

**CharitéCentrum 4 für Therapieforschung**

**Institut für Experimentelle Endokrinologie**

Direktor: Prof. Dr. Josef Köhrle

**HABILITATIONSSCHRIFT**  
**Die Bedeutung von Selenoproteinen für die Entwicklung  
und Degeneration des Gehirns**

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach  
BIOCHEMIE

Vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät der  
Charité - Universitätsmedizin Berlin  
von  
Dr. rer. nat. Ulrich Schweizer

eingereicht im Oktober 2009

Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Prof. Dr. Katja Becker-Brandenburg

2. Gutachter: Prof. Dr. Konrad Beyreuther

öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag: 17. Mai 2010

## INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	5
1.1 Die Erweiterung des genetischen Codes durch Selenocystein	5
1.2 Selenoproteine bei Säugern	13
1.3 Selen und Krebs	22
1.4 Selen und Neurodegeneration	23
2. Ergebnisse	30
2.1 Selenoprotein P als zentrales Selentransport-Molekül	30
2.1.1 Schomburg, Schweizer et al. 2003 Biochem J 370:397-402.	30
2.1.2 Schweizer et al. 2004 Biochem J 378, 21-26	37
2.1.3 Schweizer et al., 2005 Biochem J 386: 221-226	44
2.1.4 Renko et al., 2008 Biochem J 409: 741-749	51
2.1.5 Megalin als Rezeptor für Selenoprotein P	61
2.2 Selenoproteine im Gehirn	64
2.2.1 Scharpf et al., 2007 J Neural Transmission 114(7): 877-884	64
2.2.2 Zhang et al., 2008 J Biol Chem 284(4): 2427-2438	73
2.2.3 Sörensen et al., 2008 PLoS One 3(3): e1813	86
2.2.4 Seiler et al., 2008 Cell Metabolism 8: 237–248	97
2.2.5 Wirth et al., 2009, Faseb J, im Druck	110
2.2.6 Carlson et al., 2009 Biochem J 418: 61-71	112
3. Diskussion	124
4. Zusammenfassung	131
5. Literaturverzeichnis	133
Danksagung	145
Erklärung	146

## Abkürzungen

AIF	<i>apoptosis inducing factor</i>
<i>Alb-Cre</i>	Transgene Maus mit Cre Rekombinase aus Bakteriophagen P1 unter Kontrolle des Albumin Promotors
CR	Calretinin, ein Ca <sup>2+</sup> bindendes Protein, neurochemischer Marker
CSF	Hirnwasser, Zerebrospinalflüssigkeit
Dio	Jodthyronin-Dejodase. Drei Isoenzyme, Dio1-Dio3.
EF-Sec	Translationselongationsfaktor, spezifisch für tRNA <sup>Sec</sup>
<i>fdhF</i>	Gen F aus <i>fdh</i> Operon von <i>Escherichia coli</i> , Formatdehydrogenase
GPx	Glutathionperoxidase
Lox, <i>12/15-Lox</i>	12/15-Lipoxygenase, Lipidperoxidase
<i>loxP</i>	16 Basenpaare lange Erkennungsstelle der Cre Rekombinase
mcmU	5-Methylcarboxymethyl-Uridin (Modifikation der <i>wobble</i> Base 34 in tRNA <sup>Sec</sup> )
mcmUm	selenabhängige 2'-O-Methyl-Modifikation der <i>wobble</i> Base U34 in tRNA <sup>Sec</sup>
Msr	Methioninsulfoxidreduktase
NPC Trial	<i>Nutritional Prevention of Cancer Trial</i> , klinische Studie
PV	Parvalbumin, ein Ca <sup>2+</sup> bindendes Protein, neurochemischer Marker
RDA	<i>recommended dietary intake</i> ; Selengehalt, der notwendig zur optimalen Reproduktionsrate ist
Se	Selen
Se-Protein	Selenoprotein
Sec	Selenocystein, im Einbuchstaben-Code mit U abgekürzt
SECIS	<i>SElenoCysteine Insertion Sequence</i> , Selenocystein-Insertionssequenz
SECISBP2	SECIS-bindendes Protein 2
SECS	Selenocysteinsynthase der Säuger, homolog zu SELA
<i>selA</i> SELA	Gen A aus dem <i>sel</i> Operon von <i>E. coli</i> ; codiert Selenocysteinsynthase
<i>selB</i> SELB	Gen B aus dem <i>sel</i> Operon von <i>E. coli</i> ; codiert EF-Sec
<i>selC</i> SELC	Gen C aus dem <i>sel</i> Operon von <i>E. coli</i> ; codiert tRNA <sup>Sec</sup>
<i>selD</i> SELD	Gen D aus dem <i>sel</i> Operon von <i>E. coli</i> ; codiert Selenophosphatsynthase
SELECT	<i>SELenium and Vitamin E in Cancer prevention Trial</i> , klinische Studie
<i>SEPN1</i> SeIN	Selenoprotein N. Gennamen beim Menschen, Protein
<i>SEPP1</i> SePP	Selenoprotein P. Gennamen beim Menschen, Protein

<i>Sepp</i> <sup>-/-</sup>	Mäuse mit homozygoter genetischer Inaktivierung von Selenoprotein P
SPS2	Selenophosphatsynthetase 2, ein Selenoenzym.
<i>STAF</i>	<i>selenocysteine tRNA activating factor</i> , Transkriptionsfaktor
<i>Trsp</i>	Gensymbol für tRNA <sup>[Ser]Sec</sup> . Diese tRNA wird mit Serin acyliert: [Ser].
<i>Trsp</i> <sup>fl/fl</sup>	konditionale ( <i>loxP</i> -flankierte) <i>Trsp</i> Allele
Txnrd	Thioredoxinreduktase
UTR	<i>untranslated region</i> , untranslatierter Bereich einer mRNA
VIMP	Selenoprotein S

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Die Erweiterung des genetischen Codes durch Selenocystein

### Biochemische Bedeutung von Spurenelementen und Vitaminen

Spurenelemente und Vitamine sind *per definitionem* essentielle Bestandteile der Nahrung. Biochemisch stellen Spurenelemente und Vitamine fast ausnahmslos entweder prosthetische Gruppen von Enzymen (z.B. Kupfer) oder Koenzyme (z.B. Pyridoxalphosphat) dar. In nur wenigen Fällen nehmen sie nicht an der Katalyse teil, sondern haben strukturgebende Funktionen, wie Zink in Zink-Finger Transkriptionsfaktoren oder Jod als Teil der Schilddrüsenhormone. Die Bedeutung von Spurenelementen und Vitaminen liegt darin, Enzymen chemische Reaktionen zu ermöglichen, welche reine Polypeptide nur ineffizient oder überhaupt nicht katalysieren könnten. Insofern führen Vitamin- oder Spurenelementmangelzustände im Allgemeinen zu komplexen metabolischen Störungen, da sie meistens mehrere Stoffwechselwege zugleich betreffen. Klassische ernährungsbedingte Beispiele für Vitamin- oder Mineralstoffmangel sind Skorbut (Vitamin C Mangel), Kropf (Jodmangel) oder Anämie (Eisenmangel). Während Mangelsyndrome in westlichen Überfluggesellschaften immer seltener werden, stellen genetische Erkrankungen des Mineral- oder Vitaminstoffwechsels (z.B. Morbus Wilson, Morbus Menke) oder die Exposition von toxischen Mengen von Mineralstoffen (z.B. Mn über Industriestäube) noch immer medizinische Herausforderungen dar. Zur Entwicklung von rationalen Therapieansätzen ist die molekulare und physiologische Aufklärung der betroffenen Stoffwechsel- und Transportwege die notwendige Grundlage.

**Tabelle 1. Essentielle Spurenelemente beim Menschen und davon abhängige Enzyme<sup>1</sup>**

Element	Enzyme, Proteine (Beispiele)
Fe	Cytochrom C Oxidase; Ribonukleotidreduktase
Cu	Superoxiddismutase 1; Cytochrom C Oxidase, Lysyloxidase, Peptidylamid Monoxidase
Zn	Transkriptionsfaktoren, Metallopeptidasen
Mo	Xanthinoxidase, Aldehydoxidase, Sulfitoxidase
Co	Methylmalonyl-CoA Mutase; Methioninsynthase
Mn	Superoxiddismutase 2; Pyruvatcarboxylase; PEPCK, Arginase
I	Schilddrüsenhormone (Strukturelement)
Se	<b>Glutathionperoxidasen, Dejodasen, Thioredoxinreduktasen, etc.</b>
Sn	Unbekannt
Cr	Verbessert Glukosetoleranz
F	Vermutlich anorganische Rolle in Knochen und Zähnen

<sup>1</sup> Weitere Elemente wie Ni, V und W haben eine Bedeutung bei Mikroorganismen (Nitrogenasen, Haloperoxidasen), es sind jedoch keine von ihnen abhängigen Enzyme in Säugern bekannt.

### Selen ist ein essentielles Spurenelement

Selen ist ein chemisches Element aus der VI. Hauptgruppe des Periodensystems der Elemente. Als Erzbildner ist es einerseits in Vorkommen und chemischen Reaktionen dem Schwefel verwandt, andererseits weist es auch halbmetallische Eigenschaften auf, von denen die lichtabhängige Reduktion des elektrischen Widerstands heute vor allem in Fotodioden alltägliche Anwendung findet. Der schwedische Chemiker Jöns Jakob Berzelius (1779-1848) hat das Element im Jahre 1817 entdeckt und nach der Mondgöttin Selene benannt. Die Wahl des Namens hat sich als geradezu prophetisch erwiesen, stellt Selen doch noch immer ein geheimnisvolles Element dar, einerseits schillernd, andererseits in Dunkelheit gehüllt.

