dieser Arbeit konnte erstmals im Tiermodell ein direkter kausaler Einfluss der genetisch bedingten reduzierten SepP-Expression (über den Verlust eines *SepP*-Allels) auf das intestinale Tumorstadium bei definierter Se-Aufnahme gezeigt werden.

SepP-heterozygote *Apc*^{Min/+}-Mäuse zeigten im Vergleich zu wildtypischen *Apc*^{Min/+}-Tieren eine deutlich verstärkte Tumorigenese bei gleicher, adäquater Se-Konzentration in der Nahrung. Dies zeigte sich bei einer ähnlichen Tumoranzahl durch eine Verschiebung hin zu größeren Tumoren. Das könnte einerseits in einer früheren Tumorentstehung oder aber durch ein verbessertes Wachstum begründet sein. Für ein schnelleres Tumorstadium spricht dabei die Tatsache, dass histopathologische Untersuchungen zusätzlich eine höhere Dedifferenzierung, d.h. ein schnelleres Entarten des Tumorgewebes, in *SepP*^{+/-} *Apc*^{Min/+}-Tieren zeigten. Als messbarer Parameter des eingeschränkten Se-Metabolismus wurden die Serum-Se-Konzentrationen bestimmt, die im Vergleich zu Wildtyptieren um die Hälfte reduziert waren. Dies legt die Übertragbarkeit auf humane genetische Prädispositionen nahe, bei denen SNPs ebenfalls für eine eingeschränkte Selenverwertung mit reduzierter SEPP-Expression verantwortlich gemacht werden konnten.

4.2 Einfluss des Se-Gehalts der Nahrung auf die Tumorigenese

Generell ist ein potentiell chemopräventiver Effekt von Selen auf das Krebsrisiko nicht nur in humanen Studien, sondern auch in *in vitro* und *in vivo* Studien beobachtet worden. Dazu gehören u.a. auch tierexperimentelle Studien mit *Apc*^{Min/+}-Mäusen (Rao, Cooma et al. 2000; Davis, Zeng et al. 2002). In der erstgenannten wurde einer fettreichen Diät die synthetische Se-Verbindung p-XSC (1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate) in verschiedenen Konzentrationen zugemischt, bei letzterer wurde dem Nagerfutter getrockneter und pulverisierter Brokkoli, der mit in der Nahrung eher selten vorkommendem Na-Selenat angereichert war, zugesetzt. Informationen zum Se-Gehalt

des Basis-Futters fehlen dabei bei beiden Studien, so dass der Se-Status der Tiere undefiniert blieb. Es wurden zwar signifikante Reduktionen der Tumorzahlen im Dünndarm der Mäuse gezeigt, allerdings wurde in keiner der beiden Studien eine Abhängigkeit von Selenoprotein-Genotypen untersucht. Zudem wurden in beiden Fällen ausschließlich männliche Tiere verwendet, die bereits 5 bzw. 6 Wochen alt waren, ein Alter in dem bei *Apc^{Min/+}*-Tieren für gewöhnlich bereits die Bildung von Neoplasien einsetzt, ein Se-Effekt auf die Tumorentstehung also möglicherweise nicht nachzuweisen ist.

Eine Besonderheit der vorliegenden Arbeit dagegen liegt in dem sauberen Versuchsdesign, der ausreichend großen Gruppenstärke und der genauen Analytik verschiedenster Biomarker.

Zunächst wurde Natriumselenit für die Supplementation gewählt. Das liegt darin begründet, dass bei dieser Selenform das Se über die Metabolisierung zu Dihydrogenselenid (H_2Se) direkt für die Biosynthese von Selenoproteinen, also auch von SEPP, verwendet wird. Eine Supplementation mit SeMet dagegen, das ebenfalls häufig in humanen und tierexperimentellen Studien verwendet wird, führt zwar zu einer Erhöhung des Gesamt-Se-Spiegels, hat aber durch den ungerichteten Einbau in wachsende Polypeptidketten nur einen indirekten Einfluss auf die Selenoprotein-Synthese. Na-Selenit wird bis zum Erreichen der maximalen SEPP-Expression verstoffwechselt, danach wird überschüssiges Selenit über die bereits beschriebenen Wege ausgeschieden. Diese Besonderheit im Vergleich zu SeMet erlaubt in unserem Versuchsdesign die beobachteten Effekte direkt auf Selenoproteine zurückzuführen und deren Konzentration direkt über die Messungen von Serumproben zu kontrollieren. SeMet könnte im Selenstoffwechsel in einer durch die γ -Lyase katalysierten Reaktion auch Methylselenid generieren. Solche methylierten Selenformen stehen in Verdacht, direkte chemopräventive Effekte auszuüben (Ip and Ganther 1990). Um unser Versuchsdesign zur Analyse der Selenoprotein-vermittelten Effekte nicht durch zwei schwer voneinander trennbare Mechanismen zu stören, wurde nur Na-Selenit verwendet.

Dann ist es wichtig anzuführen, dass die für die Mäuse verwendeten Na-Selenit-Konzentrationen direkt auf den Menschen übertragbar sind. Bei einem Se-Gehalt von 0,15 ppm erhielten die Tiere - ca. 5 g Nahrungsaufnahme/Tag und ein Körpergewicht von ca. 25 g vorausgesetzt - theoretisch 1,2 μg Se/kg Körpergewicht/Tag. Dies entspricht der empfohlenen Tagesdosis für Menschen, die bei etwa 55 μg (Frauen) bis 70 μg (Männer) pro Tag liegt. Für eine chemopräventive Supplementation werden in der Regel 200 μg Se/Tag, also etwa das Vierfache der empfohlenen Dosis, eingesetzt. Ähnlich wurden in dieser Arbeit auch die Mäuse behandelt (0,15 ppm x 4 = 0,6 ppm).

Überdies wurde neben der parallelen Analyse des *SepP*-Genotyps und der Frage, inwieweit sich eine als nachteilig erwiesene genetische Veranlagung durch eine Se-Supplementation kompensieren lässt, auch eine therapeutische Intervention auf angelegte Tumore durch eine Hochselendiät getestet.

Dabei ist zunächst einmal hervorzuheben, dass in beiden Fällen, sowohl bei *Apc^{Min/+}*-, wie auch bei *Sepp^{+/-}Apc^{Min/+}*-Mäusen, eine Se-Supplementation ab Tag 21 deutliche signifikante Effekte auf die intestinale Tumorigenese hatte. Supplementierte Tiere profitierten von der erhöhten Se-Gabe und entwickelten wesentlich kleinere und auch in der Gesamtmenge wesentlich weniger Tumore als adäquat versorgte Tiere. Im Vergleich zu den wildtypischen Tieren zeigten *SepP^{+/-}*-Tiere zwar immer noch einen leichten genotypisch bedingten Nachteil, eine Supplementation konnte sie aber immerhin auf ein Niveau bringen, das wildtypischen adäquat versorgten Tieren entspricht. Dieses Ergebnis erscheint vor dem Hintergrund der Tumorprävention in genetisch unvorteilhaften Individuen von großer Bedeutung, da in diesem Fall - anders als bei vielen anderen genetischen Dispositionen - eine einfache nutritive Strategie mit einem in vielen Studien erprobten Supplement als erfolgsversprechend anzusehen ist.

Bermerkenswerterweise profitierten männliche und weibliche Tiere gleichermaßen von der Se-Supplementation, obwohl es zahlreiche Hinweise auf eine unterschiedliche geschlechtsspezifische Selenverwertung gibt (Waters, Chiang et al. 2004; Riese, Michaelis et al. 2006). In einer kürzlich erschienenen Darmkrebsstudie mit Patientinnen der WHI (*Women's Health Initiative*) konnte weder die Serum-Se-Konzentration noch SNPs in Selenoproteingenen mit dem Krebsrisiko der Patientinnen assoziiert werden. Ein Vergleich mit einer Meta-Analyse von insgesamt 14 Studien ergab nur für Männer einen signifikanten inversen Zusammenhang zwischen Selen und dem Krebsrisiko (Takata, Kristal et al. 2011). Im hier gewählten Tiermodell findet sich dieses Phänomen eines geschlechtsabhängigen Krebsrisikos nicht wieder. Im Falle der *Apc^{Min/+}*-Mäuse waren alle Tiere gleich stark von der durch das defekte *Apc*-Allel bedingten Adenombildung betroffen und zeigten dieselbe Responsivität gegenüber der Selenversorgung.

Serumanalysen zeigten nur eine leichte Erhöhung der Se-Konzentration supplementierter Tiere. Dies spricht dafür, dass das zugeführte Selen fast vollständig für die Selenoprotein-Biosynthese verwendet wurde. Der durch die *SepP*-Heterozygotie bedingte eingeschränkte Se-Metabolismus war dagegen eindeutig nachweisbar. Sowohl in adäquat ernährten, als auch in supplementierten Tieren, war die Serum-Se-Konzentration in heterozygoten Mäusen um etwa die Hälfte reduziert. Ein Effekt auf die Aktivität der plasmatischen Glutathion-Peroxidase (pGPx) war in keinem Fall zu beobachten, was dessen maximale Expression nahelegt. Trotz *SepP*-Heterozygotie konnte offenbar auch

mit Se-adäquater Nahrung das Plateau der Enzymaktivität erreicht werden, was für eine ausreichende Versorgung bei RDA (0,15 ppm Se)-Fütterung sprechen würde. Da SepP ähnlich schnell ein Plateau maximaler Expression erreicht, ist zu vermuten, dass die beobachteten signifikanten chemopräventiven Se-Effekte vermutlich über intrazelluläre Selenoproteine vermittelt werden, die erst sehr viel später ein Expressionsmaximum erreichen und von der Supplementation und einer ausreichenden Se-Versorgung durch SepP eher profitieren.

Auch scheinen diese Selenoproteine vor allem protektiv auf die Krebsentstehung zu wirken, denn mit der untersuchten Strategie der Hochselentherapie (0,6 ppm Se) ab Tag 60, einem Zeitpunkt, zu dem die Tumorentstehung bereits stattgefunden hat und sich die Anzahl der Tumoren bis zum Tag 120 auch nicht mehr signifikant ändert (Shoemaker, Moser et al. 1995), konnte keine signifikante Verbesserung der Erkrankung mehr erreicht werden. Interessant in diesem Zusammenhang ist die beobachtete Se-Anreicherung im Tumor. Das Tumorgewebe wies nach 120 Tagen einen gleichermaßen erhöhten Gewebe-Se-Gehalt in allen Futter und Genotyp-Gruppen auf. Als Ursache konnte die im Vergleich zu gesundem Normalgewebe heraufregulierte Expression des SepP-Rezeptors-Gens *Lrp8* (Apolipoprotein E Rezeptor 2) identifiziert werden. Erhöhte Se-Konzentrationen wurden bereits auch im humanen Tumorgewebe nachgewiesen, sowohl bei Patienten mit Darmkrebserkrankung (Charalabopoulos, Kotsalos et al. 2009), als auch im neoplastischen Gewebe von Brustkrebspatientinnen (Charalabopoulos, Kotsalos et al. 2006).

Da in Zellkulturexperimenten ein ausreichender Se-Gehalt im Medium essentiell ist für das Wachstum der Zellen, ist anzunehmen, dass malignes Gewebe für eine erhöhte Proliferationsrate auch einen erhöhten Se-Bedarf hat. Das würde allerdings bedeuten, dass sich eine erhöhte Se-Zufuhr nach bereits eingesetzter Bildung von Neoplasien eher tumorfördernd und somit nachteilig für den Patienten auswirken würde. Dieser Trend deutete sich auch im hier verwendeten Mausmodell an. In diesem Zusammenhang wäre ein Zeitverlauf der Se-Konzentration in Blut und Gewebe über die gesamten 99 Tage der Fütterung und eine Korrelation mit der Tumorigenese höchst aufschlussreich, was allerdings genehmigungstechnisch und aus Tierschutzgründen bei unseren Haltungskapazitäten nicht möglich war.

4.3 Therapie-Strategien mit Sulindac und Selen

Eine etablierte Methode der Therapie sowohl bei humanen FAP-Patienten (Waddell and Loughry 1983; Labayle, Fischer et al. 1991), als auch tierexperimentell im Ratten- und Mausmodell ist die Gabe des nicht-steroidalen anti-inflammatorischen Medikaments

(NSAID = *non steroidal anti-inflammatory drug*) Sulindac (Boolbol, Dannenberg et al. 1996; Chiu, McEntee et al. 1997). Sulindac stellt eine sogenannte Pro-Droge dar, d.h. die Substanz wird erst im Organismus zum eigentlichen Wirkstoff umgewandelt. Im Falle von Sulindac findet, hauptsächlich in der Leber und durch Darmbakterien, zum einen eine irreversible Oxidation zu Sulindac-Sulfon und zum anderen eine reversible Reduktion zu Sulindac-Sulfid statt. Dabei liegt der Anteil des Sulfons bei ca. 80%, der des Sulfids bei nur ca. 10%, gemessen am Vorkommen im Serum und in den Ausscheidungen (Duggan, Hooke et al. 1977; Shen and Winter 1977).