Im Vergleich zu seinen bemerkenswerten anorganischen Eigenschaften, die nicht Thema dieser Arbeit sind, ist seine Bedeutung in der belebten Welt nicht weniger komplex. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde zuerst die Toxizität, später sogar die Karzinogenizität des Selens herausgestellt. Erst 1957 konnte Klaus Schwarz an den Nationalen Gesundheitsinstituten der USA in Bethesda zeigen, dass „Faktor 3“, eine essentielle Nahrungskomponente, die bei Versuchstieren nekrotische Leberdegeneration verhinderte, Selen enthielt (Schwarz and Foltz, 1957). Damit war erstmals gezeigt, dass Selen ein essentielles Element für Säuger ist. Trotz intensiver Bemühungen gelang es jedoch nicht, die molekulare Identität von Faktor 3 aufzuklären, vielmehr hatten anorganische Salze wie Selenit und Selenat, sowie diverse synthetisch hergestellte Selenverbindungen „Faktor 3-Wirkung“ (Schwarz and Foltz, 1958). Somit blieb der Stoffwechselweg des Selens vorerst rätselhaft.

### Die ersten Selenoenzyme

Fortschritte bezüglich der biochemischen Bedeutung von Selen wurden zunächst bei Prokaryonten gemacht. Wie so oft in der Wissenschaft begann die Geschichte einer neuen Entdeckung mit dem gescheiterten Versuch, ein Ergebnis aus einem anderen Labor zu replizieren. So versuchte Jane Pinsent, die zehn Jahre zuvor beschriebene Eisenabhängigkeit der Formatdehydrogenase-Aktivität<sup>2</sup> von *Escherichia coli* Bakterien (Waring and Werkman, 1944), zu replizieren (Pinsent, 1954b). In einem ersten Schritt fand sie, dass die Eisenabhängigkeit nur zu beobachten war, wenn Spuren von Molybdän im Kulturmedium vorhanden waren. Nachdem die verwendeten Reagenzien verbraucht waren, konnten auch diese Resultate nicht mehr repliziert werden, da wiederum keine Formatdehydrogenase-Aktivität mehr messbar war. Zugabe von Londoner Leitungswasser induzierte die enzymatische Aktivität und legte nahe, dass das Enzym mindestens drei mineralische

---

<sup>2</sup> Formatdehydrogenase oxidiert Ameisensäure zu CO<sub>2</sub>.

Kofaktoren brauchte. Nachdem die Isolierung des gesuchten Faktors aus Leitungswasser nicht gelang, wurde Kesselstein sauer aufgeschlossen und eine aktive Fraktion mit Schwefelwasserstoff präzipitiert. Diese Eingrenzung reichte aus, um die möglichen Elemente einzeln zu supplementieren, was schließlich zur Identifizierung von Selen als Bestandteil der Formatdehydrogenase führte (Pinsent, 1954a). Dies war der erste Bericht zur Selenabhängigkeit eines Enzyms.

Im Folgenden konnte gezeigt werden, dass bei metabolischer Markierung mit dem radioaktiven Isotop Se-75 gefolgt von partieller Reinigung von Formatdehydrogenase die Fraktionen mit höchster spezifischer Enzymaktivität die höchste spezifische Aktivität des Isotops enthalten (Shum and Murphy, 1972; Andreesen and Ljungdahl, 1973). Gleichzeitig reinigte Thresa Stadtman den Glycinreduktase Komplex aus *Clostridium stricklandii* und charakterisierte die Untereinheit A erschöpfend als ein obligates Selenoenzym (Stadtman, 1974).<sup>3</sup>



**Abbildung 1:** Drei Selenoenzym-Forscher der ersten Stunde (Flohe, 2009).

Das erste Selenoprotein bei Säugern wurde mit der neuen Technik der metabolischen Markierung mit Se-75 charakterisiert. Phil Whanger arbeitete bereits an der „white muscle disease“, einer Selenmangelkrankheit bei Nutztieren (Muth et al., 1958), und konnte durch metabolische Markierung im Muskel ein Se-75-bindendes Protein identifizieren, welches im selenarmen Muskel nicht detektierbar war (Pedersen et al., 1972). Dieses Protein heißt heute Selenoprotein W und wurde erst 1993 gereinigt und 1995 kloniert (Vendeland et al., 1993; Vendeland et al., 1995). Das erste Selenoenzym, welches in Säugern entdeckt wurde, ist die Glutathionperoxidase (GPx). Es war bekannt, dass man die Hämolyse von isolierten Erythrozyten durch Peroxid mittels Glukosezugabe verhindern konnte. Die Protektion durch Glukose war aber unmöglich in Erythrozyten von selenarm gefütterten Ratten. Da die GPX

---

<sup>3</sup> Frau Stadtman ist überdies bekannt für ihre Bahn brechenden Arbeiten zur Biosynthese von Vitamin B<sub>12</sub>.

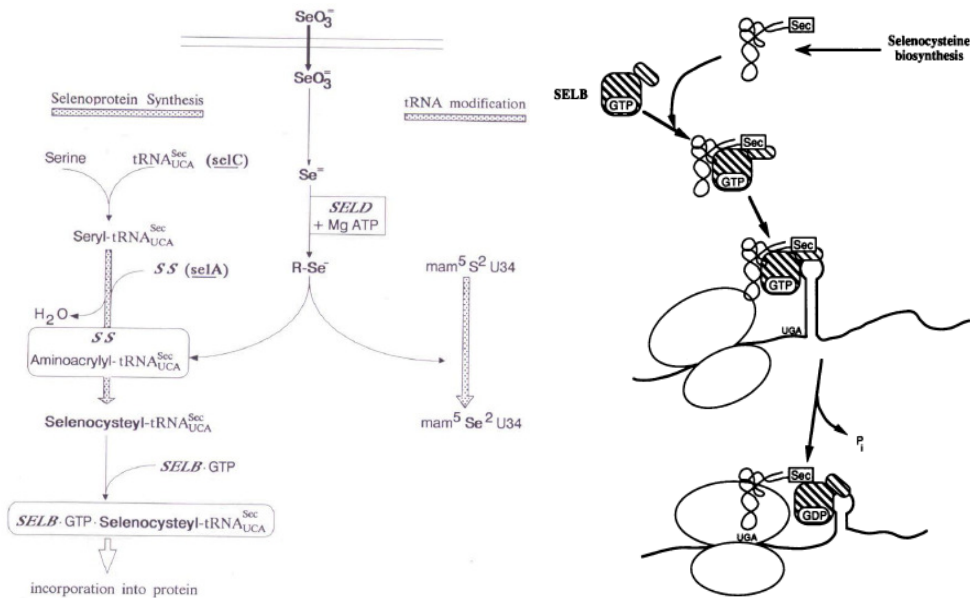
bereits bekannt war, lag die Möglichkeit nahe, dass sie ein selenabhängiges Enzym sein könnte, was durch metabolische Markierung mit Se-75 unterstützt wurde (Rotruck et al., 1973). Gleichzeitig arbeiteten Leopold Flohé und Kollegen am Mechanismus der GPx und konnten in hochreinen Enzympräparationen nachweisen, dass eine Peptidkette genau ein Selenatom enthält (Flohé et al., 1973).

### Die Biosynthese von Selenoproteinen

Jetzt gab es zwei eindeutig identifizierbare Selenoenzyme, anhand derer es möglich war, die chemische Spezies des Selens im Protein zu charakterisieren, sowie die Biosynthese von Selenoproteinen aufzuklären. Jetzt begann ein fruchtbares Zusammenspiel zwischen Forschergruppen, die mit unterschiedlichen Proteinen in Pro- und Eukaryonten befasst waren. Der erste Meilenstein war der biochemische Nachweis von Selenocystein in einem tryptischen Peptid aus der GPx (Forstrom et al., 1978) bzw. in ihrer Kristallstruktur (Ladenstein et al., 1979). Der zweite Meilenstein war die Klonierung der cDNA der Maus Glutathionperoxidase (Chambers et al., 1986) und des Formatdehydrogenase Gens (*fdhF*) aus *E. coli* (Zinoni et al., 1986). Daraus resultierte die Erkenntnis, dass Selenocystein durch ein UGA/TGA Codon kodiert wird (Zinoni et al., 1987). Die Arbeiten von Zinoni legten außerdem zweifelsfrei nahe, dass der Selenocystein-Einbau in die Formatdehydrogenase kotranslational erfolgt – vorstellbar wäre ja auch ein Einbau von Phosphoserin gewesen, das dann post-translational in Selenocystein hätte umgewandelt werden können. Auch am dritten Meilenstein war August Böcks Gruppe beteiligt, indem sie in einer Serie eleganter Studien die Genetik der Selenoproteinbiosynthese in *E. coli* aufklärte (Böck et al., 1991). Dabei stand eine triviale Überlegung am Anfang: Ein genetischer Screen nach Mutanten für die Selenoproteinbiosynthese kann anhand der starken Ansäuerung des Mediums durchgeführt werden, da in diesem Fall die Formatdehydrogenase inaktiv wäre und die Bakterien daher große Mengen Ameisensäure ausscheiden sollten. Es konnten 4 Gene isoliert werden, *selA*, *selB*, *selC* und *selD*. Das *selC* Genprodukt stellte sich als tRNA<sup>Sec</sup> heraus (Leinfelder et al., 1988). Das *selB* Genprodukt ist ein Translationselongationsfaktor spezifisch für Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> (Forchhammer et al., 1989); *selA* kodiert die Selenocysteinsynthase, welche Seryl-tRNA<sup>Sec</sup> in Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> umwandelt (Forchhammer and Böck, 1991). In dieser Reaktion wird Selenophosphat, das Produkt von Selenophosphatsynthetase (SELD; (Leinfelder et al., 1990) verbraucht. Dieselbe Gruppe erkannte auch, dass 3' vom UGA Codon eine Haarnadelstruktur in der *fdhF* Sequenz liegt, die zur Interpretation des UGA als Selenocystein Codon notwendig ist (Zinoni et al., 1990). Die Interaktion dieser Haarnadelstruktur mit SELB\*GTP und



tRNA<sup>Sec</sup> rundete schließlich das molekularbiologische Modell ab, wie Selenocystein kotranslational in Selenoproteine inseriert wird (Baron et al., 1993)<sup>4</sup>. Wie August Böck bemerkte: „In any event, the results [...] show that bacterial metabolism, including apparently trivial reactions like gas formation by *E. coli* is still full of surprises and will provide results of general biological relevance in the future.” (Böck et al., 1991).