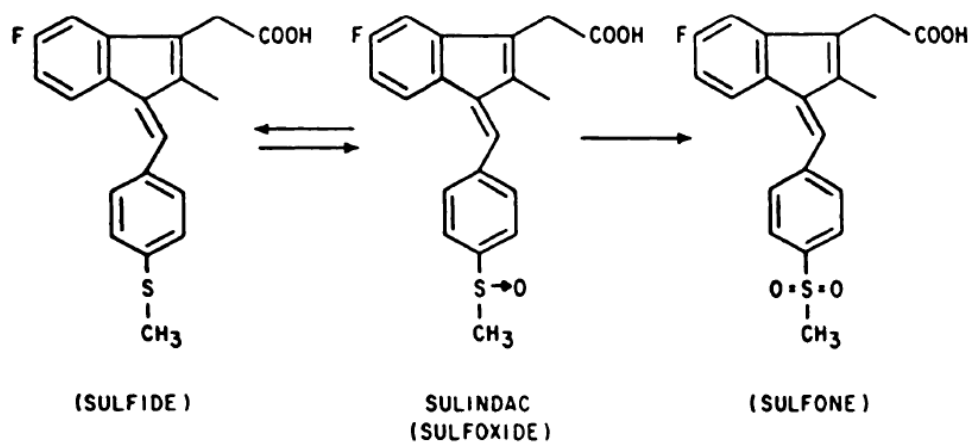


Abb. 4.3: Aktive Formen von Sulindac. Die Pro-Droge Sulindac wird in der Leber und durch Darmbakterien zu ca. 10% reversibel zu Sulindac-Sulfid reduziert und zu ca. 80% irreversibel zu Sulindac-Sulfon oxidiert (Duggan, Hooke et al. 1977).

Die antikanzerogene Wirkung wurde lange Zeit nur dem Sulfid zugeschrieben, da es die eigentliche antiinflammatorische Funktion der COX2-Hemmung erfüllt (Piazza, Rahm et al. 1995). Durch Inhibition dieses während entzündlicher Prozesse entscheidenden Enzyms wird die Prostaglandin-Synthese verhindert. Nachfolgende tumorfördernde Mechanismen wie Angiogenese und Proliferation sind dann eingeschränkt. Inzwischen ist in einigen Studien gezeigt worden, dass das Sulfon ebenfalls eine Regression von bereits existierenden Tumoren bewirken kann, und das auf einem offensichtlich COX-unabhängigem Weg (Thompson, Briggs et al. 1995). *In vitro* Experimente zeigten dabei vor allem einen fördernden Einfluss auf die Apoptose von Tumorzellen (Hanif, Pittas et al. 1996).

In dieser Arbeit führte der durchgeführte Therapieansatz mit Sulindac bzw. einer Sulindac-Se-Kombination nicht zu einem Erfolg. Es wurde eine Behandlungsdosis von 80 ppm gewählt, in Anlehnung an oben angeführte Studien, die deutliche Effekte zeigen konnten. Das Medikament wurde über das Trinkwasser verabreicht, da eine gleichzeitige Se-Gabe bereits über das Futter erfolgte. Auch hier zeigen Beispiele, sowohl für Darreichungen

über das Futter, als auch über das Trinkwasser, erfolgreiche Behandlungen. Einzig in den publizierten Tumorzahlen sind Unterschiede zu anderen Studien feststellbar. Diese sind in der Regel geringer als in der vorliegenden Arbeit und entsprechen eher denen der hier verwendeten Se-supplementierten Wildtypiere. Das liegt wahrscheinlich im nicht erfassten Se-Gehalt bei anderen Arbeiten begründet, der gerade bei amerikanischen Studien eher im oberen Bereich liegen dürfte. Auch in unsere Arbeitsgruppe konnten bei früheren Tierexperimenten mit herkömmlich hergestelltem Futter starke, jahreszeitlich bedingte, Se-Schwankungen festgestellt werden, je nachdem, welches Getreide in die Futterproduktion eingegangen war. Das führte letztendlich zu der Entscheidung, das Futter für die Selenforschung der vorliegenden Arbeit auf Basis eines Se-defizienten Futterpulvers selbst zu mischen und zu pelletieren.

Da alle Therapieansätze keine signifikanten positiven oder negativen Wirkungen auf die Tumorigenese zeigten, wurde auf detailliertere Analysen außer der Bestimmung der Tumoranzahl und der Tumorgesamtfläche bei den behandelten Mäusen verzichtet. Somit kann nur vermutet werden, dass sich durch die Langzeitbehandlung über 60 Tage eine möglich Resistenz gegenüber Sulindac entwickelt hat. In *Apc^{Min/+}*-Mäusen konnte in einer anderen Arbeit gezeigt werden, dass Celecoxib, ebenfalls ein COX2-Inhibitor, nach 21 Tagen Behandlung eine deutliche Reduktion der Tumoranzahl bewirken konnte, eine Behandlung über 3 Monate allerdings zu nahezu den gleichen Zahlen führte wie bei unbehandelten Tieren (Carothers, Moran et al. 2006). Ähnliches wurde auch in einer humanen Studie für Sulindac beobachtet. Hier konnte durch eine sechsmonatige Behandlung eine Rückbildung von kolorektalen Adenomen beobachtet werden, wohingegen nach einer Behandlungsdauer von ca. 48 Monaten die Tumoranzahl bzw. -größe wieder zunahm und im Endeffekt keinen Unterschied zur Kontrollgruppe zeigte (Tonelli, Valanzano et al. 2000).

Möglichweise haben auch die in dieser Arbeit verwendeten Versuchstiere durch die lange Behandlungsdauer von 60 Tagen eine NSAID-Resistenz entwickelt, auch die Kombination mit einer zusätzlichen Se-Gabe schien diesen Effekt nicht zu beeinflussen. Dennoch sprechen die zahlreichen tierexperimentellen und humanen Studien für einen positiven Effekt von Sulindac. Um bei der Behandlung von Krebspatienten einer möglichen Resistenzentwicklung vorzubeugen, gilt es zu prüfen, ob sich diese nur bei bestimmten NSAIDs zeigt, um eventuell mit einer kombinierten Therapie entgegen zu wirken. Andererseits ist es wahrscheinlich auch ratsam, die Behandlung intervallartig mit Behandlungspausen durchzuführen, um bei jedem Intervall erneut die kurzfristigen, aber deutlich positiven Effekte von Sulindac bzw. anderen NSAIDs auszunutzen und Resistenzen vorzubeugen.

4.4 Transkriptionsanalysen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Genchipanalysen führten zu der Erkenntnis, dass sich die Tumore aller Versuchstiere stark ähnelten und keine Unterschiede zwischen den Signalwegen bestanden. Beim Vergleich der Genexpression gepoolter Tumor-RNA zeigten weder die typischen Gene der Darmkrebszellproliferation (Wnt/ β -Catenin-Signalweg), noch des Metabolismus, der Angiogenese oder der Apoptose, der Inflammation oder Gene für Selenoproteine konsistente Unterschiede zwischen den Genotypen oder den Futtergruppen. Setzt man voraus, dass die Entstehung aller Adenome durch dasselbe Ereignis, nämlich durch den Verlust des zweiten noch funktionsfähigen *Apc*-Allels, hervorgerufen wurde und berücksichtigt zudem den relativ späten Zeitpunkt der Tumorentwicklung (nach 120 Tagen), waren große Unterschiede in der Genexpression nicht unbedingt zu erwarten, da voll ausgebildete Darmtumore gleicher genetischer Genese verglichen wurden.

Ungeachtet dieser Ähnlichkeit der globalen Signalwege in den Tumoren wurden in einem zweiten Schritt gezielt Kandidatengene aus Tumor-mRNA-Pools vieler Einzeltiere im Tumor und benachbarten Normalgewebe durch Real Time-PCR-Analysen verglichen. Hier zeigten sich signifikante Unterschiede in der differentiellen Expression charakteristischer Gene, Unterschiede innerhalb der Genotyp- und Futtergruppen waren aber für kein einziges der betrachteten Gene feststellbar. In allen *Apc*^{Min/+}-Tieren waren *Wnt*-assoziierte Gene wie *β -Catenin*, *Tcf* und das Zielgen *c-Myc*, das für sich allein genommen auch schon eine tumorfördernde Wirkung durch Aktivierung der Proliferation besitzt, heraufreguliert. Auch einige Inflammationsmarker, wie *Tnfa* und *Il6* sowie *Cox2* waren ebenfalls in allen Gruppen gleich stark reguliert. Bezüglich der differentiellen Regulation von Selenoproteingenen konnten bereits aus anderen *Apc*^{Min/+}-Mausstudien bekannte Beobachtungen bestätigt werden, wie z.B. die bereits erläuterte *SepP*-Herunterregulierung und die *GPx2*-Heraufregulierung, die vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass das *GPx2*-Gen ebenfalls ein β -Catenin-Zielgen ist (Kipp, Banning et al. 2007). *SeIH* und *SeIM* fanden sich auch im hier verwendeten Modell reguliert. Eine Se-Abhängigkeit, wie sie an anderer Stelle gezeigt wurde, konnte allerdings nicht bestätigt werden (Kipp, Banning et al. 2009), *Sep15*, *SeIS* und *SeIW* zeigten sich nicht reguliert. Insgesamt waren typische, bereits aus anderen Studien bekannte Gene reguliert, einen entscheidenden Hinweis für die Unterschiede innerhalb der Gruppen lieferten die Genexpressionsanalysen allerdings nicht. In dieser Hinsicht muss man die Tumore als qualitativ gleichwertig bezeichnen. Insofern sind die makroskopisch gefundenen Effekte möglicherweise nicht direkt auf Unterschiede im Tumorgewebe, sondern eventuell auf Unterschiede im Tumorstroma zurückzuführen oder durch eine unterschiedlich

ausfallende Immunantwort zu erklären, worauf im Folgenden näher eingegangen werden soll.

4.5 Nachweis von Mastzellen im Tumorgewebe

Die Entstehung und das Wachstum von Tumoren gehen in der Regel einher mit einer Infiltration von Immunzellen in das Gewebe. Die Art der Immunantwort wird dabei durch eine Vielzahl von Faktoren, wie z.B. der Lokalisation des Tumors und der Art und Weise seiner Entstehung (Mutation, chemisch oder viral induziert) bestimmt. Dabei können neben Natürlichen Killerzellen (NK) und T-Zellen auch myeloide Zellen wie Makrophagen, Neutrophile und Eosinophile Granulocyten, Mastzellen und Dendritische Zellen beteiligt sein (Murdoch, Muthana et al. 2008), deren Rolle im Einzelnen derzeit allerdings nicht immer eindeutig definiert werden kann und für die es zum Teil widersprüchliche Befunde gibt. Für T-Zellen z.B. wird größtenteils eine antikanzerogene Wirkung postuliert, dabei werden vor allem Tumordinfiltrationen mit zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen mit einer besseren Prognose für den Patienten in Zusammenhang gebracht (Naito, Saito et al. 1998), die Rolle von Mastzellen wiederum wird dagegen kontrovers diskutiert (Ribatti and Crivellato 2009). Aufgrund der bereits erwähnten Vorarbeiten und aufgrund der im Tumorgewebe mittels Real Time-PCR festgestellten hohen Regulation Mastzell-spezifischer Proteasen wurde in dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk auf die Verteilung der Mastzellen und ihre mögliche Wirkung auf die intestinale Tumorigenese in *SepP*-heterozygoten und wildtypischen *Apc*^{Min/+}-Mäusen gerichtet.

Die Funktionen von Mastzellen sind besonders gut im Zusammenhang mit Allergie, Wundheilung und Parasiteninfektionen beschrieben. Die Erkenntnisse, die bisher über die Rolle von Mastzellen beim Tumorstadium bekannt sind, stammen hauptsächlich aus tierexperimentellen Studien mit Krebsmodellen oder aus humanen Korrelationsstudien. Dabei wurde eine Mastzellinvasion sowohl in adenomatösen Polypen in der Maus (Gounaris, Erdman et al. 2007), als auch in kolorektalen Karzinomen beim Mensch gezeigt (Gulubova and Vlaykova 2009). In humanen Studien wurde eine erhöhte Mastzellanzahl in Tumoren sowohl bei Darmkrebspatienten (Fisher, Paik et al. 1989), als auch bei Patienten mit Hodgkin Lymphom (Molin, Edstrom et al. 2002) mit einer schlechteren Prognose in Zusammenhang gebracht. Wohingegen im Falle von Brustkrebserkrankungen (Aaltomaa, Lipponen et al. 1993; Dabiri, Huntsman et al. 2004) und Lungenkrebs (Welsh, Green et al. 2005) eine verbesserte Prognose durch hohe Mastzellanzahlen festgestellt werden konnte. In einem murinen B16 Melanom-Modell führt eine Mastzelldefizienz zu einem erniedrigten Tumorstadium (Starkey, Crowle et al. 1988).

Als ein Mediator für die erhöhte Migration der Mastzellen ins Tumorgewebe wird u.a. der Stammzellofaktor (SCF) angesehen, der von Tumorzellen produziert wird und den Mastzellvorläuferzellen für die Zellreifung benötigen (Zhang, Stoica et al. 2000; Huang, Lei et al. 2008). Die das Tumorstadium fördernden Eigenschaften werden den von Mastzellen freigesetzten Mediatoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*), bFGF (*basic fibroblast growth factor*), Heparin, Histamin und TNF α zugeschrieben, die die Angiogenese fördern. Angiogenese, die Neubildung von Blutgefäßen, ist entscheidend für ein Tumorstadium, das über 1 mm³ hinausgeht (Ribatti, Crivellato et al. 2004). Außerdem sind diverse im Kontext der Wundheilung gut charakterisierte Proteasen (mMcp4 (Chymase), mMcp6 (Trypsin), MMP9) entscheidend, die eine Metastasierung durch Spaltung und Modellierung der extrazellulären Matrix begünstigen können.