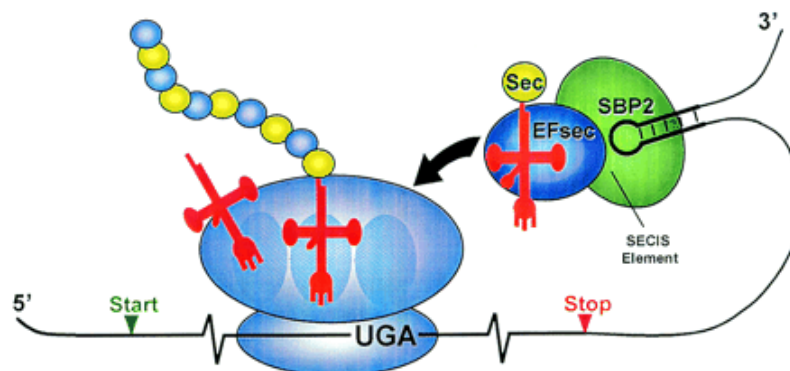
**Abbildung 2:** Selenmetabolismus in *E. coli* (Böck et al., 1991, links, und Baron et al., 1993, rechts).

### Selenoproteinbiosynthese bei Eukaryonten

Gleichzeitig mit Böcks Arbeiten erkannte Dolph Hatfield, dass die Seryl-tRNA, welche UGA dekodiert (Hatfield and Portugal, 1970), die eukaryontische tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> darstellt (Lee et al., 1989) und konnte damit noch einmal einen Nachtrag zu seiner Arbeit leisten, die 23 Jahre zuvor in Marshall Nirenbergs Team mit der Aufklärung des genetischen Codes begann (Nirenberg et al., 1966). Marla Berry erkannte dann bei der Expressionsklonierung der Typ I-Dejodase, dass diese ein Selenoprotein ist, deren mRNA ein *in-frame* UGA Codon trägt (Berry et al., 1991b), und dass eine Sequenz im 3'-untranslatierten Bereich der mRNA eine Haarnadelstruktur bildet (SECIS-Element), die für die Interpretation des *in-frame* UGA als Selenocystein-Codon notwendig ist (Berry et al., 1991a). Somit war erkennbar, dass die Selenoproteinbiosynthese bei Säugern prinzipiell wie bei *E. coli* abläuft, auch wenn es im

<sup>4</sup> Die Kooperation zwischen August Böck und Mathias Sprinzl zu strukturellen Determinanten der Interaktion zwischen SELB und tRNA<sup>Sec</sup> bestand bereits, als ich in Bayreuth mein Studium aufnahm. Fürs erste kam es jedoch noch zu keinem Zusammentreffen zwischen mir und der Biologie des Spurenelements Selen.

Detail durchaus Unterschiede gibt (Tabelle 2). Während die beteiligten Gruppen mit der biochemischen Charakterisierung ihrer Enzyme und Faktoren beschäftigt waren, bescherte der Zufall die Klonierung des eukaryontischen SELD-Homologen: Sequenzvergleich eines ESTs aus hämatopoietischen Zellen legte eine Ähnlichkeit zur *selD* Sequenz von *E. coli* und *Methanococcus janaschii* nahe und führte schließlich zur Klonierung der murinen Selenophosphat synthetase 2 (SPS2) und ihrer Identifizierung als Selenoprotein (Guimaraes et al., 1996). Verschiedene Gruppen versuchten, anhand der postulierten Affinität des eukaryontischen SELB Homologen für SECIS-Elemente *in vitro* diesen Faktor zu identifizieren. Obwohl verschiedene RNA-bindende Proteine gefunden wurden, gelang es nur der Arbeitsgruppe von Donna Driscoll einen Faktor zu isolieren und zu klonieren, der tatsächlich für die Selenoproteinbiosynthese essentiell war, das SECIS-bindende Protein 2 (Copeland and Driscoll, 1999; Copeland et al., 2000). Dieses Protein hatte allerdings keine Sequenzähnlichkeit zu SELB oder Translationsfaktoren, sodass offenbar wurde, dass die SECIS-Bindung und die tRNA<sup>[Ser]Sec</sup>-Bindung auf unterschiedlichen Polypeptiden liegen. Eine Datenbanksuche mit den Sequenzen von *E. coli* und *M. janaschii selB* führte zur Identifizierung eines humanen ESTs, und weitere Experimente erlaubten dann die Klonierung des tRNA<sup>Sec</sup>-spezifischen Elongationsfaktors, EF-Sec (Fagegaltier et al., 2000). So deutete sich ein zukünftig immer wichtigeres Motiv bei der Erforschung von Selenoproteinen an, die außerordentliche Macht der Bioinformatik, welche dann zur Klonierung der Seryl-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup>-Kinase, *Pstk*, führte, die sich jahrzehntelang der klassischen Klonierung entzogen hatte (Carlson et al., 2004). Den vorläufigen Abschluss bei der Identifizierung der Biosynthesefaktoren für Selenoproteine bildete die Klonierung der Selenocystein Synthase, SecS, das SELA Homologe der Säuger (Xu et al., 2007), sowie die Aufklärung ihrer Struktur und ihres Mechanismus (Ganichkin et al., 2008).



**Abbildung 3:** Selenoproteinbiosynthese bei Eukaryonten (Hatfield and Gladyshev, 2002). Das SECIS Element liegt in der 3'-UTR der mRNA. SBP2 bindet neben dem SECIS auch den EF-Sec\*Sec-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> Komplex.

Die Abbildung macht deutlich, dass wir unter Selenoproteinen Proteine verstehen, in die gezielt Selenocystein kotranslational eingebaut wird. Dies unterscheidet sie von Selen bindenden Proteinen, die anorganische Selenspezies nicht-kovalent binden und von Proteinen, in die Selenomethionin an Stelle von Methionin eingebaut wird, da die Met-tRNA Synthase und das Ribosom nicht zwischen den beiden Aminosäuren unterscheiden. Aufgrund der kovalenten Bindung und damit der Stabilität unter denaturierenden Bedingungen, sowie wegen der hohen spezifischen Aktivität von  $^{75}\text{Se}$ -Selenocystein kann der Nachweis einer radioaktiven Proteinbande in einem SDS-Gel als Nachweis eines Selenoproteins gelten.

**Tabelle 2:** Unterschiede in der Selenoproteinexpression zwischen *E. coli* und Säugern

	<b>Eubakterien</b>	<b>Säuger</b>
SECIS Element	direkt 3' vom UGA ein Typus	im 3'-UTR, bis 2200 Basen entfernt zwei Typen SECIS Elemente und ein <i>Selenium Redefinition Element</i> (SRE) <sup>5</sup>
tRNA <sup>Sec</sup>	nicht methyliert	2'-O-Methyl-Ribose 34, selenabhängig
Biosynthese	über Aminoacrylyl-tRNA	über Phospho-Seryl-tRNA
Ser-tRNA Kinase	keine	Pstk
SECIS Bindung/	SELB	SecisBP2, L30, eIF4a3 <sup>6</sup>
Elongationsfaktor	SELB	EF-Sec
Selenophosphat	von SELD	von SPS2, Rolle von SPS1 unklar

### Die Erweiterung des genetischen Codes

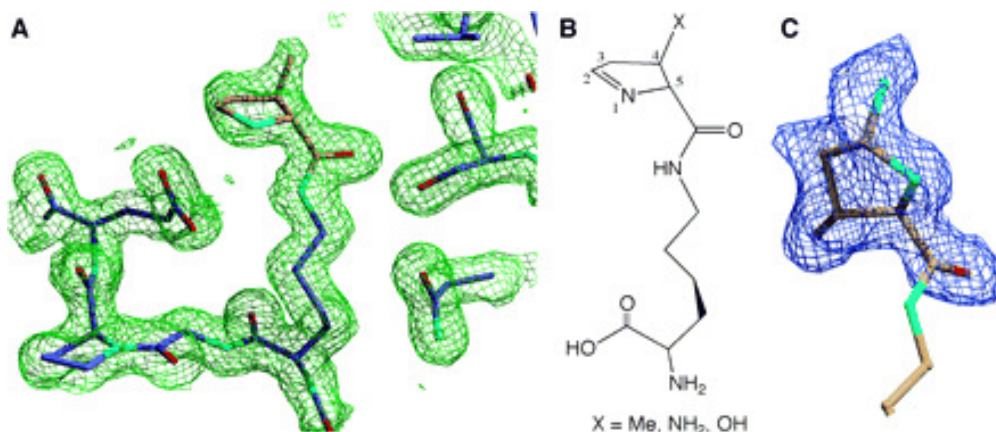
Ein zentrales Dogma der Molekularbiologie besagt, dass der genetische Code universell sei. Das stimmt, soweit wir heute wissen, mit Ausnahme von Mitochondrien und Plastiden, sowie einiger Einzeller. Der genetische Code ist aber weniger eindeutig, als es uns die Lehrbücher gemeinhin vermitteln wollen. Wie Francis Crick aus theoretischen Überlegungen herleitete (Crick, 1963) und später durch Nirenberg und Khorana spektakulär gezeigt wurde, kodieren Basentriplets in der mRNA für die einzelnen Aminosäuren im Polypeptid. Von den 64 ( $4^3$ ) möglichen Triplets kodieren 61 für 20 Aminosäuren. Der *wobble*, das Wackeln auf der letzten Base des Codons, sorgt dafür, dass mitunter mehrere Codons mit unterschiedlicher Base an der dritten Position die gleiche Aminosäure kodieren („Degeneration“ des Codes). Tatsächlich gibt es eine Reihe posttranskriptionaler enzymatischer Modifikationen an tRNAs, die vornehmlich die Spezifität erhöhen, indem sie den *wobble* eingrenzen. Interessanterweise

<sup>5</sup> (Howard et al., 2007)

<sup>6</sup> (Budiman et al., 2009) eIF4a3 ist ein negativer Regulator der SBP2/SECIS Interaktion.

ist ein Codon, AUG, bereits doppelt belegt, nämlich durch „Start“ und „Methionin“. Die Möglichkeit der doppelten Belegung eines Codons hatte Francis Crick bereits 1962 in seiner Nobelpreisrede vorhergesagt (Crick, 1963). Was trivial erscheint, ist tatsächlich schon eine Vorwegnahme der Molekularbiologie des Selenocysteineinbaus: Ein Codon, AUG, wird von zweierlei Translationsfaktoren gelesen, dem Initiationsfaktor (in Bakterien beladen mit Formylmethionin) und dem Elongationsfaktor EF-1 $\alpha$  (in Bakterien EF-Tu), der Met-tRNA<sup>Met</sup> bindet.

Drei Codons fungieren als Terminationssignale. Der Name des UAG Codons (damals als konditional letale Mutation in Bakteriophagen-T4-Genen gefunden) wurde abgeleitet vom Namen von Harris Bernstein, *amber*<sup>7</sup>. Die nachfolgend entdeckten Terminationscodons erhielten entsprechend die Namen *opal* (UGA) und *ocre* (UAA). Die 21ste Aminosäure, Selenocystein, wird auch von UGA kodiert und wir haben gesehen, wie komplex die Molekularbiologie ist, die das Reprogrammieren dieses Codons bewerkstelligt. Vor wenigen Jahren zeigte sich, dass damit die Möglichkeiten des genetischen Codes noch nicht ausgeschöpft sind. Eine neue Aminosäure, Pyrrolysin, wurde in der Kristallstruktur einer archaealen Methyltransferase entdeckt (Hao et al., 2002). Erst dann erkannte man, dass sich an der Stelle des Pyrrolysin in der korrespondierenden mRNA ein UAG-*amber* Codon befindet und dass die tRNA<sub>CUA</sub> mit Pyrrolysin beladen werden kann (Srinivasan et al., 2002) – es gibt also eine 22ste proteinogene Aminosäure! Im nächsten Schritt konnten Blight et al zeigen, dass Pyrrolysin auch in *E. coli* mit mehr als 75% Effizienz in die archaeale Methyltransferase eingebaut werden kann, dass ihre mRNA also offensichtlich alle notwendigen Signale trägt (Blight et al., 2004).



**Abbildung 3:** Pyrrolysin in der hoch aufgelösten Kristallstruktur von Hao et al., 2002. Die 22ste Aminosäure wurde anhand der Elektronendichtekarte der Methyltransferase identifiziert.

<sup>7</sup> Zitiert nach Sambrook, J. und Russell, D.W. (3rd ed.) „Molecular cloning: a laboratory manual“, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

Kürzlich konnten die Gruppen von Vadim Gladyshev und Dolph Hatfield zeigen (Turanov et al., 2009), dass der genetische Code noch mehr Überraschungen bereithält für den, der sich überraschen lässt: In dem Ciliaten *Euplotes crassus* kann das UGA Codon sowohl Selenocystein, wie auch Cystein kodieren. Das hängt einerseits von der Gegenwart eines SECIS Elements in der mRNA ab, aber auch von der Position des UGA in der mRNA. Darüber hinaus wurde kürzlich in *Drosophila* das Durchlesen von UGA Codons unabhängig vom Selenocysteineinbau *in vivo* beschrieben (Hirosawa-Takamori et al., 2009). Zusammen mit den Ergebnissen zum Pyrrolysineinbau verdichten sich also die Hinweise, dass die Struktur und lokale Sequenz einer mRNA durchaus einen Einfluss auf die Wahl der (Suppressor-)tRNA ausübt.

### Organismen mit Selenoproteinen

Sind diese Erweiterungen des genetischen Codes wichtig? Im Falle der Selenoproteine muss man wohl einen evolutionären Standpunkt einnehmen: Selenocystein ist eine alte Erweiterung und viele Organismen haben seither sowohl ihr Selenoproteom als auch die zugehörige Biosynthesemaschinerie aufrechterhalten. Man kann daher von einem relevanten Selektionsdruck ausgehen. Säugergenome enthalten 24-25 Gene für Selenoproteine (Kryukov et al., 2003), Fische sogar 30-37 (Lobanov et al., 2009). Andererseits haben verschiedene Organismen ihr Selenoproteom verkleinert (Rundwürmer und Insekten, 1-3 Selenoproteine) oder verloren (Pilze und Landpflanzen). Unter den Prokaryonten findet man Selenoproteine in Eubakterien und Archaeobakterien, obwohl es auch jeweils Spezies ohne Selenoproteom gibt.

## **1.2 Selenoproteine bei Säugern**

### 1.2.1 Das menschliche Genom enthält 25 Gene für Selenoproteine

Vor allem mit Hilfe der Se-75 Markierungsmethode gelang es in der Folge, weitere Selenoproteine bei Säugern nachzuweisen und schließlich zu klonieren [Selenoprotein P (Hill et al., 1991); Dejodase 1 (Berry et al., 1991b); Thioredoxinreduktase, (Gladyshev et al., 1996)]. Die Bioinformatik zeitigte den nächsten Durchbruch: Die Suche nach *in-frame* TGA Codons und 3' davon liegenden SECIS Elementen, kombiniert mit einem phylogenetischen Vergleich der orthologen Proteinsequenzen, erhöhte die Anzahl der Selenoproteine in Säugern auf 24-25, die seither unverändert blieb (Lescure et al., 1999; Kryukov et al., 1999; Kryukov et al., 2003).

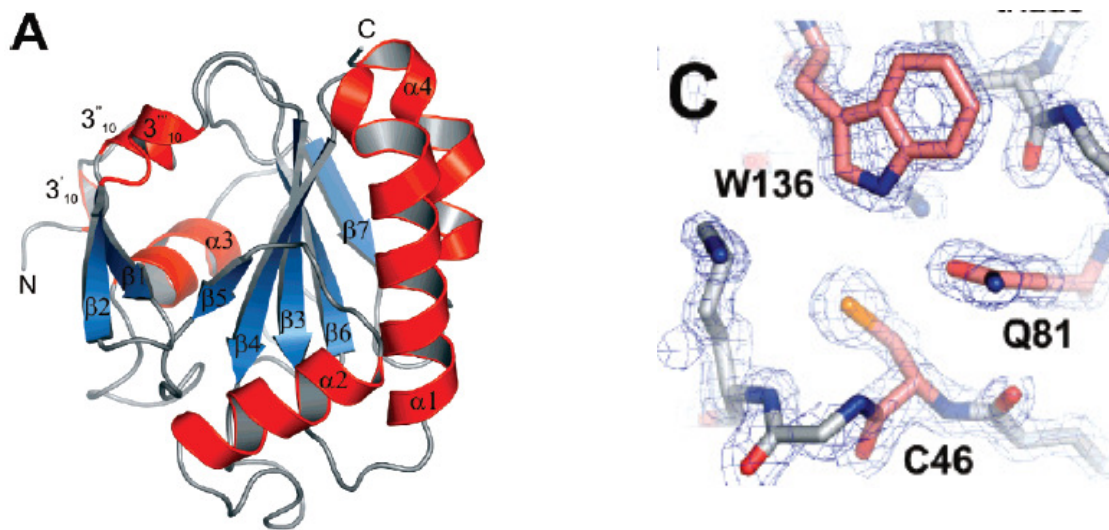
Selenoprotein	Chromosomal location (number of exons)	Sec location in protein (length of protein)	Selenoprotein structure
15kDa	1p22.3 (5)	93 (162)	
D11	1p32.3 (4)	126 (249)	
D12	14q31.1 (2)	133 (265)	
D13	14q32	144 (278)	
GPx1	3p21.31 (2)	47 (201)	
GPx2	14q23.3 (2)	40 (190)	
GPx3	5q33.1 (5)	73 (226)	
GPx4	19p13.3 (7)	73 (197)	
<b>GPx6</b>	<b>6p22.1 (5)</b>	<b>73 (221)</b>	
<b>H</b>	<b>11q12.1 (4)</b>	<b>44 (122)</b>	
<b>I</b>	<b>2p23.3 (10)</b>	<b>387 (397)</b>	
<b>K</b>	<b>3p21.31 (5)</b>	<b>92 (94)</b>	
M	22q12.2 (5)	48 (145)	
N	1p36.11 (12)	428 (556)	
<b>O</b>	<b>22q13.33 (9)</b>	<b>667 (669)</b>	
P	5p12 (4)	59, 300, 318, 330, 345, 352, 367, 369, 376, 378 (381)	
R	16p13.3 (4)	95 (116)	
<b>S</b>	<b>15q26.3 (6)</b>	<b>188 (189)</b>	
SPS2	-	60 (448)	
T	3q24 (6)	36 (182)	
TR1	12q23.3 (15)	498 (499)	
TR2	3q21.2 (16)	655 (656)	
TR3	22q11.21 (18)	522 (523)	
<b>V</b>	<b>19q13.13 (6)</b>	<b>273 (346)</b>	
W	19q13.32 (6)	13 (87)	

**Abbildung 4:** Selenoproteine in Säugern (Kryukov et al., 2003). Hervorgehoben sind die Selenoproteine, die in jener Arbeit neu identifiziert wurden. GPx6 ist kein Selenoprotein in Nagern. Der rote Strich zeigt die Position von Sec an. Bei einer Klasse von Selenoproteinen folgt dem Sec eine (vorhergesagte)  $\alpha$ -Helix (blau eingefärbt). Bei der anderen Klasse von Selenoproteinen liegt das Sec am C-Terminus, oft als vorletzte Aminosäure.