In dieser Arbeit konnte eine signifikant erhöhte Mastzellzahl in den Tumoren *SepP*-heterozygoter Mäuse festgestellt werden, unabhängig davon, ob diese Se-adäquat ernährt oder supplementiert wurden. Die Vielzahl der von Mastzellen sezernierten Mediatoren, die nicht nur die Proliferation und die Angiogenese fördern, sondern im Falle der Matrixmetalloproteinasen auch einen direkten Einfluss auf die extrazelluläre Matrix nehmen, bieten somit eine Erklärung für die ebenfalls in den *SepP*-heterozygoten Tieren festgestellte stärkere Entartung des Tumorgewebes.

Im Kontext dieser Immunzellinvasion in das Tumorgewebe wurde eine Untersuchung der Mäuseren im Hinblick auf verschiedene Zytokine vorgenommen. Dabei stellte sich heraus, dass gerade in *SepP*-heterozygoten Tieren ein erhöhter IL6-Spiegel nachzuweisen war, der im Falle der adäquat versorgten Tiere sogar signifikant erhöht war. IL6 kann einerseits beteiligt sein an der Rekrutierung und Reifung mononukleärer Zellen, wie z.B. Mastzellen, andererseits gehört es aber auch zu den Hauptmediatoren, die von Mastzellen sezerniert werden. Letzteres ließe eine Rekrutierung weiterer Immunzellen vermuten. Eine Erhöhung des IL6 im Serum von *Apc^{Min/+}*-Mäusen konnte auch an anderer Stelle gezeigt werden und mit einer erhöhten Prostatatumorigenese in Zusammenhang gebracht werden. (Poutahidis, Rao et al. 2009). Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang, dass Poutahidis et al. in ihrer Arbeit ebenfalls Mastzellen im entarteten Gewebe nachweisen und zudem die Bedeutung von funktionell kontrovers diskutierten CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen hervorheben. In Veröffentlichungen der letzten Jahre wurde viel über die Rolle dieser regulatorischen T-Zellen diskutiert, die eigentlich eine antiinflammatorische Wirkung ausüben, allerdings durch den Einfluss von IL6 und Tgf β eine Wandlung zu sogenannten Th17-Zellen vollziehen können, die das proinflammatorische Zytokin IL17 produzieren und somit die Tumorstadium fördern (Gounaris, Blatner et al. 2009). Diese mögliche Erklärung der Wirkungsweise der

nachgewiesenen erhöhten Il6-Ausschüttung wird derzeit immunhistologisch überprüft. Erste Färbungen der Darmpräparate mit einem Anti-CD3-Antikörper, der dem Nachweis aller T-Zell-Typen dient, zeigten allerdings keine T-Zell-Einwanderung in malignes Gewebe, sondern eher eine Lokalisation dieser Zellen im gesunden Gewebe und vor allem in den Peyer'schen Plaques, wobei auch hier keine quantitativen Unterschiede feststellbar waren zwischen den Genotyp- und Futtergruppen.

4.6 Fazit und Ausblick

Sowohl der *SepP*-Genotyp, als auch die Versorgung mit Selen über die Nahrung oder durch Supplemente hatten einen wichtigen Einfluss auf die intestinale Tumorigenese im *Apc^{Min/+}*-Mausmodell, während eine selenbasierte Therapiestrategie sowie eine Behandlung mit dem COX2-Hemmer Sulindac nach erfolgter Tumorinitiation keine positiven Effekte zeigten.

Eine Supplementation zu einem Zeitpunkt, zu dem noch keine Krebserkrankung vorlag, konnte im Mausmodell das Risiko intestinale Adenome zu entwickeln, signifikant senken. Eine Se-Therapie bei bereits vorhandenen Neoplasien war dagegen wirkungslos. Somit scheint Selen vor allem einen Effekt auf die Tumorinitiation bzw. das frühe Wachstum zu haben. Sowohl die Serum-Se-Konzentration als auch die Aktivität der plasmatischen GPx zeigten keine Unterschiede zwischen supplementierten und adäquat ernährten Tieren. Dies zeigt, dass die üblichen Biomarker der Se-Versorgung im Serum zwischen gut und sehr gut versorgten Individuen nicht zuverlässig unterscheiden können. Sowohl die pGPx als auch SepP können ein maximales Expressionsniveau bei guter Versorgung erreichen. Allerdings weiß man nicht, ob das auch für andere intrazelluläre Selenoproteine gilt, die vermutlich für die hier gezeigten Effekte verantwortlich sind, und inwieweit hier die benötigten Konzentrationen vergleichbar sind.

Im Gegensatz zur positiven Wirkung von Selen auf die Tumorinitiation, scheint die Tumorprogression nicht nur abhängig zu sein vom Se-Gehalt der Nahrung, sondern vor allem von der Effektivität des Se-Transports bzw. der Se-Speicherung durch SepP. Der durch den *SepP*-Genotyp eingeschränkte Se-Metabolismus, der sich deutlich messbar durch eine verringerte Serum-Se-Konzentration auszeichnete, manifestierte sich in einer fulminanteren Tumorprogression, die sich zum einen durch das Vorhandensein von größeren Tumoren bei gleicher Anzahl im Vergleich zu wildtypischen Artgenossen, zum anderen durch ihre stärkere Entartung äußerte, die wiederum in supplementierten Tieren signifikant reduziert werden konnte.

Eine mögliche Erklärung bietet diese Arbeit durch den Nachweis der höheren Invasion von Mastzellen in das Tumorgewebe, die durch das Ausschütten von Mediatoren sowohl die Angiogenese fördern, als auch die extrazelluläre Matrix beeinflussen können.

Die Rolle der Immunzellen während der Tumorigenese ist aber insofern noch nicht klar definiert, als hier nur die Situation am Versuchsende nach 120 Tagen abgebildet werden konnte. Eine Immunantwort auf ein Tumorwachstum kann sicher als weitaus komplexer vorausgesetzt werden und es ist anzunehmen, dass zu anderen Zeitpunkten der Tumorentwicklung andere Effektorzellen eine Rolle spielen könnten. SepP, das offenbar einen immunmodulatorischen Einfluss auf die Tumorprogression ausübt, würde dabei die Rolle des Se-Transporters zufallen, der Immunzellen mit Selen versorgt und dabei regulatorisch auf die Zell-spezifische Selenoproteinexpression wirkt. Dabei scheinen bei Immunzellen vor allem jene Selenoproteine wichtige Funktionen zu erfüllen, die bisher eher weniger gut verstanden oder charakterisiert sind. Neben den bekannten GPX1 und 4, sowie TXNRD1, die für die Kontrolle der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) verantwortlich sind, sind das z.B. SELH (transkriptionelle Regulation), SELM, SELS, SEP15 (Proteinfaltung und Qualitätskontrolle im ER), sowie SELK. Letzteres ist in Geweben des Immunsystems hoch exprimiert und ihm wird eine entscheidenden Funktion zugeschrieben bei intrazellulären Ca^{2+} -abhängigen Signalkaskaden, die eine wichtige Rolle spielen für die Transkription, die Proliferation, die Chemotaxis (Migration) sowie die Sekretion von Zytokinen (Verma, Hoffmann et al. 2011). Inwieweit gerade diese Zellen von der Selenversorgung über SEPP oder über die Diät reguliert werden, und ob sie ein ähnliches Maximalniveau erreichen, wie es für GPX3 und SEPP gezeigt wurde, ist allerdings unklar.

Die Tatsache, dass Selen und der Selentransporter SEPP nicht nur einen direkten Einfluss auf die Tumorzellen, sondern auch einen indirekten Einfluss über das Immunsystem ausüben, macht die Komplexität dieses Forschungsgebietes deutlich. Das Ziel einer effektiven Chemoprävention, nicht nur im Hinblick auf Darmkrebserkrankungen, lassen es lohnenswert und spannend erscheinen, auch weiterhin die Forschungsbemühungen dahingehend voranzutreiben, die Mechanismen der unumstrittenen und vielfach gezeigten positiven Wirkung von Selen aufzuklären und dabei die hier aufgezeigten möglichen Ansätze weiter zu verfolgen.

Abschließend ist festzuhalten, dass schlecht Se-versorgten Menschen, sei es genetisch bedingt oder durch Mangelernährung, anzuraten ist, Selen zu supplementieren, um von den gesundheitsfördernden Eigenschaften einer maximalen Selenoprotein-Expression zu profitieren. Das zeigen nicht zuletzt die Studien, die einen schlechten Se- bzw. SEPP-Status sogar mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko der Erkrankten korrelieren konnten.

Auch im hier verwendeten $Apc^{Min/+}$ -Mausmodell besteht dieser Zusammenhang, je schlechter der Se-Status der Tiere war, umso höher war die Anzahl der Tumore.

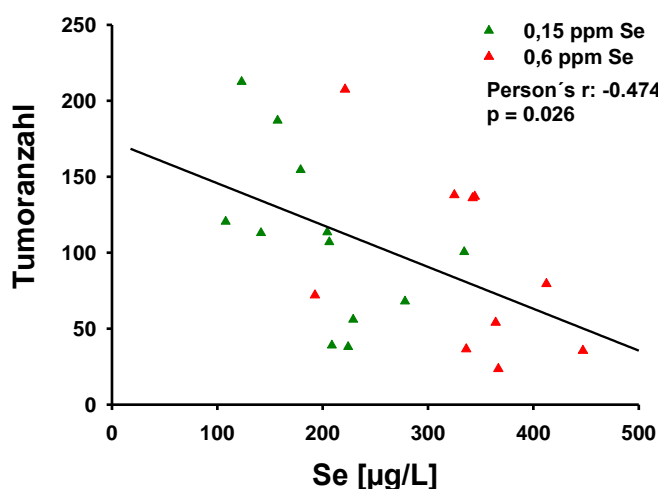


Abb. 4.4: Korrelation zwischen Se-Status und Tumoranzahl bei $Apc^{Min/+}$ -Mäusen. Im Serum der $Apc^{Min/+}$ -Mäuse beider $SepP$ -Genotypen wurde der Se-Gehalt mittels TRFA bestimmt und mit der gezählten Tumoranzahl im Dünndarm korreliert. Dabei ergab sich eine negative Korrelation, je höher der Se-Status der Mäuse war, umso geringer war die Anzahl der Tumore ($p = 0,026$, Pearson's Korrelationskoeffizient = $-0,474$, $n = 12$ je Futtergruppe).

Das hier gewählte Tiermodell spricht zudem dafür, dass Frauen und Männer gleichermaßen bezüglich des Darmkrebsrisikos von einer Se-Supplementation profitieren würden, im Gegensatz z.B. zum Krankheitsbild der Sepsis, bei dem vor allem Männer Nutznießer sind, was sowohl in humanen Studien (Angstwurm, Engelmann et al. 2007; Schomburg 2007), als auch in unserer Arbeitsgruppe im Tiermodell gezeigt werden konnte (Stoedter, Renko et al. 2010).

Bezieht man die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse auf Darmkrebserkrankungen beim Menschen, scheint eine Krebstherapie mit Se zwar ebenso wenig erfolgversprechend wie eine Langzeit-NSAIDs-Behandlung und durch mögliche proliferationsfördernde Eigenschaften sogar eher nachteilig, sorgt man allerdings für einen guten Se-Status, solange man gesund ist, senkt man das Risiko an Darmkrebs im Alter zu erkranken signifikant.

5. Zusammenfassung

In zahlreichen tierexperimentellen und humanen Studien wurde eine chemopräventive Wirkung des Spurenelements Selen (Se) bei verschiedenen Krebserkrankungen beobachtet. In dieser Arbeit wurden diese Eigenschaften des Selens sowohl im Hinblick auf eine schlechte Selenversorgung über die Nahrung, als auch bezüglich einer nachteiligen genetischen Prädisposition untersucht.

Basierend auf Studien, die SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) im Gen des Selentransportproteins Selenoprotein P (SEPP) mit erhöhtem bzw. erniedrigtem Darmkrebsrisiko assoziieren konnten, wurde der Einfluss der *SepP*-Genosis im Mausmodell getestet. Hierzu wurde ein *SepP*^{+/-}-Mausstamm, als Modell für einen genetisch bedingten, eingeschränkten Selenmetabolismus, mit dem *Apc*^{Min/+}-Mausmodell, das bedingt durch den Funktionsverlust eines Allels des Tumorsuppressors Apc ein erhöhtes Darmkrebsrisiko aufweist, verkreuzt. Dieser Ansatz versprach einen Erkenntnisgewinn für den Vergleich von gut mit schlecht diätetisch Se-versorgten Menschen (z.B. Europäer versus US-Amerikaner) sowie für Individuen mit nachteiliger genetischer Prädisposition (SNP Genotyp) für einen optimalen Se-Metabolismus.

Ein eingeschränkter Se-Metabolismus durch *SepP*-Heterozygotie führte unter definierten Fütterungsbedingungen zur Entwicklung größerer Tumore in *Apc*^{Min/+}-Mäusen. Eine Supplementation mit dem Vierfachen der empfohlenen Se-Dosis (RDA) ab Tag 21 konnte sowohl die Tumoranzahl, als auch die Gesamtumorfläche in *SepP* heterozygoten und wildtypischen *Apc*^{Min/+}-Mäusen signifikant senken. Eine Therapie-Strategie mit Selen nach bereits eingesetzter Bildung von Neoplasien ab Tag 60 war ohne Effekt. Ebenso zeigte die Behandlung der intestinalen Inflammation durch den Cox2-Inhibitor Sulindac oder durch eine kombinierte Gabe von Selen und Sulindac keine therapeutischen Erfolge.

Das beschleunigte Tumorwachstum in *SepP*-heterozygoten Tieren verglichen mit gleich gefütterten Wildtyptieren war von einer stärkeren Entartung des Gewebes, einer erhöhten Einwanderung von Mastzellen in das erkrankte Gewebe und einem erhöhten Il6-Spiegel im Serum begleitet, was zum Teil durch eine Se-Supplementation ausgeglichen werden konnte und insgesamt auf eine immunmodulatorische Wirkung von *SepP* hindeutet.