### 1.2.2 Katalytische Überlegenheit von Selenocystein!?

Worin liegt der Vorteil von Selenocystein? Selenocystein befindet sich in allen bisher untersuchten Selenoenzymen im aktiven Zentrum. Wie bioinformatische Untersuchungen kürzlich belegten, findet man Selenocystein immer an derselben Position wie Cystein in homologen Enzymen, sodass man im Umkehrschluss die katalytische Rolle eines bestimmten Cysteins in einer Proteinsequenz durch die Homologie zu einem Selenoprotein voraussagen kann (Fomenko et al., 2007). Schon früh wurde erkannt, dass Selenocystein dem Cystein überlegen sein könnte (i) durch eine höhere Nukleophilie, sowie (ii) durch einen  $pK_a$  Wert im neutralen Bereich, der zum Vorliegen eines Selenolat-Anions bei physiologischem  $pH$  führt, während ein Thiolat in entsprechenden Enzymen erst durch Nachbargruppeneffekte gebildet werden muss (Stadtman, 1974). Die außerordentliche Reaktivität der Selenoproteine hat

schon Flohé beim Vergleich der Glutathionperoxidase mit der Catalase für den Abbau von  $H_2O_2$  dokumentiert (Flohé, 2009).

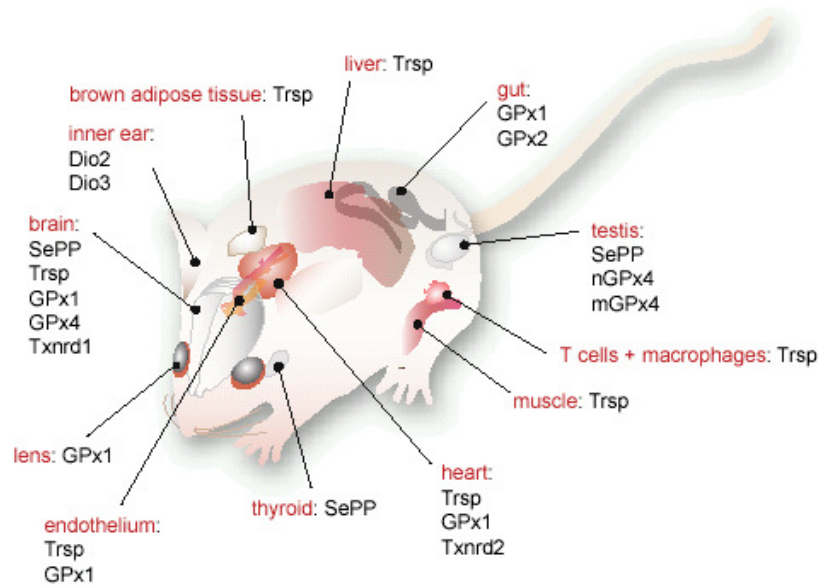


**Abbildung 5:** Struktur der Glutathionperoxidase 4 (Scheerer et al., 2007). Die Autoren konnten zeigen, dass W136 und Q81 in Wasserstoffbrücken-Distanz zu C(Sec)46 stehen und damit das Selenolat stabilisieren können. Im Unterschied zu allen anderen Glutathionperoxidasen fehlt der GPx4 eine Schleife („loop 1“), die das aktive Zentrum gegen große Substrate, wie Lipide, abschirmt. Die Abbildung verdeutlicht auch die Lage des katalytischen Sec zwischen einem  $\beta$ -Faltblatt (hier  $\beta 3$ ) und einer  $\alpha$ -Helix ( $\alpha 1$ ), gefolgt von einem weiteren Faltblatt,  $\beta 4$ , einem Strukturelement, welches in etwa der Hälfte der Selenoproteine so gezeigt oder vorhergesagt werden kann (s. Abb. 4).

Jodothyronin-Dejodasen katalysieren eine für Säugerenzyme sehr ungewöhnliche Reaktion, die Spaltung einer Kohlenstoff-Halogen-Bindung. Dabei handelt es sich ebenfalls um eine Redoxreaktion, die *in vitro* durch einen Thiol-Kofaktor (z.B. Dithiothreitol) unterstützt wird (Köhrle, 2002). Austausch von Selenocystein gegen Cystein in rekombinanter Dejodase führt zu einem Verlust der katalytischen Aktivität um 2-3 Größenordnungen (Berry et al., 1992).

Vermutlich verstehen wir die Biochemie der Selenoproteine trotzdem noch nicht vollständig, denn es gibt offensichtlich gute Argumente gegen Selenocystein in Enzymen: Viele Organismen kommen ohne Selenocystein/Selenoproteine aus. Weiterhin ist für keine der bekannten Reaktionen von Selenoenzymen in Säugern ein Selenoenzym unersetzlich: Die Jodtyrosin-Dehalogenase der Säuger kann FAD-abhängig ebenfalls Kohlenstoff-Halogen-Bindungen brechen, und Peroxiredoxine können Peroxide Glutathion-abhängig reduzieren. Im Falle der Methioninsulfoxidreduktasen (Msr) gibt es sogar Selen-abhängige (MsrB1, Selenoprotein R) und Selen-unabhängige Enzyme in der gleichen Zelle nebeneinander (MsrA

und MsrB2), die sich nur in der Stereospezifität in Bezug auf das Substrat unterscheiden. Detaillierte biochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass Selen-abhängige und unabhängige Isoenzyme leicht unterschiedliche Mechanismen nutzen, wobei der Einbau von Selenocystein in ein Selen-unabhängiges Enzym sogar die Enzymaktivität verschlechtern kann (Kim and Gladyshev, 2005).



**Abbildung 6:** Organe, in denen die genetische Inaktivierung von Selenoproteinen zu biologischen Effekten geführt hat (Conrad und Schweizer 2009).

### 1.2.3 Physiologische Bedeutungen von Selenoproteinen

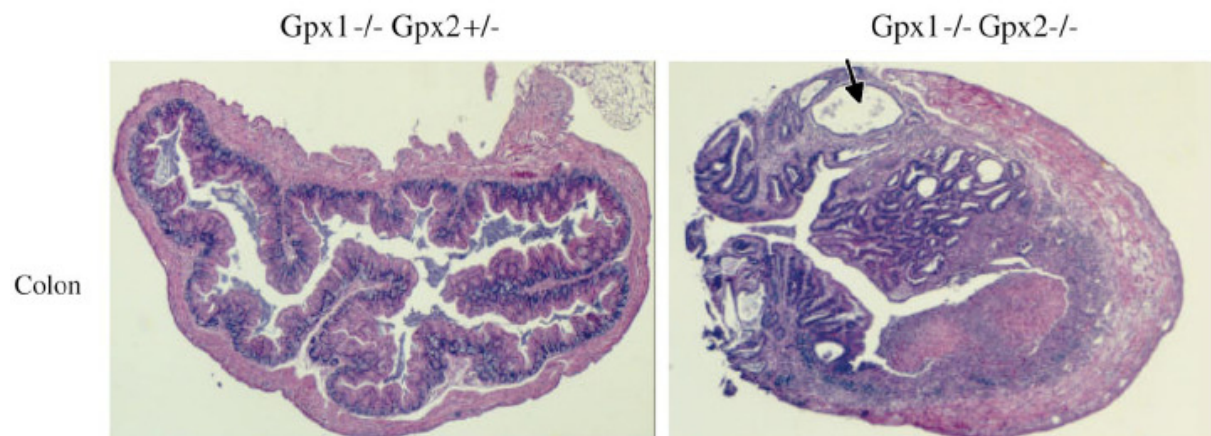
Von einigen Selenoproteinen kennt man die biochemische Bedeutung nicht oder nur unvollständig. Besonders interessant scheint Selenoprotein S, das als Teil des Retrotranslocons als VIMP kloniert wurde (Ye et al., 2004). Seine Expression wird durch Glukose reguliert und moduliert seinerseits die Expressionsstärke von pro-inflammatorischen Zytokinen (Curran et al., 2005). Für die Selenoproteine 15 und M nimmt man eine Rolle bei der Faltung von Proteinen im ER an, die jedoch nicht funktionell nachgewiesen werden konnte (Labunskyy et al., 2007). Selenoprotein T ist an der Vesikelfreisetzung in neuronalen Zellen beteiligt (Grumolato et al., 2008). Die physiologische Bedeutung eines Proteins lässt sich aber nur unvollständig im Reagenzglas erforschen. Deshalb hat die Selenbiologie seit einer Dekade eine sich rapide beschleunigende Anwendung von transgenen Mausmodellen erlebt, die in atemberaubender Geschwindigkeit viele Jahrzehnte alte Fragen beantwortet, andererseits aber neue, unerwartete Fragen aufgeworfen hat.



### Glutathionperoxidasen und Thioredoxinreduktasen

Ursprünglich hatte man angenommen, dass der Großteil aller Seleneffekte auf die antioxidative Wirkung der Glutathionperoxidasen (GPx) zurückzuführen ist (Rotruck et al., 1973). Insofern kam es als eine Überraschung, dass *Gpx1*<sup>-/-</sup> Mäuse keinen erkennbaren Phänotyp aufwiesen (Ho et al., 1997). Erst später stellte sich heraus, dass *Gpx1* durchaus eine wichtige Rolle spielt, meist aber nur unter physiologischen Stressbedingungen, wie Ischämie oder Toxinbelastung (Schweizer and Schomburg, 2005). Sehr aufregend war die Entdeckung, dass *Gpx1*<sup>-/-</sup>, *Gpx2*<sup>-/-</sup> Mäuse an Colitis leiden, die zu neoplastischen Veränderungen fortschreitet (Esworthy et al., 2001). Damit wurde erstmals eine direkte experimentelle Verbindung gezogen zwischen der bekannten krebspräventiven Wirkung von Selen im Darm (Clark et al., 1996) und einer Selen-abhängigen enzymatischen Aktivität. Kurz zuvor hatten Leopold Flohé und Fulvio Ursini die biochemische Basis für die bislang unverstandenen Seleneffekte bei der männlichen Fertilität erklärt und gezeigt, dass GPx4 eine Struktur gebende Rolle in Spermien zukommt (Ursini et al., 1999).

Georg Bornkamm, Marcus Conrad und Markus Brielmeier haben dann anhand einer Serie von konditionalen Knockout Mäusen in einer Reihe von Publikationen die Bedeutung von *Gpx4* Isoformen in Entwicklung und Fertilität ausgearbeitet (Conrad et al., 2005; Seiler et al., 2008; Schneider et al., 2009), sowie die Bedeutung der Thioredoxinreduktasen (*Txnrd1* und *Txnrd2*) untersucht (Conrad et al., 2004; Jakupoglu et al., 2005; Soerensen et al., 2008).