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Menschen mit schlechter Se-Versorgung, sei es aufgrund einer Mangelernährung oder einer nachteiligen genetischen Prädisposition, von einer Se-Supplementation zur Reduktion ihres Darmkrebsrisikos profitieren können, solange sie noch gesund sind. Nach erfolgter Tumorigenese könnte sich die gleiche Maßnahme aber nachteilig auswirken.

6. Summary

The chemopreventive effect of the trace element selenium against cancer was observed in numerous animal studies and human trials. Here we investigated these properties with respect to both a poor selenium food supply and a disadvantageous genetic predisposition.

Based on studies showing an association between SNPs (single *nucleotide polymorphisms*) in the gene of the selenium transport protein selenoprotein P (SEPP) and cancer risk we tested the influence of *SepP*-heterozygosity on selenium supply in mice. To this end we crossed *SepP*^{+/-} mice with *Apc*^{Min/+} mice, the former being a model for a restricted selenium metabolism and the latter for increased risk for intestinal tumors based upon an allelic loss of the tumorsuppressor *Apc*. We expected from these analyses insights into the relative importance of selenium supply and individual genetic predisposition for intestinal tumorigenesis.

A restricted selenium metabolism caused by *SepP*-heterozygosity induced the formation of larger tumors in *Apc*^{Min/+} mice under well-defined feeding conditions. A selenium supplementation with the fourfold recommended dietary allowance (RDA) starting at day 21 decreased tumor numbers and tumor area in both *SepP*-heterozygous and -wildtyp *Apc*^{Min/+} mice. A therapeutic approach employing selenium supplementation starting at day 60 after generation of neoplasms had no effect. Treatment of intestinal inflammation with the Cox2-inhibitor sulindac or with combined administration of selenium and sulindac was also ineffective.

The accelerated tumor growth in *SepP*-heterozygous mice compared to equally fed wildtyp animals was accompanied by advanced tissue degeneration, increased migration of mast cells into the tumor and an elevated Il6-serum level. These differences were partly compensated by selenium supplementation pointing to an immunomodulatory role of *SepP* and Se during intestinal tumorigenesis.

We conclude that people with poor Se status either because of insufficient nutrition or genetic predisposition could benefit from selenium supplementation to reduce their risk of intestinal cancer development. However, supplementation might be harmful when started at a time point where intestinal tumors have already been established.

7. Literatur

- Aaltomaa, S., P. Lipponen, et al. (1993). "Mast cells in breast cancer." *Anticancer Res* **13**(3): 785-788.
- Al-Taie, O. H., J. Seufert, et al. (2002). "A complex DNA-repeat structure within the Selenoprotein P promoter contains a functionally relevant polymorphism and is genetically unstable under conditions of mismatch repair deficiency." *Eur J Hum Genet* **10**(9): 499-504.
- Al-Taie, O. H., N. Uceyler, et al. (2004). "Expression profiling and genetic alterations of the selenoproteins GI-GPx and SePP in colorectal carcinogenesis." *Nutr Cancer* **48**(1): 6-14.
- Algarra, I., T. Cabrera, et al. (2000). "The HLA crossroad in tumor immunology." *Hum Immunol* **61**(1): 65-73.
- Ambroziak, M., J. Pachucki, et al. (2005). "Disturbed expression of type 1 and type 2 iodothyronine deiodinase as well as *tiff1/nkx2-1* and *pax-8* transcription factor genes in papillary thyroid cancer." *Thyroid* **15**(10): 1137-1146.
- Angstwurm, M. W., L. Engelmann, et al. (2007). "Selenium in Intensive Care (SIC): results of a prospective randomized, placebo-controlled, multiple-center study in patients with severe systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock." *Crit Care Med* **35**(1): 118-126.
- Apostolou, S., J. O. Klein, et al. (2004). "Growth inhibition and induction of apoptosis in mesothelioma cells by selenium and dependence on selenoprotein SEP15 genotype." *Oncogene* **23**(29): 5032-5040.
- Arner, E. S. and A. Holmgren (2000). "Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase." *Eur J Biochem* **267**(20): 6102-6109.
- Aro, A., G. Alfthan, et al. (1995). "Effects of supplementation of fertilizers on human selenium status in Finland." *Analyst* **120**(3): 841-843.
- Bansal, M. P., R. G. Cook, et al. (1989). "A 14-kilodalton selenium-binding protein in mouse liver is fatty acid-binding protein." *J Biol Chem* **264**(23): 13780-13784.
- Bansal, M. P., T. Mukhopadhyay, et al. (1990). "DNA sequencing of a mouse liver protein that binds selenium: implications for selenium's mechanism of action in cancer prevention." *Carcinogenesis* **11**(11): 2071-2073.
- Barceloux, D. G. (1999). "Selenium." *J Toxicol Clin Toxicol* **37**(2): 145-172.
- Baron, J. A. and R. S. Sandler (2000). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention." *Annu Rev Med* **51**: 511-523.

- Bates, J. M., V. L. Spate, et al. (2000). "Effects of selenium deficiency on tissue selenium content, deiodinase activity, and thyroid hormone economy in the rat during development." *Endocrinology* **141**(7): 2490-2500.
- Beck, M. A., O. A. Levander, et al. (2003). "Selenium deficiency and viral infection." *J Nutr* **133**(5 Suppl 1): 1463S-1467S.
- Behne, D. and A. Kyriakopoulos (2001). "Mammalian selenium-containing proteins." *Annu Rev Nutr* **21**: 453-473.
- Bermano, G., F. Nicol, et al. (1995). "Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats." *Biochem J* **311** (Pt 2): 425-430.
- Berry, M. J., L. Banu, et al. (1991). "Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region." *Nature* **353**(6341): 273-276.
- Berry, M. J., L. Banu, et al. (1993). "Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine insertion at UGA codons." *EMBO J* **12**(8): 3315-3322.
- Bianco, A. C. and B. W. Kim (2006). "Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action." *J Clin Invest* **116**(10): 2571-2579.
- Bianco, A. C. and P. R. Larsen (2005). "Cellular and structural biology of the deiodinases." *Thyroid* **15**(8): 777-786.
- Bianco, A. C., D. Salvatore, et al. (2002). "Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases." *Endocr Rev* **23**(1): 38-89.
- Bjelakovic, G., D. Nikolova, et al. (2004). "Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis." *Lancet* **364**(9441): 1219-1228.
- Bjelakovic, G., D. Nikolova, et al. (2008). "Antioxidant supplements for preventing gastrointestinal cancers." *Cochrane Database Syst Rev*(3): CD004183.
- Blot, W. J., J. Y. Li, et al. (1993). "Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population." *J Natl Cancer Inst* **85**(18): 1483-1492.
- Blot, W. J., J. Y. Li, et al. (1995). "The Linxian trials: mortality rates by vitamin-mineral intervention group." *Am J Clin Nutr* **62**(6 Suppl): 1424S-1426S.
- Boolbol, S. K., A. J. Dannenberg, et al. (1996). "Cyclooxygenase-2 overexpression and tumor formation are blocked by sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis." *Cancer Res* **56**(11): 2556-2560.

- Bosschaerts, T., M. Guilliams, et al. (2008). "Alternatively activated myeloid cells limit pathogenicity associated with African trypanosomiasis through the IL-10 inducible gene selenoprotein P." *J Immunol* **180**(9): 6168-6175.
- Brigelius-Flohe, R. (1999). "Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases." *Free Radic Biol Med* **27**(9-10): 951-965.
- Brigelius-Flohe, R. and A. Kipp (2009). "Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis." *Biochim Biophys Acta* **1790**(11): 1555-1568.
- Burk, R. F., D. S. Early, et al. (1998). "Plasma selenium in patients with cirrhosis." *Hepatology* **27**(3): 794-798.
- Burk, R. F. and K. E. Hill (1994). "Selenoprotein P. A selenium-rich extracellular glycoprotein." *J Nutr* **124**(10): 1891-1897.
- Burk, R. F., K. E. Hill, et al. (2001). "Plasma selenium in specific and non-specific forms." *Biofactors* **14**(1-4): 107-114.
- Burk, R. F., K. E. Hill, et al. (1991). "Response of rat selenoprotein P to selenium administration and fate of its selenium." *Am J Physiol* **261**(1 Pt 1): E26-30.
- Calvo, A., N. Xiao, et al. (2002). "Alterations in gene expression profiles during prostate cancer progression: functional correlations to tumorigenicity and down-regulation of selenoprotein-P in mouse and human tumors." *Cancer Res* **62**(18): 5325-5335.
- Carlson, B. A., S. V. Novoselov, et al. (2004). "Specific excision of the selenocysteine tRNA[Ser]Sec (Trsp) gene in mouse liver demonstrates an essential role of selenoproteins in liver function." *J Biol Chem* **279**(9): 8011-8017.
- Carlson, B. A., X. M. Xu, et al. (2004). "Identification and characterization of phosphoseryl-tRNA[Ser]Sec kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(35): 12848-12853.
- Carothers, A. M., A. E. Moran, et al. (2006). "Changes in antitumor response in C57BL/6J-Min/+ mice during long-term administration of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor." *Cancer Res* **66**(12): 6432-6438.
- Charalabopoulos, K., A. Kotsalos, et al. (2009). "Serum and tissue selenium levels in gastric cancer patients and correlation with CEA." *Anticancer Res* **29**(8): 3465-3467.
- Charalabopoulos, K., A. Kotsalos, et al. (2006). "Selenium in serum and neoplastic tissue in breast cancer: correlation with CEA." *Br J Cancer* **95**(6): 674-676.
- Chavatte, L., B. A. Brown, et al. (2005). "Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes." *Nat Struct Mol Biol* **12**(5): 408-416.
- Chen, G., H. Wang, et al. (2004). "Reduced selenium-binding protein 1 expression is associated with poor outcome in lung adenocarcinomas." *J Pathol* **202**(3): 321-329.

- Chiu, C. H., M. F. McEntee, et al. (1997). "Sulindac causes rapid regression of preexisting tumors in Min/+ mice independent of prostaglandin biosynthesis." *Cancer Res* **57**(19): 4267-4273.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-159.
- Clark, L. C., G. F. Combs, Jr., et al. (1996). "Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group." *JAMA* **276**(24): 1957-1963.
- Clevers, H. (2006). "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease." *Cell* **127**(3): 469-480.
- Combs, G. F., Jr. (2001). "Selenium in global food systems." *Br J Nutr* **85**(5): 517-547.
- Combs, G. F., Jr., L. C. Clark, et al. (2001). "An analysis of cancer prevention by selenium." *Biofactors* **14**(1-4): 153-159.
- Combs, G. F., Jr. and W. P. Gray (1998). "Chemopreventive agents: selenium." *Pharmacol Ther* **79**(3): 179-192.
- Copeland, P. R. and D. M. Driscoll (1999). "Purification, redox sensitivity, and RNA binding properties of SECIS-binding protein 2, a protein involved in selenoprotein biosynthesis." *J Biol Chem* **274**(36): 25447-25454.
- Copeland, P. R., J. E. Fletcher, et al. (2000). "A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs." *EMBO J* **19**(2): 306-314.
- Cox, D. G., S. E. Hankinson, et al. (2004). "No association between GPX1 Pro198Leu and breast cancer risk." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**(11 Pt 1): 1821-1822.
- Dabiri, S., D. Huntsman, et al. (2004). "The presence of stromal mast cells identifies a subset of invasive breast cancers with a favorable prognosis." *Mod Pathol* **17**(6): 690-695.
- Daniels, L. A. (1996). "Selenium metabolism and bioavailability." *Biol Trace Elem Res* **54**(3): 185-199.
- Davis, C. D., H. Zeng, et al. (2002). "Selenium-enriched broccoli decreases intestinal tumorigenesis in multiple intestinal neoplasia mice." *J Nutr* **132**(2): 307-309.
- de Souza Meyer, E. L., J. M. Dora, et al. (2005). "Decreased type 1 iodothyronine deiodinase expression might be an early and discrete event in thyroid cell dedifferentiation towards papillary carcinoma." *Clin Endocrinol (Oxf)* **62**(6): 672-678.

- Diamond, A. M., I. S. Choi, et al. (1993). "Dietary selenium affects methylation of the wobble nucleoside in the anticodon of selenocysteine tRNA([Ser]Sec)." *J Biol Chem* **268**(19): 14215-14223.
- Dreher, I., T. C. Jakobs, et al. (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): 29364-29371.
- Duffield-Lillico, A. J., M. E. Reid, et al. (2002). "Baseline characteristics and the effect of selenium supplementation on cancer incidence in a randomized clinical trial: a summary report of the Nutritional Prevention of Cancer Trial." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**(7): 630-639.
- Duggan, D. E., K. F. Hooke, et al. (1977). "Identification of the biologically active form of sulindac." *J Pharmacol Exp Ther* **201**(1): 8-13.
- Dunn, G. P., L. J. Old, et al. (2004). "The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting." *Immunity* **21**(2): 137-148.
- El-Bayoumy, K. and R. Sinha (2005). "Molecular chemoprevention by selenium: a genomic approach." *Mutat Res* **591**(1-2): 224-236.
- Esworthy, R. S., M. A. Baker, et al. (1995). "Expression of selenium-dependent glutathione peroxidase in human breast tumor cell lines." *Cancer Res* **55**(4): 957-962.
- Esworthy, R. S., L. Yang, et al. (2005). "Epithelium-specific glutathione peroxidase, Gpx2, is involved in the prevention of intestinal inflammation in selenium-deficient mice." *J Nutr* **135**(4): 740-745.
- Etminan, M., J. M. FitzGerald, et al. (2005). "Intake of selenium in the prevention of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis." *Cancer Causes Control* **16**(9): 1125-1131.
- Fagegaltier, D., N. Hubert, et al. (2000). "Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation." *EMBO J* **19**(17): 4796-4805.
- Fang, W., M. L. Goldberg, et al. (2010). "Functional and physical interaction between the selenium-binding protein 1 (SBP1) and the glutathione peroxidase 1 selenoprotein." *Carcinogenesis* **31**(8): 1360-1366.
- Fisher, E. R., S. M. Paik, et al. (1989). "Prognostic significance of eosinophils and mast cells in rectal cancer: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (protocol R-01)." *Hum Pathol* **20**(2): 159-163.
- Flohé, L., W. A. Günzler, et al. (1973). "Glutathione peroxidase: a selenoenzyme." *FEBS Lett* **32**(1): 132-134.
- Fodde, R. and R. Smits (2001). "Disease model: familial adenomatous polyposis." *Trends Mol Med* **7**(8): 369-373.

- Forceville, X., V. Mostert, et al. (2009). "Selenoprotein P, rather than glutathione peroxidase, as a potential marker of septic shock and related syndromes." *Eur Surg Res* **43**(4): 338-347.
- Garcia-Rodriguez, L. A. and C. Huerta-Alvarez (2001). "Reduced risk of colorectal cancer among long-term users of aspirin and nonaspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs." *Epidemiology* **12**(1): 88-93.
- Ge, K., A. Xue, et al. (1983). "Keshan disease-an endemic cardiomyopathy in China." *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **401**(1): 1-15.
- Ge, K. and G. Yang (1993). "The epidemiology of selenium deficiency in the etiological study of endemic diseases in China." *Am J Clin Nutr* **57**(2 Suppl): 259S-263S.
- Gladyshev, V. N., K. T. Jeang, et al. (1996). "Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(12): 6146-6151.
- Gladyshev, V. N., K. T. Jeang, et al. (1998). "A new human selenium-containing protein. Purification, characterization, and cDNA sequence." *J Biol Chem* **273**(15): 8910-8915.
- Gonzalez-Moreno, O., N. Boque, et al. (2011). "Selenoprotein-P is down-regulated in prostate cancer, which results in lack of protection against oxidative damage." *Prostate* **71**(8): 824-834.
- Gounaris, E., N. R. Blatner, et al. (2009). "T-regulatory cells shift from a protective anti-inflammatory to a cancer-promoting proinflammatory phenotype in polyposis." *Cancer Res* **69**(13): 5490-5497.
- Gounaris, E., S. E. Erdman, et al. (2007). "Mast cells are an essential hematopoietic component for polyp development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(50): 19977-19982.
- Grivennikov, S. I. and M. Karin (2010). "Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer." *Cytokine Growth Factor Rev* **21**(1): 11-19.
- Grogan, T. M., C. Fenoglio-Prieser, et al. (2000). "Thioredoxin, a putative oncogene product, is overexpressed in gastric carcinoma and associated with increased proliferation and increased cell survival." *Hum Pathol* **31**(4): 475-481.
- Gulubova, M. and T. Vlaykova (2009). "Prognostic significance of mast cell number and microvascular density for the survival of patients with primary colorectal cancer." *J Gastroenterol Hepatol* **24**(7): 1265-1275.
- Hanif, R., A. Pittas, et al. (1996). "Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway." *Biochem Pharmacol* **52**(2): 237-245.

- Hansen, R., M. Saebo, et al. (2005). "GPX Pro198Leu and OGG1 Ser326Cys polymorphisms and risk of development of colorectal adenomas and colorectal cancer." *Cancer Lett* **229**(1): 85-91.
- Hatfield, D., B. J. Lee, et al. (1991). "Selenium induces changes in the selenocysteine tRNA[Ser]Sec population in mammalian cells." *Nucleic Acids Res* **19**(4): 939-943.
- Hatfield, D. L. and V. N. Gladyshev (2002). "How selenium has altered our understanding of the genetic code." *Mol Cell Biol* **22**(11): 3565-3576.
- Hesketh, J. (2008). "Nutrigenomics and selenium: gene expression patterns, physiological targets, and genetics." *Annu Rev Nutr* **28**: 157-177.
- Hesse-Bahr, K., I. Dreher, et al. (2000). "The influence of the cytokines Il-1beta and INFgamma on the expression of selenoproteins in the human hepatocarcinoma cell line HepG2." *Biofactors* **11**(1-2): 83-85.
- Hill, K. E., J. Zhou, et al. (2003). "Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse." *J Biol Chem* **278**(16): 13640-13646.
- Hintze, K. J., K. A. Wald, et al. (2003). "Thioredoxin reductase in human hepatoma cells is transcriptionally regulated by sulforaphane and other electrophiles via an antioxidant response element." *J Nutr* **133**(9): 2721-2727.
- Ho, Y. S., J. L. Magnenat, et al. (1997). "Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia." *J Biol Chem* **272**(26): 16644-16651.
- Hoefig, C. S., K. Renko, et al. (2011). "Comparison of different selenocompounds with respect to nutritional value vs. toxicity using liver cells in culture." *J Nutr Biochem* **22**(10): 945-955.
- Hoeflich, J., B. Hollenbach, et al. (2010). "The choice of biomarkers determines the selenium status in young German vegans and vegetarians." *Br J Nutr* **104**(11): 1601-1604.
- Hollenbach, B., N. G. Morgenthaler, et al. (2008). "New assay for the measurement of selenoprotein P as a sepsis biomarker from serum." *J Trace Elem Med Biol* **22**(1): 24-32.
- Hu, Y., R. V. Benya, et al. (2005). "Allelic loss of the gene for the GPX1 selenium-containing protein is a common event in cancer." *J Nutr* **135**(12 Suppl): 3021S-3024S.
- Hu, Y. J. and A. M. Diamond (2003). "Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: loss of heterozygosity and allelic differences in the response to selenium." *Cancer Res* **63**(12): 3347-3351.
- Hu, Y. J., M. E. Dolan, et al. (2004). "Allelic loss at the GPx-1 locus in cancer of the head and neck." *Biol Trace Elem Res* **101**(2): 97-106.

- Hu, Y. J., K. V. Korotkov, et al. (2001). "Distribution and functional consequences of nucleotide polymorphisms in the 3'-untranslated region of the human Sep15 gene." *Cancer Res* **61**(5): 2307-2310.
- Huang, B., Z. Lei, et al. (2008). "SCF-mediated mast cell infiltration and activation exacerbate the inflammation and immunosuppression in tumor microenvironment." *Blood* **112**(4): 1269-1279.
- Huang, K. C., D. C. Park, et al. (2006). "Selenium binding protein 1 in ovarian cancer." *Int J Cancer* **118**(10): 2433-2440.
- Ichimura, Y., T. Habuchi, et al. (2004). "Increased risk of bladder cancer associated with a glutathione peroxidase 1 codon 198 variant." *J Urol* **172**(2): 728-732.
- Ip, C. (1998). "Lessons from basic research in selenium and cancer prevention." *J Nutr* **128**(11): 1845-1854.
- Ip, C., M. Birringer, et al. (2000). "Chemical speciation influences comparative activity of selenium-enriched garlic and yeast in mammary cancer prevention." *J Agric Food Chem* **48**(9): 4452.
- Ip, C. and H. E. Ganther (1990). "Activity of methylated forms of selenium in cancer prevention." *Cancer Res* **50**(4): 1206-1211.
- Irons, R., P. A. Tsuji, et al. (2010). "Deficiency in the 15-kDa selenoprotein inhibits tumorigenicity and metastasis of colon cancer cells." *Cancer Prev Res (Phila)* **3**(5): 630-639.
- Jakupoglu, C., G. K. Przemek, et al. (2005). "Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development." *Mol Cell Biol* **25**(5): 1980-1988.
- Jen, J., S. M. Powell, et al. (1994). "Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions." *Cancer Res* **54**(21): 5523-5526.
- Jiang, C., H. Ganther, et al. (2000). "Monomethyl selenium--specific inhibition of MMP-2 and VEGF expression: implications for angiogenic switch regulation." *Mol Carcinog* **29**(4): 236-250.
- Jiang, C., H. Hu, et al. (2004). "Selenite-induced p53 Ser-15 phosphorylation and caspase-mediated apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells." *Mol Cancer Ther* **3**(7): 877-884.
- Kaech, M., J. Lu, et al. (1997). "Differential induction of growth arrest inducible genes by selenium compounds." *Biochem Pharmacol* **53**(7): 921-926.
- Kakolyris, S., A. Giatromanolaki, et al. (2001). "Thioredoxin expression is associated with lymph node status and prognosis in early operable non-small cell lung cancer." *Clin Cancer Res* **7**(10): 3087-3091.

- Kaplan, D. H., V. Shankaran, et al. (1998). "Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(13): 7556-7561.
- Karin, M. (2006). "Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression." *Nature* **441**(7092): 431-436.
- Karin, M. and F. R. Greten (2005). "NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression." *Nat Rev Immunol* **5**(10): 749-759.
- Kawahara, N., T. Tanaka, et al. (1996). "Enhanced coexpression of thioredoxin and high mobility group protein 1 genes in human hepatocellular carcinoma and the possible association with decreased sensitivity to cisplatin." *Cancer Res* **56**(23): 5330-5333.
- Kim, H., H. J. Kang, et al. (2006). "Suppression of human selenium-binding protein 1 is a late event in colorectal carcinogenesis and is associated with poor survival." *Proteomics* **6**(11): 3466-3476.
- Kipp, A., A. Banning, et al. (2007). "Activation of the glutathione peroxidase 2 (GPx2) promoter by beta-catenin." *Biol Chem* **388**(10): 1027-1033.
- Kipp, A., A. Banning, et al. (2009). "Four selenoproteins, protein biosynthesis, and Wnt signalling are particularly sensitive to limited selenium intake in mouse colon." *Mol Nutr Food Res* **53**(12): 1561-1572.
- Klein, E. A., I. M. Thompson, et al. (2000). "SELECT: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial: rationale and design." *Prostate Cancer Prostatic Dis* **3**(3): 145-151.
- Köhrle, J. (2002). "Iodothyronine deiodinases." *Methods Enzymol* **347**: 125-167.
- Köhrle, J., F. Jakob, et al. (2005). "Selenium, the thyroid, and the endocrine system." *Endocr Rev* **26**(7): 944-984.
- Kryukov, G. V., S. Castellano, et al. (2003). "Characterization of mammalian selenoproteomes." *Science* **300**(5624): 1439-1443.
- Kumaraswamy, E., A. Malykh, et al. (2000). "Structure-expression relationships of the 15-kDa selenoprotein gene. Possible role of the protein in cancer etiology." *J Biol Chem* **275**(45): 35540-35547.
- Labayle, D., D. Fischer, et al. (1991). "Sulindac causes regression of rectal polyps in familial adenomatous polyposis." *Gastroenterology* **101**(3): 635-639.
- Labunskyy, V. M., A. D. Ferguson, et al. (2005). "A novel cysteine-rich domain of Sep15 mediates the interaction with UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase." *J Biol Chem* **280**(45): 37839-37845.

- Labunskyy, V. M., D. L. Hatfield, et al. (2007). "The Sep15 protein family: roles in disulfide bond formation and quality control in the endoplasmic reticulum." *IUBMB Life* **59**(1): 1-5.
- Lamprecht, S. A. and M. Lipkin (2003). "Mouse models of gastrointestinal tumorigenesis for dietary cancer prevention studies." *Nutr Rev* **61**(7): 255-258.
- Lanfear, J., J. Fleming, et al. (1993). "Different patterns of regulation of the genes encoding the closely related 56 kDa selenium- and acetaminophen-binding proteins in normal tissues and during carcinogenesis." *Carcinogenesis* **14**(3): 335-340.
- Leder, L. D. (1970). "[Acute myelo-monocytic leukemia with atypical naphthol-AS-D-chloracetate esterase positive eosinophils]." *Acta Haematol* **44**(1): 52-62.
- Lee, B. J., P. J. Worland, et al. (1989). "Identification of a selenocysteyl-tRNA(Ser) in mammalian cells that recognizes the nonsense codon, UGA." *J Biol Chem* **264**(17): 9724-9727.
- Lee, O. J., R. Schneider-Stock, et al. (2005). "Hypermethylation and loss of expression of glutathione peroxidase-3 in Barrett's tumorigenesis." *Neoplasia* **7**(9): 854-861.
- Lee, S. R., J. R. Kim, et al. (1999). "Molecular cloning and characterization of a mitochondrial selenocysteine-containing thioredoxin reductase from rat liver." *J Biol Chem* **274**(8): 4722-4734.
- Lippman, S. M., E. A. Klein, et al. (2009). "Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT)." *JAMA* **301**(1): 39-51.
- Liu, Y., M. Chiba, et al. (2002). "[Keshan disease--a review from the aspect of history and etiology]." *Nippon Eiseigaku Zasshi* **56**(4): 641-648.
- Lodygin, D., A. Epanchintsev, et al. (2005). "Functional epigenomics identifies genes frequently silenced in prostate cancer." *Cancer Res* **65**(10): 4218-4227.
- Logan, C. Y. and R. Nusse (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 781-810.
- Low, S. C., E. Grundner-Culemann, et al. (2000). "SECIS-SBP2 interactions dictate selenocysteine incorporation efficiency and selenoprotein hierarchy." *EMBO J* **19**(24): 6882-6890.
- Low, S. C., J. W. Harney, et al. (1995). "Cloning and functional characterization of human selenophosphate synthetase, an essential component of selenoprotein synthesis." *J Biol Chem* **270**(37): 21659-21664.
- Ma, S., K. E. Hill, et al. (2002). "Mass spectrometric characterization of full-length rat selenoprotein P and three isoforms shortened at the C terminus. Evidence that three UGA codons in the mRNA open reading frame have alternative functions of