**Abbildung 7:** Histologische Veränderungen im Dickdarm von Mäusen mit kombinierter Defizienz von *Gpx1* und *Gpx2* (Esworthy et al., 2001).

### Methioninsulfoxidreduktasen

Es wird diskutiert, dass die reversible Oxidation und Reduktion von bestimmten Methionin-Seitenketten die Aktivitäten von Ionenkanälen (Ciorba et al., 1997) und der Calmodulin-abhängigen Kinase im Herzen (Erickson et al., 2008) zu regulieren vermag. Experimente in *Drosophila* und in Mäusen unter 100% Sauerstoffatmosphäre legten nahe, dass MsrA die

Lebensdauer verlängert (Moskovitz et al., 2001;Ruan et al., 2002). Allerdings führte die Inaktivierung von Selenoprotein R (MsrB1) nicht zu offenkundigen physiologischen Defekten (Fomenko et al., 2008). Es ist also ungeklärt, ob unterschiedliche Randbedingungen (z.B. Selengehalt des Futters) dieser Diskrepanz zugrunde liegen (Moskovitz and Stadtman, 2003).

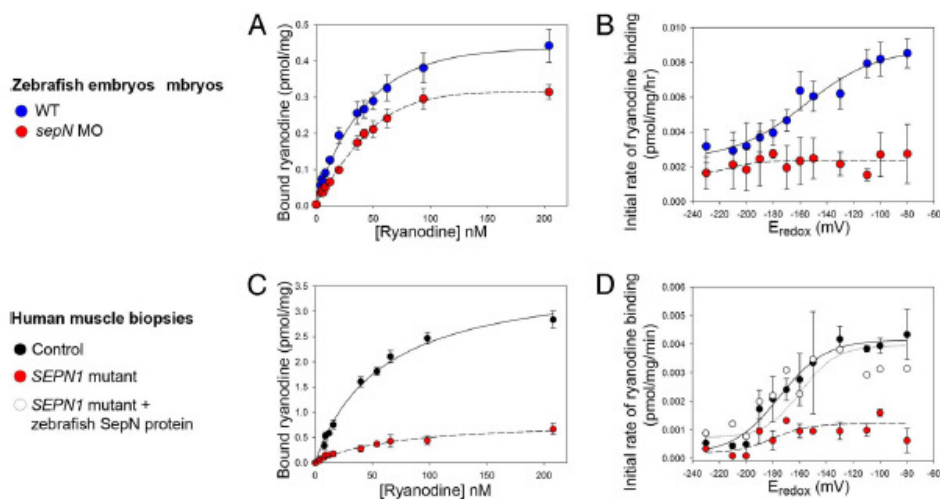
### Jodthyronin-Dejodasen

Als Schilddrüsenhormone werden 3,3',5-Trijodthyronin (T3) und 3,3',5,5'-Tetraiodthyronin (Thyroxin, T4) bezeichnet. Sie werden ausschließlich in der Schilddrüse durch enzymatische Jodierung von Tyrosinresten in Thyroglobulin und anschließende Knüpfung einer Etherbindung zum Thyronin-Grundgerüst gebildet (zusammengefasst in (Schweizer et al., 2008a). Die biologischen Wirkungen von Schilddrüsenhormonen werden nach heutigem Stand des Wissens vornehmlich durch Bindung von T3 an nukleäre Rezeptoren vermittelt. Da T4 das Hauptprodukt der Schilddrüse ist, vermitteln Dejodasen die systemische wie auch die lokale Aktivierung von T4 zu T3 (Köhrle, 2002;Bianco et al., 2002). Gleichzeitig sind Dejodasen auch am Abbau von Schilddrüsenhormonen und der Synthese von Thyronaminen, einer kürzlich entdeckten Klasse von Hormonen, beteiligt (Piehl et al., 2008). Die Selenabhängigkeit der hepatischen Dejodase 1 wurde früh erkannt und zur Klonierung und Identifizierung als Selenoenzym ausgenutzt (Arthur et al., 1990;Behne et al., 1990;Berry et al., 1991b). Inzwischen sind alle drei Dejodase-Isoenzyme in Mäusen genetisch inaktiviert worden (Schneider et al., 2001;Schneider et al., 2006;Streckfuss et al., 2005;Hernandez et al., 2006), mit teilweise überraschenden Ergebnissen, deren Diskussion den Rahmen dieser Schrift sprengen würde (siehe (Schweizer et al., 2008b).

Sehr interessant ist jedoch die Beschreibung von Patienten mit hypomorphen SBP2 (*SECISBP2*) Allelen (Dumitrescu et al., 2005). Die Patienten werden primär wegen einer transienten Wachstumsretardation und verzögerter Knochenreifung in der Klinik vorstellig. Wie mein Kollege Lutz Schomburg in dieser Arbeit zeigen konnte, besteht ein globales Defizit der Selenoprotein-Biosynthese, wobei man die niedrige Aktivität von Dejodasen für den klinischen Phänotyp verantwortlich macht, der sich auch nicht durch eine entsprechende Supplementation mit Selen behandeln ließ (Schomburg et al., 2009). Fertilitätsprobleme, kardiovaskuläre oder neurologische Defekte wurden bei den Patienten nicht beschrieben, was zum Teil sicher auf deren noch jugendliches Alter zurückgeführt werden muss, insofern muss man gerade im Hinblick auf die spannende Frage der männlichen oder weiblichen Fertilität noch auf Folgeuntersuchungen dieser Patienten warten.

## Mutationen im Gen für Selenoprotein N bei hereditären Muskeldystrophien

Mutationen in *SEPNI* wurden bei Patienten mit einer Reihe erblicher Muskeldystrophien gefunden, u.a. der „*multi mini-core disease*“ (Moghadaszadeh et al., 2001). Damit wurde zum ersten Mal eine Mutation in einem Selenoprotein mit einer menschlichen genetischen Erkrankung assoziiert. Bemerkenswerterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass auch eine Mutation im SECIS Element von *SEPNI* die gleiche Krankheit auslösen kann, was einen sehr guten Hinweis auf die Selenabhängigkeit von SEPN gibt (Allamand et al., 2006). Entsprechend konnte in *SEPNI* erstmals eine physiologische Funktion des SRE (*selenium redefinition element*) gezeigt werden, einer RNA Struktur, die bei manchen Selenoproteinen ähnlich einem bakteriellen SECIS-Element direkt auf das UGA folgt und für den Selenocysteineinbau notwendig ist (Howard et al., 2007). Das Protein ist offensichtlich für die Muskelphysiologie wichtig. Morpholino-vermittelte Suppression von SelN im Zebrafisch führt zu strukturellen Defekten von Skelettmuskeln (Deniziak et al., 2007). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass SEPN mit dem Ryanodinrezeptor interagiert und an der  $Ca^{2+}$  Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum beteiligt ist (Juryneć et al., 2008).



**Abbildung 8:** Selenoprotein N vermittelt die Redoxsensitivität des Ryanodinrezeptors. (aus Juryneć et al., 2008).

## Selenoprotein P

Selenoprotein P (SePP) ist das wichtigste Selen-transportprotein im Plasma, indem es mehr als 60% des Plasmaselens beinhaltet (Burk and Hill, 2005). In Säugern ist es das einzige Selenoprotein mit mehr als einem Selenocystein pro Molekül (10-12, je nach Spezies). Außerdem ist es das einzige Selenoprotein mit zwei SECIS Elementen. Da SePP in der Leber in Abhängigkeit vom Selenstatus produziert wird, kann man durch Bestimmung von SePP im Blut den Selenstatus und die Biosynthese von Selenoproteinen abschätzen. Versuche mit Selen-defizientem Futter durch Dietrich Behne haben gezeigt, dass es unter den Organen eine

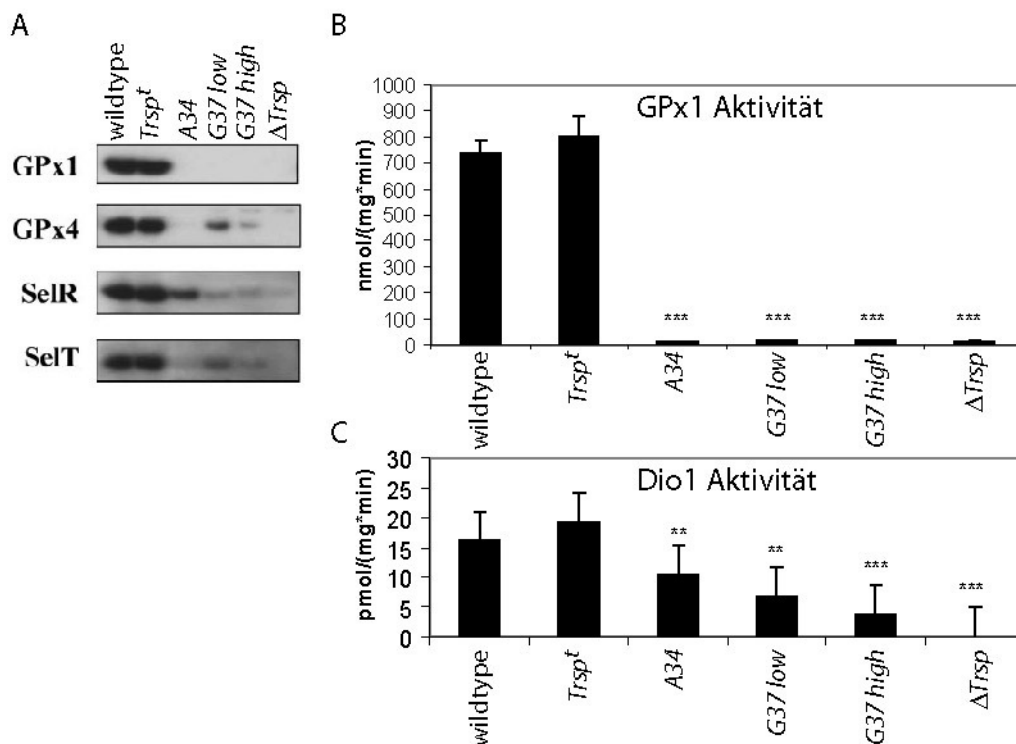
Hierarchie der Selenversorgung gibt (Behne et al., 1988). Sie sorgt dafür, dass Organe wie das Gehirn und die Schilddrüse ihren Selengehalt auch bei Selen-defizienter Ernährung konstant halten, während die Leber praktisch vollständig an Selen verarmen kann. Eine solche Beobachtung setzt einen Mechanismus voraus, der einen gezielten Selentransport ermöglicht (Schomburg et al., 2004). Wie wir gefunden haben, ist SePP ein Teil dieses Mechanismus (siehe unten). Durch die zentrale Rolle von SePP im Selenmetabolismus ergibt sich notwendigerweise ein globaler Blick auf Selen-abhängige Prozesse in mehreren Organen, der eine Leitschnur für die hier beschriebenen Projekte war (Schomburg and Schweizer, 2009). Kürzlich konnten Raymond Burk et al. zeigen, dass der ApoE-Rezeptor 2 (ApoER2) einen endozytischen Rezeptor für SePP in Hoden und Gehirn darstellt (Olson et al., 2007; Burk et al., 2007), womit auch der notwendige spezifische Rezeptor für SePP, zumindest in zwei Organen gefunden ist.