- specifying selenocysteine insertion or translation termination." *J Biol Chem* **277**(15): 12749-12754.
- MacDonald, B. T., K. Tamai, et al. (2009). "Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases." *Dev Cell* **17**(1): 9-26.
- MacFarquhar, J. K., D. L. Broussard, et al. (2010). "Acute selenium toxicity associated with a dietary supplement." *Arch Intern Med* **170**(3): 256-261.
- Makropoulos, V., T. Bruning, et al. (1996). "Selenium-mediated inhibition of transcription factor NF-kappa B and HIV-1 LTR promoter activity." *Arch Toxicol* **70**(5): 277-283.
- Marincola, F. M., E. M. Jaffee, et al. (2000). "Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance." *Adv Immunol* **74**: 181-273.
- Matsui, M., M. Oshima, et al. (1996). "Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene." *Dev Biol* **178**(1): 179-185.
- Matsutani, Y., A. Yamauchi, et al. (2001). "Inverse correlation of thioredoxin expression with estrogen receptor- and p53-dependent tumor growth in breast cancer tissues." *Clin Cancer Res* **7**(11): 3430-3436.
- Meplan, C., L. K. Crosley, et al. (2007). "Genetic polymorphisms in the human selenoprotein P gene determine the response of selenoprotein markers to selenium supplementation in a gender-specific manner (the SELGEN study)." *FASEB J* **21**(12): 3063-3074.
- Meyer, H. A., T. Endermann, et al. (2011). "Abstracts 2.Symposium "Urologische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Urologie": P 1.2 Selenoprotein P als Tumormarker bei urogenitalen Tumoren." *Der Urologe*, Springer Verlag 2011 **50**: 88.
- Meyer, H. A., B. Hollenbach, et al. (2009). "Reduced serum selenoprotein P concentrations in German prostate cancer patients." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **18**(9): 2386-2390.
- Miranda-Vizueté, A., A. E. Damdimopoulos, et al. (1999). "Human mitochondrial thioredoxin reductase cDNA cloning, expression and genomic organization." *Eur J Biochem* **261**(2): 405-412.
- Molin, D., A. Edstrom, et al. (2002). "Mast cell infiltration correlates with poor prognosis in Hodgkin's lymphoma." *Br J Haematol* **119**(1): 122-124.
- Moreno-Reyes, R., C. Suetens, et al. (1998). "Kashin-Beck osteoarthropathy in rural Tibet in relation to selenium and iodine status." *N Engl J Med* **339**(16): 1112-1120.
- Moriarty, P. M., C. C. Reddy, et al. (1998). "Selenium deficiency reduces the abundance of mRNA for Se-dependent glutathione peroxidase 1 by a UGA-dependent

- mechanism likely to be nonsense codon-mediated decay of cytoplasmic mRNA." *Mol Cell Biol* **18**(5): 2932-2939.
- Mork, H., M. Scheurlen, et al. (2003). "Glutathione peroxidase isoforms as part of the local antioxidative defense system in normal and Barrett's esophagus." *Int J Cancer* **105**(3): 300-304.
- Mostert, V., I. Dreher, et al. (1999). "Transforming growth factor-beta1 inhibits expression of selenoprotein P in cultured human liver cells." *FEBS Lett* **460**(1): 23-26.
- Murdoch, C., M. Muthana, et al. (2008). "The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis." *Nat Rev Cancer* **8**(8): 618-631.
- Naito, Y., K. Saito, et al. (1998). "CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer." *Cancer Res* **58**(16): 3491-3494.
- Nakayama, A., K. E. Hill, et al. (2007). "All regions of mouse brain are dependent on selenoprotein P for maintenance of selenium." *J Nutr* **137**(3): 690-693.
- Nonn, L., R. R. Williams, et al. (2003). "The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice." *Mol Cell Biol* **23**(3): 916-922.
- Olson, G. E., V. P. Winfrey, et al. (2008). "Megalin mediates selenoprotein P uptake by kidney proximal tubule epithelial cells." *J Biol Chem* **283**(11): 6854-6860.
- Olson, G. E., V. P. Winfrey, et al. (2005). "Selenoprotein P is required for mouse sperm development." *Biol Reprod* **73**(1): 201-211.
- Park, C. M., P. E. Reid, et al. (1987). "A simple, practical 'swiss roll' method of preparing tissues for paraffin or methacrylate embedding." *J Microsc* **145**(Pt 1): 115-120.
- Peters, U., N. Chatterjee, et al. (2008). "Variation in the selenoenzyme genes and risk of advanced distal colorectal adenoma." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**(5): 1144-1154.
- Pfaffl, M. W., G. W. Horgan, et al. (2002). "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." *Nucleic Acids Res* **30**(9): e36.
- Piazza, G. A., A. L. Rahm, et al. (1995). "Antineoplastic drugs sulindac sulfide and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis." *Cancer Res* **55**(14): 3110-3116.
- Porat, A., Y. Sagiv, et al. (2000). "A 56-kDa selenium-binding protein participates in intra-Golgi protein transport." *J Biol Chem* **275**(19): 14457-14465.
- Poutahidis, T., V. P. Rao, et al. (2009). "CD4+ lymphocytes modulate prostate cancer progression in mice." *Int J Cancer* **125**(4): 868-878.
- Powell, S. M., N. Zilz, et al. (1992). "APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis." *Nature* **359**(6392): 235-237.

- Prasad, M. P., M. A. Mukundan, et al. (1995). "Micronuclei and carcinogen DNA adducts as intermediate end points in nutrient intervention trial of precancerous lesions in the oral cavity." *Eur J Cancer B Oral Oncol* **31B**(3): 155-159.
- Raffel, J., A. K. Bhattacharyya, et al. (2003). "Increased expression of thioredoxin-1 in human colorectal cancer is associated with decreased patient survival." *J Lab Clin Med* **142**(1): 46-51.
- Rao, C. V., I. Cooma, et al. (2000). "Chemoprevention of familial adenomatous polyposis development in the APC(min) mouse model by 1,4-phenylene bis(methylene)selenocyanate." *Carcinogenesis* **21**(4): 617-621.
- Rao, L., B. Puschner, et al. (2001). "Gene expression profiling of low selenium status in the mouse intestine: transcriptional activation of genes linked to DNA damage, cell cycle control and oxidative stress." *J Nutr* **131**(12): 3175-3181.
- Ratnasinghe, D., J. A. Tangrea, et al. (2000). "Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk." *Cancer Res* **60**(22): 6381-6383.
- Rayman, M. P. (2000). "The importance of selenium to human health." *Lancet* **356**(9225): 233-241.
- Rayman, M. P. (2005). "Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action." *Proc Nutr Soc* **64**(4): 527-542.
- Read, R., T. Bellew, et al. (1990). "Selenium and amino acid composition of selenoprotein P, the major selenoprotein in rat serum." *J Biol Chem* **265**(29): 17899-17905.
- Renko, K., P. J. Hofmann, et al. (2009). "Down-regulation of the hepatic selenoprotein biosynthesis machinery impairs selenium metabolism during the acute phase response in mice." *FASEB J* **23**(6): 1758-1765.
- Ribatti, D. and E. Crivellato (2009). "The controversial role of mast cells in tumor growth." *Int Rev Cell Mol Biol* **275**: 89-131.
- Ribatti, D. and E. Crivellato (2011). "Mast cells, angiogenesis and cancer." *Adv Exp Med Biol* **716**: 270-288.
- Ribatti, D., E. Crivellato, et al. (2004). "Mast cell contribution to angiogenesis related to tumour progression." *Clin Exp Allergy* **34**(11): 1660-1664.
- Riese, C., M. Michaelis, et al. (2006). "Selenium-dependent pre- and posttranscriptional mechanisms are responsible for sexual dimorphic expression of selenoproteins in murine tissues." *Endocrinology* **147**(12): 5883-5892.
- Rundlof, A. K. and E. S. Arner (2004). "Regulation of the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase 1 in relation to cellular phenotype, growth, and signaling events." *Antioxid Redox Signal* **6**(1): 41-52.

- Saito, Y., T. Hayashi, et al. (1999). "Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein p." *J Biol Chem* **274**(5): 2866-2871.
- Saito, Y., N. Sato, et al. (2004). "Domain structure of bi-functional selenoprotein P." *Biochem J* **381**(Pt 3): 841-846.
- Schauder, P. and G. Ollenschläger (2006). "Ernährungsmedizin: Prävention und Therapie." Urban & Fischer Bei Elsevier.
- Schomburg, L. (2007). "Selenium in intensive care (SIC) study: the XX files are still unresolved." *Crit Care Med* **35**(3): 995-996; author reply 996-997.
- Schomburg, L. (2011). "Selenium, selenoproteins and the thyroid gland: interactions in health and disease." *Nat Rev Endocrinol*.
- Schomburg, L. and U. Schweizer (2009). "Hierarchical regulation of selenoprotein expression and sex-specific effects of selenium." *Biochim Biophys Acta* **1790**(11): 1453-1462.
- Schomburg, L., U. Schweizer, et al. (2003). "Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues." *Biochem J* **370**(Pt 2): 397-402.
- Schrauzer, G. N. (2001). "Nutritional selenium supplements: product types, quality, and safety." *J Am Coll Nutr* **20**(1): 1-4.
- Schrauzer, G. N., D. A. White, et al. (1977). "Cancer mortality correlation studies--III: statistical associations with dietary selenium intakes." *Bioinorg Chem* **7**(1): 23-31.
- Schwarz, K. (1951). "A hitherto unrecognized factor against dietary necrotic liver degeneration in American yeast (factor3)." *Proc Soc Exp Biol Med* **78**(3): 852-856.
- Schwarz, K. and C. M. Foltz (1958). "Factor 3 activity of selenium compounds." *J Biol Chem* **233**(1): 245-251.
- Schweizer, U., M. Michaelis, et al. (2004). "Efficient selenium transfer from mother to offspring in selenoprotein-P-deficient mice enables dose-dependent rescue of phenotypes associated with selenium deficiency." *Biochem J* **378**(Pt 1): 21-26.
- Schweizer, U., L. Schomburg, et al. (2004). "The neurobiology of selenium: lessons from transgenic mice." *J Nutr* **134**(4): 707-710.
- Seo, Y. R., M. R. Kelley, et al. (2002). "Selenomethionine regulation of p53 by a ref1-dependent redox mechanism." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(22): 14548-14553.
- Shamberger, R. J. and D. V. Frost (1969). "Possible protective effect of selenium against human cancer." *Can Med Assoc J* **100**(14): 682.
- Shen, T. Y. and C. A. Winter (1977). "Chemical and biological studies on indomethacin, sulindac and their analogs." *Adv Drug Res* **12**: 90-245.

- Shoemaker, A. R., A. R. Moser, et al. (1995). "N-ethyl-N-nitrosourea treatment of multiple intestinal neoplasia (Min) mice: age-related effects on the formation of intestinal adenomas, cystic crypts, and epidermoid cysts." *Cancer Res* **55**(19): 4479-4485.
- Small-Howard, A., N. Morozova, et al. (2006). "Supramolecular complexes mediate selenocysteine incorporation in vivo." *Mol Cell Biol* **26**(6): 2337-2346.
- Starkey, J. R., P. K. Crowle, et al. (1988). "Mast-cell-deficient W/W^v mice exhibit a decreased rate of tumor angiogenesis." *Int J Cancer* **42**(1): 48-52.
- Steinbrenner, H., L. Alili, et al. (2006). "Involvement of selenoprotein P in protection of human astrocytes from oxidative damage." *Free Radic Biol Med* **40**(9): 1513-1523.
- Steinbrenner, H., E. Bilgic, et al. (2006). "Selenoprotein P protects endothelial cells from oxidative damage by stimulation of glutathione peroxidase expression and activity." *Free Radic Res* **40**(9): 936-943.
- Stoedter, M., K. Renko, et al. (2010). "Selenium controls the sex-specific immune response and selenoprotein expression during the acute-phase response in mice." *Biochem J* **429**(1): 43-51.
- Sudre, P. and F. Mathieu (2001). "Kashin-Beck disease: from etiology to prevention or from prevention to etiology?" *Int Orthop* **25**(3): 175-179.
- Sun, Q. A., L. Kirnarsky, et al. (2001). "Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(7): 3673-3678.
- Sutton, A., P. Nahon, et al. (2006). "Genetic polymorphisms in antioxidant enzymes modulate hepatic iron accumulation and hepatocellular carcinoma development in patients with alcohol-induced cirrhosis." *Cancer Res* **66**(5): 2844-2852.
- Suzuki, K. T. and Y. Ogra (2002). "Metabolic pathway for selenium in the body: speciation by HPLC-ICP MS with enriched Se." *Food Addit Contam* **19**(10): 974-983.
- Takahashi, K., M. Akasaka, et al. (1990). "Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA sequences." *J Biochem* **108**(2): 145-148.
- Takata, Y., A. R. Kristal, et al. (2011). "Serum Selenium, Genetic Variation in Selenoenzymes, and Risk of Colorectal Cancer: Primary Analysis from the Women's Health Initiative Observational Study and Meta-analysis." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **20**(9): 1822-1830.
- Tamura, T. and T. C. Stadtman (1996). "A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(3): 1006-1011.
- Thomas, J. P. and A. W. Girotti (1988). "Photooxidation of cell membranes in the presence of hematoporphyrin derivative: reactivity of phospholipid and cholesterol hydroperoxides with glutathione peroxidase." *Biochim Biophys Acta* **962**(3): 297-307.