#### Genetische Studien zur tRNA<sup>[Ser]Sec</sup>, *Trsp*

Die biochemischen Funktionen der meisten anderen Selenoproteine sind noch weitgehend ungeklärt. Die Herstellung weiterer genetisch defizienter Mausmodelle für Selenoproteine könnte einen neuen Ansatzpunkt für die Aufklärung ihrer Funktion schaffen. Um die Rolle von Selenoproteinen in bestimmten Organen und Zelltypen global zu untersuchen, wurden in Dolph Hatfields Labor Mäuse mit konditionaler Inaktivierung der tRNA<sup>[Ser]Sec</sup>, Gensymbol *Trsp*, generiert (Kumaraswamy et al., 2003). Diese Mäuse wurden mit einer langen Liste von gewebespezifischen Cre Rekombinase-transgenen Mauslinien verkreuzt (Brustdrüsenepithel, Leber, Podozyten der Niere, Neurone, Muskel, Endothel, T-Zellen, Makrophagen und weitere). Dieser Ansatz ist geeignet, im Rahmen eines *proof-of-principle* Experiments im Vorfeld zu klären, ob im betreffenden Zelltyp überhaupt ein Selenoprotein eine wichtige Rolle spielt. Im Gegensatz zur ursprünglich weit verbreiteten Meinung, dass Selenoenzyme wie GPx und Txnrd essentielle *house-keeping* Enzyme sind, stellte sich heraus, dass bestimmte Zelltypen sehr gut auch ohne Selenoproteine funktionieren (Kumaraswamy et al., 2003; Schweizer et al., 2005). Entsprechend konnten wir *Trsp* in Leber (Schweizer et al., 2005; Streckfuss et al., 2005), Schilddrüse (J. Chiu und US, unpubliziert) und Neuronen (Wirth et al., *im Druck*) konditional ausschalten.

Es gibt eine zweite Hierarchie unter den Selenoproteinen. Sie bezieht sich auf eine unterschiedliche Abhängigkeit der Selenoproteine innerhalb einer Zelle vom angebotenen Selen (Gross et al., 1995; Bermano et al., 1995; Hatfield et al., 2006). Der zugrunde liegende Mechanismus ist nicht geklärt, doch könnte dabei die Selen-abhängige Methylierung der

tRNA<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> eine Rolle spielen (Warner et al., 2000; Chittum et al., 1997). Deshalb wurden im Labor von Dolph Hatfield mutierte Allele von *Trsp* generiert, bei denen die Methylierung der 2'-O Position der Ribose von Base U34 (U34m) nicht stattfinden kann (Moustafa et al., 2001; Carlson et al., 2005). In Abbildung 9 wird augenfällig, dass unterschiedliche Selenoproteine sehr unterschiedlich auf Mutationen in tRNA<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> reagieren, die die N6-isopentenyl-Modifikation an A37 nicht tragen. So toleriert die Expression von GPx1 keine Veränderung der tRNA<sup>Sec</sup>, während GPx4 zwar die G37A, aber nicht die U34I Modifikation toleriert. SelR (Abb. 9A) und Dio1 (Abb.9C) tolerieren beide Veränderungen, allerdings auf Kosten der Expressionsstärke. Wir vertreten ein Modell, in dem die weniger wichtigen, und daher stärker Selen-abhängigen Selenoproteine die U34m tRNA<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> erfordern (GPx1, auch SelR), deren Anteil bei Selenmangel sinkt (Carlson et al., 2007).



**Abbildung 9:** Die unterschiedliche Sensitivität von Selenoproteinen gegenüber Mutationen in der Anticodonschleife der tRNA<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup>. Genetische Komplementation eines Leber-spezifischen *Trsp* Verlustes durch transgene, mutierte *Trsp* Allele. (A) GPx4 und SelT tolerieren eine A37G Mutation (welche die N6-Isopentenyl-Modifikation an A37 der tRNA<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> verhindert), während GPx1 und SelR sehr sensibel darauf reagieren. Im Gegensatz toleriert SelR die U34A Mutation (*in vivo* durch Desaminierung I34). (Carlson et al., 2007). (B) GPx1 und (C) Dio1 Aktivitäten in der Leber, aus Platzgründen nicht gezeigt in Carlson et al., 2007. Nur männliche Tiere. \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; ANOVA.

Interessanterweise sind Mäuse, bei denen die besonders Selen-responsiven Selenoproteine vermindert exprimiert werden, prädisponiert für eine höhere Tumormast in Dickdarm- oder Prostatakrebs Modellen (Irons et al., 2006; Diwadkar-Navsariwala et al., 2006) – konsistent

mit den epidemiologischen Daten, nach denen ein niedriger Selenstatus beim Menschen für Krebs prädisponiert (Clark et al., 1996).

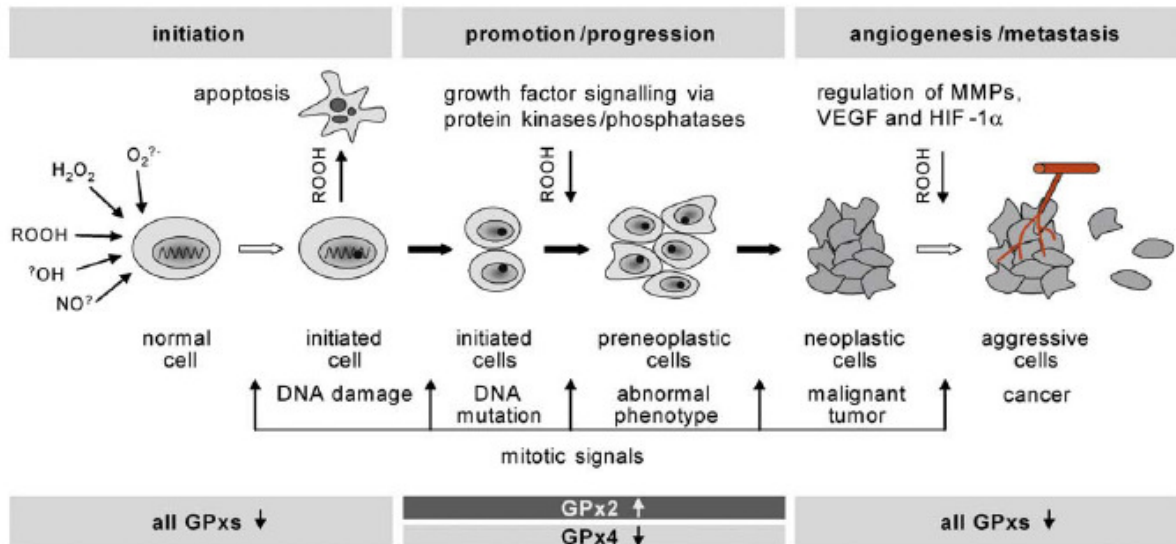
### **1.3 Selen und Krebs**

Die potenziell krebspräventive Wirkung von Selen hat in den letzten Jahren viel Aufmerksamkeit erlangt (Zhuo and Diamond, 2009;Rayman, 2000). Entscheidend war dabei der NPC-Trial (Nutritional Prevention of Cancer), eine doppel-blinde, placebokontrollierte Studie, die federführend vom verstorbenen<sup>8</sup> Larry Clark und Gerald F. Combs durchgeführt wurde (Clark et al., 1996). Die Studie konnte zeigen, dass die Patientengruppe, die mit weniger als 105 µg Selen/L Serum in die Studie eingetreten war, nach fünf Jahren signifikant weniger Krebsfälle und Todesfälle zu verzeichnen hatte. Deshalb wurde der SELECT Trial (*Selenium and Vitamin E in Cancer Prevention Trial*) von den amerikanischen Nationalen Gesundheitsinstituten finanziert, in dem 12000 Männer über 12 Jahre dieselbe Se Dosis (200µg) wie zuvor in der erfolgreichen NPC Studie als tägliches Supplement nehmen sollten. Unglücklicherweise wurde die Studie im Jahre 2009 abgebrochen, weil das Studienziel nicht erreicht werden konnte (Hatfield and Gladyshev, 2009). Es fiel nämlich auf, dass, vermutlich durch die verbreitete Supplementation mit Se von Lebensmitteln, der mittlere Plasmaselengehalt der Studienteilnehmer bei über 120 µg/L lag, einer Konzentration, bei der auch im NPC Trial kein Effekt auf die Krebsinzidenz beobachtet worden war. Es bleibt das Geheimnis der Studienleiter, weshalb das Problem bei der Rekrutierung der Studienteilnehmer, wenigstens aber nach der Feststellung des Selenstatus nicht adressiert wurde. In der Öffentlichkeit wurde stattdessen der Eindruck verbreitet, dass Selen-supplementation nicht krebspräventiv wäre, eine Aussage, für die die Studie ebenfalls keine belastbaren Daten vorlegen konnte.