- Thompson, H. J., S. Briggs, et al. (1995). "Inhibition of mammary carcinogenesis in rats by sulfone metabolite of sulindac." *J Natl Cancer Inst* **87**(16): 1259-1260.
- Thomson, C. D., M. F. Robinson, et al. (1993). "Long-term supplementation with selenate and selenomethionine: selenium and glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) in blood components of New Zealand women." *Br J Nutr* **69**(2): 577-588.
- Tonelli, F., R. Valanzano, et al. (2000). "Long-term treatment with sulindac in familial adenomatous polyposis: is there an actual efficacy in prevention of rectal cancer?" *J Surg Oncol* **74**(1): 15-20.
- Traulsen, H., H. Steinbrenner, et al. (2004). "Selenoprotein P protects low-density lipoprotein against oxidation." *Free Radic Res* **38**(2): 123-128.
- Unni, E., U. Singh, et al. (2001). "Se-methylselenocysteine activates caspase-3 in mouse mammary epithelial tumor cells in vitro." *Biofactors* **14**(1-4): 169-177.
- Ursini, F., S. Heim, et al. (1999). "Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation." *Science* **285**(5432): 1393-1396.
- Utomo, A., X. Jiang, et al. (2004). "Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells." *J Biol Chem* **279**(42): 43522-43529.
- Valentine, W. M., T. W. Abel, et al. (2008). "Neurodegeneration in mice resulting from loss of functional selenoprotein P or its receptor apolipoprotein E receptor 2." *J Neuropathol Exp Neurol* **67**(1): 68-77.
- Valentine, W. M., K. E. Hill, et al. (2005). "Brainstem axonal degeneration in mice with deletion of selenoprotein p." *Toxicol Pathol* **33**(5): 570-576.
- Verma, S., F. W. Hoffmann, et al. (2011). "Selenoprotein K knockout mice exhibit deficient calcium flux in immune cells and impaired immune responses." *J Immunol* **186**(4): 2127-2137.
- Vernet, P., N. Rigaudiere, et al. (1996). "In vitro expression of a mouse tissue specific glutathione-peroxidase-like protein lacking the selenocysteine can protect stably transfected mammalian cells against oxidative damage." *Biochem Cell Biol* **74**(1): 125-131.
- Vernie, L. N. (1984). "Selenium in carcinogenesis." *Biochim Biophys Acta* **738**(4): 203-217.
- Vunta, H., B. J. Belda, et al. (2008). "Selenium attenuates pro-inflammatory gene expression in macrophages." *Mol Nutr Food Res* **52**(11): 1316-1323.
- Vunta, H., F. Davis, et al. (2007). "The anti-inflammatory effects of selenium are mediated through 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in macrophages." *J Biol Chem* **282**(25): 17964-17973.

- Waddell, W. R., G. F. Ganser, et al. (1989). "Sulindac for polyposis of the colon." *Am J Surg* **157**(1): 175-179.
- Waddell, W. R. and R. W. Loughry (1983). "Sulindac for polyposis of the colon." *J Surg Oncol* **24**(1): 83-87.
- Wang, Z., H. Hu, et al. (2008). "Methylseleninic acid inhibits microvascular endothelial G1 cell cycle progression and decreases tumor microvessel density." *Int J Cancer* **122**(1): 15-24.
- Waters, D. J., E. C. Chiang, et al. (2004). "Making sense of sex and supplements: differences in the anticarcinogenic effects of selenium in men and women." *Mutat Res* **551**(1-2): 91-107.
- Wawrzynska, L., A. Sakowicz, et al. (2003). "The conversion of thyroxine to triiodothyronine in the lung: comparison of activity of type I iodothyronine 5' deiodinase in lung cancer with peripheral lung tissues." *Monaldi Arch Chest Dis* **59**(2): 140-145.
- Welsh, T. J., R. H. Green, et al. (2005). "Macrophage and mast-cell invasion of tumor cell islets confers a marked survival advantage in non-small-cell lung cancer." *J Clin Oncol* **23**(35): 8959-8967.
- Whanger, P. D. (2004). "Selenium and its relationship to cancer: an update." *Br J Nutr* **91**(1): 11-28.
- Whanger, P. D., M. A. Beilstein, et al. (1988). "Blood selenium and glutathione peroxidase activity of populations in New Zealand, Oregon, and South Dakota." *FASEB J* **2**(14): 2996-3002.
- Wingler, K. and R. Brigelius-Flohe (1999). "Gastrointestinal glutathione peroxidase." *Biofactors* **10**(2-3): 245-249.
- Wolffram, S. (1995). "[Mechanisms of intestinal absorption of selenium]." *Med Klin (Munich)* **90 Suppl 1**: 1-5.
- Xia, Y., K. E. Hill, et al. (2005). "Effectiveness of selenium supplements in a low-selenium area of China." *Am J Clin Nutr* **81**(4): 829-834.
- Xu, X. M., B. A. Carlson, et al. (2007). "Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes." *PLoS Biol* **5**(1): e4.
- Xu, X. M., H. Mix, et al. (2005). "Evidence for direct roles of two additional factors, SECp43 and soluble liver antigen, in the selenoprotein synthesis machinery." *J Biol Chem* **280**(50): 41568-41575.
- Yang, G. Q., S. Z. Wang, et al. (1983). "Endemic selenium intoxication of humans in China." *Am J Clin Nutr* **37**(5): 872-881.

- Yang, M. and A. J. Sytkowski (1998). "Differential expression and androgen regulation of the human selenium-binding protein gene hSP56 in prostate cancer cells." *Cancer Res* **58**(14): 3150-3153.
- Yoon, S. O., M. M. Kim, et al. (2001). "Inhibitory effect of selenite on invasion of HT1080 tumor cells." *J Biol Chem* **276**(23): 20085-20092.
- Yu, H., M. Kortylewski, et al. (2007). "Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment." *Nat Rev Immunol* **7**(1): 41-51.
- Yu, S. Y., W. G. Li, et al. (1989). "Chemoprevention trial of human hepatitis with selenium supplementation in China." *Biol Trace Elem Res* **20**(1-2): 15-22.
- Yu, S. Y., Y. J. Zhu, et al. (1991). "A preliminary report on the intervention trials of primary liver cancer in high-risk populations with nutritional supplementation of selenium in China." *Biol Trace Elem Res* **29**(3): 289-294.
- Zamamiri-Davis, F., Y. Lu, et al. (2002). "Nuclear factor-kappaB mediates over-expression of cyclooxygenase-2 during activation of RAW 264.7 macrophages in selenium deficiency." *Free Radic Biol Med* **32**(9): 890-897.
- Zhang, W., G. Stoica, et al. (2000). "Modulation of tumor angiogenesis by stem cell factor." *Cancer Res* **60**(23): 6757-6762.
- Zhuo, H., A. H. Smith, et al. (2004). "Selenium and lung cancer: a quantitative analysis of heterogeneity in the current epidemiological literature." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**(5): 771-778.

Abkürzungsverzeichnis

Nicht aufgeführt sind nach dem deutschen Duden gebräuchliche Abkürzungen, physikalische Größen nach dem Internationalen Einheitensystem (SI = Système international d'unités) sowie chemische Verbindungen.

A, a	Adenin
AP-1	<i>Activator protein-1</i> (ein Transkriptionsfaktor)
APC/Apc	adenomatöse Polyposis coli
ApoER2	Apolipoprotein E-Rezeptor 2 (SEPP-Rezeptor)
ARE	antioxidatives Response-Element
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bidest.	<i>bidestillatus</i> (= doppelt destilliert)
bp	Basenpaare
C, c	Cytosin
CD	<i>cluster of differentiation</i> (= Unterscheidungsgruppen)
cDNA	<i>complementary DNA</i> (= komplementäre DNA)
CK	Caseinkinase
c-Kit	CD117, SCF-Rezeptor
c-Myc	zelluläres Myelocytomatose-Onkogen
COX/Cox	Cyclooxygenase
Cpa	Carboxypeptidase
Ct	<i>Cycle of threshold</i> (= Schwellenwertzyklus)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIO/Dio	Deiodase
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (= Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dvl	<i>Dishevelled</i>
EDTA	<i>Ethylendiaminetetraacetic acid</i> = Ethylendiamintetraessigsäure
eEFSec	Sec-spezifischer Elongationsfaktor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	lat.: und andere
FABP/Fabp	<i>Fatty acid binding protein</i>
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
fw	<i>forward</i> (= vorwärts)
G, g	Guanin
GPX/GPx	Glutathion-Peroxidase
GR	Glutathion-Reduktase

GS	Gleason-Score (Maß für die Tumorentartung)
GSH/GS-SG	Glutathion/Diglutathion
GSK	Glykogen Synthase Kinase
GTC	Guanidinisothiocyanat
HDAC	Histondeacetylase
HE	Hämatoxilin-Eosin
het	heterozygot
HepG2	humane Leberkrebszelllinie
IFN	Interferon
IL/II	Interleukin
<i>in vitro</i>	lat.: im Glas (außerhalb des lebenden Organismus)
<i>in vivo</i>	lat.: im lebendigen Organismus
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
L30	ein ribosomales Protein (Faktor für die Selenoproteinbiosynthese)
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i> (Verlust der Heterozygotie)
LRP	<i>Low density lipoprotein-related protein</i>
MAP	<i>Mitogen activated protein</i>
Mcp1	<i>monocyte chemotactic protein 1</i> (ein Chemokin)
Mcpt	<i>Mast cell protease</i> (= Mastzellprotease)
Met	Methionin
Min	multiple intestinale Neoplasien
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	<i>messenger RNA</i> (= Boten-RNA)
n	n-Wert = Stichprobengröße
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
Na ₂ SeO ₃	Natriumselenit
Na ₂ SeO ₄	Natriumselenat
NEM	<i>no evidence of malignancy</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i> (= ein Transkriptionsfaktor)
NGS	<i>Normal goat serum</i> = Ziegenserum
NK	Natürliche Killerzellen
NMD	<i>Nonsense mediated decay</i> (mRNA-Abbau bei vorzeitigem Stoppkodon)
NPC-Trial	<i>Nutritional Prevention of Cancer Trial</i>
NSAID	<i>Non steroidal antiinflammatory drug</i>
p	p-Wert = Signifikanzwert
p53	ein Transkriptionsfaktor/Tumorsuppressor
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (= phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (= Polymerasekettenreaktion)

pGPX	plasmatische GPX (GPX3)
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> (= Maß für die Wasserstoffionenaktivität)
ppm	<i>parts per million</i> (= Teile von 1 Million)
PRECISE	<i>Prevention of Cancer by Intervention with Selenium</i>
PSTK	Phosphoseryl-tRNA-Kinase
qPCR	<i>quantitative Real Time-PCR</i>
RDA	<i>Recommended dietary allowance</i> (= empfohlene Tagesdosis)
Reg-1	<i>Regenerating islet-derived 1</i> (= ein Transkriptionsfaktor)
REST	<i>Relative Expression Software Tool</i> (qPCR-Analysesoftware)
rev	<i>reverse</i> (= rückwärts, entgegengesetzt)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (= Ribonukleinsäure)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RR	Relatives Risiko
RT	Raumtemperatur
rT3	<i>reverse T3</i>
SBP1	<i>selenium binding protein 1</i> (= selenbindendes Protein 1)
SBP2	<i>SECIS binding protein 2</i>
SCF	<i>stem cell factor</i> (Wachstumsfaktor für Mastzellen)
SD	<i>standard deviation</i> (= Standardabweichung)
Se	Selen
SECIS	Selenocystein Insertionssequenz
Secp43	ein RNA-bindendes Protein (Faktor für die Selenoproteinbiosynthese)
SecS	Selenocystein-Synthase
SeCys	Selenocystein
SELECT	<i>Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial</i>
SELENBP	<i>Selenium binding protein</i>
SELX/SeIX	Selenoprotein X
SEM	<i>Standard error of mean</i> (= Standardfehler)
SeMCYS	Se-Methylselenocystein
SeMet	Selenomethionin
SeO ₃ ²⁻	Selenit
SeO ₄ ²⁻	Selenat
SEPP/SepP	Selenoprotein P
SerS	Seryl-tRNA-Synthase
SLA	<i>soluble liver antigen</i> (Faktor für die Selenoproteinbiosynthese)
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SP	Signalpeptid
SPS2	Selenophosphat-Synthetase
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i> (= ein Transkriptionsfaktor)
T, t	Thymin
T3	3,3',5-Triiodothyronin

T4	3,3',5,5'-Tetraiodothyronin
TCF/Lef	<i>T-cell factor/Lymphoid enhancer factor</i> (= ein Transkriptionsfaktor)
TGF/Tgf	<i>Transforming growth factor</i> (= transformierender Wachstumsfaktor)
TGR	Thioredoxin-Glutaredoxin-Reduktase
TNF	Tumornekrosefaktor
TRCP	<i>Transducing repeat containing protein</i>
TRFA	Total-Reflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
tRNA ^{[Ser]^{Sec}}	Selenocystein beladene tRNA
TXN/Txn	Thioredoxin
TXNRD/TxnRd	Thioredoxin-Reduktase
U	<i>Unit</i> (= Einheit)
UGA	Basentriplett, Stoppkodon bei der Proteinbiosynthese
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> (Signalmolekül für Gefäßneubildung)
wt	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i> (= Gewichtsprozent)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Seite
Abb. 1.1: Berzelius.	1
Abb. 1.2: Das Ansehen des Selen im Wandel der Zeit.	1
Abb. 1.3: Der Metabolismus von Selen.	4
Abb. 1.4: Die tRNA ^{[Ser]Sec} -Synthese in Eukaryoten.	5
Abb. 1.5: Vereinfachte Darstellung der SeCys-Inkorporation in eine wachsende Polypeptidkette.	6
Abb. 1.6: Die Struktur des Selenoprotein P.	10
Abb. 1.7: Relatives Krebsrisiko (RR) der Studienteilnehmer der NPC-Studie.	13
Abb. 1.8: Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg.	18
Abb. 3.1: Darmpräparat einer <i>Apc</i> ^{Min/+} -Maus.	37
Abb. 3.2: Einfluss des <i>SepP</i> -Genotyps auf die Tumorigenese nach RDA-Diät.	38
Abb. 3.3: Einfluss des <i>SepP</i> -Genotyps auf Tumoranzahl und Gesamttumorfläche nach RDA-Diät.	39
Abb. 3.4: Einfluss einer Se-Supplementation auf die Tumorigenese in <i>Apc</i> ^{Min/+} -Mäusen.	40
Abb. 3.5: Einfluss einer Se-Supplementation auf Tumoranzahl und Gesamttumorfläche in <i>Apc</i> ^{Min/+} -Mäusen.	40
Abb. 3.6: Einfluss einer Se-Supplementation auf die Tumorigenese in <i>SepP</i> ^{+/-} <i>Apc</i> ^{Min/+} -Mäusen.	41
Abb. 3.7: Einfluss einer Se-Supplementation auf Tumoranzahl und Gesamttumorfläche in <i>SepP</i> ^{+/-} <i>Apc</i> ^{Min/+} -Mäusen.	42
Abb. 3.8: Se-Konzentration und pGPx-Aktivität im Serum von <i>Apc</i> ^{Min/+} - und <i>SepP</i> ^{+/-} <i>Apc</i> ^{Min/+} -Mäusen.	43
Abb. 3.9: Einfluss einer Se-Defizienz auf die Tumorigenese.	44
Abb. 3.10: Einfluss einer Se-Defizienz auf die Tumoranzahl und die Gesamttumorfläche.	44
Abb. 3.11: Einfluss einer Se-Supplementation als Therapie-Strategie auf die Tumorigenese.	46
Abb. 3.12: Einfluss einer Se-Therapie auf die Tumoranzahl und die Gesamttumorfläche.	46
Abb. 3.13: Einfluss einer Sulindac-Therapie auf die Tumorigenese.	47
Abb. 3.14: Einfluss einer Sulindac-Therapie auf die Tumoranzahl und die Gesamttumorfläche.	48

Abb. 3.15: Einfluss einer kombinierten Sulindac-Se-Therapie auf die Tumorigenese.	49
Abb. 3.16: Einfluss einer kombinierten Sulindac-Se-Therapie auf die Tumoranzahl und die Gesamttumorfläche.	50
Abb. 3.17: Vergleich des Se-Gehalts von Tumor und Normalgewebe.	51
Abb. 3.18: Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines <i>Apc^{Min/+}</i> -Darmschnitts.	57
Abb. 3.19: Einfluss von Selen und des <i>SeP</i> -Genotyps auf die Tumorentartung.	58
Abb. 3.20.: Anzahl der Mastzellen pro Tumorfläche in <i>Apc^{Min/+}</i> -Mäusen.	59
Abb. 3.21: Chloracetatesterase-Färbung von Darmparaffinschnitten Se-adäquat ernährter <i>Apc^{Min/+}</i> -Mäuse.	60
Abb. 3.22: Chloracetatesterase-Färbung von Darmparaffinschnitten Se-supplementierter <i>Apc^{Min/+}</i> -Mäuse.	61
Abb. 3.23: Vergleich der Chloracetatesterase-Färbung mit der CD117-Immunhistologie.	63
Abb. 3.24: Serumkonzentrationen von Mcp1 und Il10 im Serum von <i>Apc^{Min/+}</i> -Mäusen.	64
Abb. 3.25: Serumkonzentrationen von Tnf α und Il6 im Serum von <i>Apc^{Min/+}</i> -Mäusen.	65
Abb. 4.1: Serum-SEPP-Konzentrationen bei Prostatakrebspatienten und gesunden Kontrollen.	67
Abb. 4.2: Überlebensrate von Patienten mit Nierenzellkarzinom in Abhängigkeit zur Serum-SEPP-Konzentration.	68
Abb. 4.3: Aktive Formen von Sulindac.	73
Abb. 4.4: Korrelation zwischen Se-Status und Tumoranzahl bei <i>Apc^{Min/+}</i> -Mäusen.	80

Tabellenverzeichnis

Tabelle	Seite
Tab. 1.1: Humane Selenoproteine und ihre Funktion	11
Tab. 2.1: Verwendete Reaktionssysteme	21
Tab. 2.2: Verwendete Geräte	22
Tab. 2.3: Verwendete Software	23
Tab. 2.4: Verwendete Datenbanken	23
Tab. 2.5: Verwendete Primer für die Genotypisierung	26
Tab. 2.6: Verwendete Primer für die Real Time-PCR	31
Tab. 3.1: Differentielle Expression von Genen des Wnt-Signalweges im Tumorgewebe.	53
Tab. 3.2: Differentielle exprimierte Selenoproteingene im Tumorgewebe.	53
Tab. 3.3: Nicht differentielle exprimierte Selenoproteingene im Tumorgewebe.	54
Tab. 3.4: Differentielle Expression von SepP-Rezeptorgenen im Tumorgewebe.	54
Tab. 3.5: Differentielle Expression von Inflammationsmarkergenen im Tumorgewebe.	55
Tab. 3.6: Differentielle Expression Mastzell-spezifischer Gene im Tumorgewebe.	56

Publikationen

Behrends T*, **Endermann T***, Michaelis M*, Weichert W, Denkert C, Schweizer U, Köhrle J, Schomburg L. **Gene-nutrition interaction of selenoprotein P and selenium in intestinal tumorigenesis in *Apc*^{Min/+} mice.** *Proc Natl Acad Sci USA*. (* gleichberechtigte Erstautoren)
Manuskript in Vorbereitung

Meyer HA*, **Endermann T***, Stephan C, Jung K, Schomburg L. **Selenoprotein P declines in renal cancer and correlates to mortality risk.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. (* gleichberechtigte Erstautoren) Manuskript in Vorbereitung

Behrends T, Gralla O, Scharpf M, **Endermann T**, Hollenbach B, Schomburg L. **Selenoprotein P in seminal plasma as a new biomarker of sperm quality.** *Fertility & Sterility*. Manuskript in Vorbereitung

Spranger J, **Endermann T**, Behrends T, Stoedter M, Mai K, Schomburg L. **Selenoprotein P concentrations in a cohort of German patients with insulin insensitivity.** *J Clin Endocrinol Metab*. Manuskript in Vorbereitung

Gonzalez-Moreno O, Boque N, Redrado M, Milagro F, Campion J, **Endermann T**, Takahashi K, Saito Y, Catena R, Schomburg L, Calvo A. **Selenoprotein-P is down-regulated in prostate cancer, which results in lack of protection against oxidative damage.** *Prostate*. 2011 Jun 1;71(8):824-34

Steinbrecher A, Méplan C, Hesketh J, Schomburg L, **Endermann T**, Jansen E, Akesson B, Rohrmann S, Linseisen J. **Effects of selenium status and polymorphisms in selenoprotein genes on prostate cancer risk in a prospective study of European men.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010 Nov;19(11):2958-68

Neumann J, Schaale K, Farhat K, **Endermann T**, Ulmer AJ, Ehlers S, Reiling N. **Frizzled1 is a marker of inflammatory macrophages, and its ligand Wnt3a is involved in reprogramming *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages.** *FASEB J*. 2010 Nov;24(11):4599-612

Meyer HA, Hollenbach B, Stephan C, **Endermann T**, Morgenthaler NG, Cammann H, Köhrle J, Jung K, Schomburg L. **Reduced serum selenoprotein P concentrations in German prostate cancer patients.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Sep;18(9):2386-90

Baumeister S, **Endermann T**, Charpian S, Nyalwidhe J, Durantou C, Huber S, Kirk K, Lang F, Lingelbach K. **A biotin derivative blocks parasite induced novel permeation pathways in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes.** *Mol Biochem Parasitol*. 2003 Nov;132(1):35-45

Danksagung

Zu allererst möchte ich mich herzlich bei meinem Mentor und Betreuer dieser Arbeit, Prof. Dr. Lutz Schomburg, bedanken. Er hat nicht nur durch sein fachliches Wissen und seine zahlreichen Ideen (und Visionen) zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, vor allem hat er auch einen ganz enormen Anteil an der tollen Arbeitsatmosphäre innerhalb seiner Gruppe und im gesamten Institut (was letztlich auch mit der Auswahl seiner Mitarbeiter zusammenhängt, mein Bewerbungsgespräch werde ich jedenfalls nicht vergessen...). Das hat entscheidend dazu beigetragen, dass ich diese Arbeit mit viel Freude angefertigt habe.

Herrn Prof. Dr. Josef Köhrle danke ich sehr für die Möglichkeit, am Institut für Experimentelle Endokrinologie der Charité Berlin promovieren zu dürfen, sowie für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit. Auch für die vielen lehrreichen Veranstaltungen des Graduiertenkollegs 1208, an denen ich als assoziiertes Mitglied teilnehmen durfte, danke ich, auch wenn ich diese Möglichkeit sicher nicht immer vollständig ausgeschöpft habe.

Bei Frau Prof. Dr. Petra Knaus vom Fachbereich Biochemie der FU Berlin möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken, sowie für das Ausrichten der sehr interessanten Doktorandensymposien, die uns Doktoranden die Chance gaben, unsere Projekte zu präsentieren.

Erwähnen möchte ich an dieser Stelle auch die z.T. noch an entsprechender Stelle genannten Personen, die einen wichtigen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben, wie Herr Prof. Dr. Wilko Weichert und Herrn Prof. Dr. Carsten Denkert, die die Darmschnitte pathologisch begutachtet haben, Frau Dr. Ute Ungethüm, die die Genchips hybridisiert hat und Herr Dr. Ralf Kuban, der sehr hilfsbereit bei der Auswertung der Genchips war. Außerdem geht ein Dank an Herrn Dr. Michael Haack vom DIfE für seine unermüdliche Hilfe beim Futterpressen.

Eine Kooperation, die durch eine zufällige Begegnung im Tierstall zustande kam, hat mir sehr viel Spaß gemacht; deshalb geht ein großer Dank an Dr. Nadine Rohwer und Dr. Thorsten Cramer von der AG „Hypoxie und maligne Progression“ der Charité. Eine weitere erfolgreiche Zusammenarbeit verdanke ich Dr. Hellmuth Alexander Meyer aus der Klinik für Urologie der Charité.

Die selbsternannte „AG Krebs“ soll hier eine besondere Erwähnung finden: Zunächst ist Dr. Marten Michaelis zu nennen, der mit seiner Doktorarbeit den Weg für dieses Projekt

geeignet hat und meinen Mitstreiter Thomas Behrends und mich in die Geheimnisse der Darmpräparation eingeführt hat. Bei Vartitér Seher und Katja Schreiber möchte ich mich herzlich für die engagierte Mitarbeit bedanken: Ihr habt einen großen Anteil zu dieser Arbeit beigetragen. Bleibt noch der zweite Doktorand der „AG Krebs“, Thomas Behrends: dass aus einer Zusammenarbeit eine Freundschaft entstanden ist, spricht, glaube ich, für sich.

Nun möchte ich mich endlich auch bei allen anderen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des Instituts, die mich durch die Zeit der Doktorarbeit begleitet haben, für die wirklich tolle Stimmung am IEE bedanken und wähle dazu die alphabetische Reihenfolge (und habe bestimmt niemanden absichtlich vergessen): Doreen Braun, Jazmin Chiu, Tonka Djekic, Anja Fischbach, Carola Geiler, Dr. Inka Gotthardt, Dr. Johanna Höflich, Carolin Höfig, Antonia Hög, Dr. Peter Hofmann, Dr. Birgit Hollenbach, Dr. Anita Kinne, Antje Kretschmer, Jennifer Merz, Dr. Waldemar Minich, Dr. Susanne Piehl, Nicole Pietschmann, Dr. Kostja Renko, Dr. Eddy Rijntjes, Dr. Stefan Roth, Dr. Ulrich Schweizer, Sandra Seeher, Mette Stodter, Dr. Eva Wirth und Franziska Wohlgemuth.

Mit vielen von Euch verbinde ich neben der tollen und von Hilfsbereitschaft geprägten Zusammenarbeit und den gelegentlichen Grillfesten am Institut auch gemeinsame Kongressreisen, Unternehmungen wie Besuche bei diversen Sportveranstaltungen, Filmabende, Rockkonzerte, Weihnachtsmarkt, Waldläufe und Lauf-Events... Jeder, der sich hier angesprochen fühlt, soll wissen, dass ich auf eine Fortsetzung in Zukunft hoffe.

Meinen Eltern bin ich dankbar, weil es einfach ein gutes Gefühl ist, mir ihrer Unterstützung immer sicher sein zu können.

Tanja möchte ich danken, weil sie bei allen Entscheidungen, die letztlich auch zu dieser Arbeit geführt haben, hinter mir gestanden hat und mich „mitgenommen hat“ nach Berlin. Die nahe Zukunft verspricht wieder einmal spannend zu werden und ich bin sehr gespannt, wohin es uns als nächstes verschlägt.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Die Selen-abhängige Tumorigenese im Mausmodell: Einfluss des Selenoprotein P-Genotyps und des COX2-Hemmers Sulindac“ selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel verfasst habe.

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

Berlin, den.....

.....

Tobias Endermann