Genetische Studien haben in den vergangenen Jahren immer wieder Assoziationen von Krebsinzidenz mit bestimmten Allelen oder der Expression von Selenoproteinen ergeben in SePP (Mörk et al., 1998;Mörk et al., 2000;Meplan et al., 2007;Cooper et al., 2008;Peters et al., 2008), Sep15 (Hu et al., 2001;Jablonska et al., 2008) GPx1 (Hu and Diamond, 2003;Hu et al., 2005), Gpx4 (Bermano et al., 2007;Meplan et al., 2008) oder Txnrd1/2 (Peters et al., 2008). Diese Ergebnisse legen nahe, dass es eine mechanistische Verbindung zwischen Se, selenabhängigen Peroxidasen und Peroxidsignaltransduktion bei der Krebsentstehung und – progression geben könnte (Brigelius-Flohé and Kipp, 2009).

---

<sup>8</sup> Dabei ist zu bedenken, dass in Deutschland die Selenwerte im Mittel bei 50-90 µg/L liegen.



**Abbildung 10:** Modell zur Rolle von Peroxiden und selenabhängigen Peroxidasen bei der Krebsentstehung (Brigelius-Flohé und Kipp, 2009).

Diese Daten legen nahe, dass der Gewebeselenstatus durchaus einen Einfluss auf die Krebsentstehung haben könnte. Wir nehmen an, dass die suboptimale Expression bestimmter Selenoproteine nicht nur durch Variation an ihrem Genort oder durch die globale ernährungsbedingte Selenzufuhr reguliert wird, sondern auch durch den Selentransport und Selenmetabolismus. Das ist ein Grund für unser Interesse an Selenoprotein P, an Mechanismen des Selentransports und an Geschlechterunterschieden bei der Selenoproteinexpression (Riese et al., 2006; Schomburg and Schweizer, 2009).

## 1.4 Selen und Neurodegeneration

### 1.4.1 Selen und neurologische Erkrankungen

Oxidative Schäden durch Peroxide, sog. „Oxidativer Stress“ (Sies, 1986) stehen im Verdacht, zur Auslösung oder zur Pathophysiologie des Alterns und von neurodegenerativen Erkrankungen beizutragen (Coyle and Puttfarcken, 1993; Andersen, 2004). Daher wäre es einsichtig, wenn die Klasse der Selenoproteine mit ihren prominenten und leistungsfähigen Peroxidasen und Reduktasen eine entscheidende Rolle bei der Verhinderung des oxidativen Stresses spielen würde. Während die verfügbaren epidemiologischen Studien eine präventive Wirkung von Se bei einigen Krebsarten und entzündlichen Erkrankungen nahe legen (Rayman, 2000), konnten bislang keine solchen Assoziationen bezüglich häufiger und wichtiger neurologischer Erkrankungen belegt werden.

Bei kindlichen Epilepsien gibt es jedoch eine Reihe von Fallbeschreibungen aus unterschiedlichen Kliniken, die über Jahre immer wieder niedrige Selenspiegel bei Kindern

mit unbehandelbarer Epilepsie berichten – und durch Se Supplementation Behandlungserfolge verzeichnen. Die klarsten Daten sollen hier kurz zusammengefasst werden (Weber et al., 1991; Ramaekers et al., 1994):

Weber et al. berichten von vier Patienten mit unbehandelbarer Epilepsie. Alle Patienten hatten niedrige zelluläre GPx Aktivität in Erythrozyten, wobei bei zwei Patienten auch Plasma GPx und Plasma Se reduziert waren, während diese Parameter bei den beiden anderen normal waren. Die Autoren zogen zwei Schlüsse: 1) GPx1-Defizienz könnte beteiligt sein an kindlicher Epilepsie. 2) Mangel an GPx1 könnte auch durch einen Se Transport-Defekt ausgelöst werden.



Fig. 3 The dry and depigmented hair regained normal colour and texture after selenium substitution.



Fig. 4 X-ray picture of the left knee taken from Patient 2 showing severe osteopenia with irregular metaphyseal linings and extra-osseous calcium deposits consistent with Kashin-Beck disease.

**Abbildung 11:** Charakteristische Selenmangelbefunde beim Patienten von Ramaekers et al., 1994. Links, depigmentiertes, strohiges Haar. Rechts, Osteopenie am Kniegelenk.

Ramaekers et al. berichten von zwei Patienten mit unbehandelbarer Epilepsie und niedrigen bis nicht messbaren Plasma Se Werten. Beide Patienten reagierten positiv auf Se Substitution. Ein Patient wurde anfallsfrei aus der Universitätsklinik entlassen, aber schon nach einem Monat wieder mit *status epilepticus* eingeliefert, nachdem die Se Substitution während der ambulanten Behandlung unterbrochen worden war. Nach erneuter Se Substitution war der Patient wieder anfallsfrei. Dieser Patient zeigte klassische Anzeichen für Se Mangel, wie struppiges, depigmentiertes Haar und verringerte Knochendichte, die positiv auf Se Substitution ansprachen (siehe Abbildung 11). Ramaekers et al. vermuteten, dass die beiden Patienten in ihrem Bericht möglicherweise eine höhere Se Aufnahme benötigen als normale Kinder und spekulierten, dass ein Se Transportdefekt ins Gehirn als Ursache der Erkrankung vorliegen könnte.

Normalerweise kommt es aber bei selenarmer Ernährung nicht zur Depletion des Gehirns und neurologischen Defekten. Se-Defizienz bei total parenteral ernährten Patienten wurde häufig als Ursache für Muskelschwäche, Kardiomyopathie und Depigmentierung der Haare erkannt und konnte durch Berücksichtigung von Se in den Nährlösungen zukünftig verhindert werden



(Collipp and Chen, 1981; Fleming et al., 1982; Brown et al., 1986). Auch bei der Therapie von Epileptikern durch die ketogene Diät kann es zu Se Mangel und Kardiomyopathie kommen, wenn nicht auf adäquate Spurenelement- und Vitaminversorgung geachtet wird (Bergqvist et al., 2003). Diese Beobachtungen sind analog zur „white muscle disease“ genannten Muskelschwäche von selenarm ernährten Kälbern (Muth et al., 1958).

Eine Liste von Studien, in denen mittlere Se Gehalte in Serum, Haaren, Fußnägeln oder Gehirngewebe mit M. Alzheimer oder M. Parkinson assoziiert wurden, haben Chen und Berry zusammengestellt (Chen and Berry, 2003). Solche Studien sind allerdings solange als problematisch zu bewerten, bis nachgewiesen wurde, dass periphere Messungen mit dem Gehirn Se Gehalt korrelieren. *Post mortem* Studien mit Se Bestimmungen im Gewebe wurden andererseits nur an sehr kleinen Kollektiven durchgeführt und nicht nach bekannten (mono-) genetischen Ursachen stratifiziert. Insofern legen die Arbeiten von Weber und Ramaekers eine Verbindung zwischen Se Mangel und kindlicher Epilepsie nahe, es gibt aber keine weiteren überzeugenden Nachweise aus klinischen oder epidemiologischen Studien.

#### 1.4.2 Effekte von Selen oder Selenoproteinen in Tiermodellen neurologischer Erkrankungen

Die verfügbare Literatur wurde in zwei Übersichtsarbeiten zusammengetragen und kritisch bewertet: Schweizer et al., 2004 Brain Research Reviews 45: 164-178 (im Anhang), sowie im Folgenden dargestellt: Schweizer et al., 2004 J Nutrition 134: 707-710.

Seiten 26-29: **Schweizer et al., 2004 J Nutrition 134: 707-710.**  
<http://jn.nutrition.org/cgi/content/full/134/4/707>

## **2. Ergebnisse**

### **2.1 Selenoprotein P als zentrales Selentransport-Molekül**

Verschiedene Beobachtungen aus den Labors von Raymond Burk und Alfred Tappel lieferten Hinweise, dass Selenoprotein P (SePP) ein Selentransportprotein darstellen könnte: Die Gegenwart im Plasma und Abhängigkeit von der Se Aufnahme, der hohe Se Gehalt, die schnelle Resorption nach Injektion in Se-defiziente Ratten und die hohe Expression in der Leber [zusammengefasst bei Burk (Burk and Hill, 2005)] Es gab aber auch Hinweise auf eine enzymatische Funktion von SePP (Arteel et al., 1998;Saito et al., 1999), sowie auf eine Rolle bei der Entgiftung von Schwermetallen (Yoneda and Suzuki, 1997).

**Unser Ziel war es, durch genetische Inaktivierung von SePP die Bedeutung dieses Proteins für den Se Stoffwechsel *in vivo* zu untersuchen.**

In der folgenden Publikation, Schomburg, Schweizer et al., 2003, Biochem J 370, wird gezeigt, dass der Se Gehalt und die Aktivität von Se-Enzymen in Plasma, Gehirn, Niere und Hoden von *Sepp*<sup>-/-</sup> Mäusen erniedrigt sind. Im Gegensatz dazu steigt der Se Gehalt der Leber sogar an, ein Hinweis darauf, dass Se unter Normalbedingungen aus der Leber in Form von SePP über das Plasma mobilisiert wird und zur Versorgung von Niere, Gehirn und Hoden dient.

Wir fanden bei *Sepp*<sup>-/-</sup> Mäusen noch zwei weitere augenfällige Phänotypen: Einen Wachstumsdefekt, sowie neurologische Auffälligkeiten. Dabei zeigten *Sepp*<sup>-/-</sup> Mäuse etwa zwei Wochen nach der Geburt einen auffälligen Bewegungsphänotyp, sowie gelegentliche Anfälle, die durch Stress provoziert werden. Die beobachtete männliche Infertilität haben wir zunächst nicht weiter verfolgt.

Da bis dahin bei Se-arm ernährten Tieren keine neurologischen Defekte beschrieben waren, jedoch die Arbeiten von Weber et al., 1991 und Ramaekers et al., 1994 die Möglichkeit einer physiologischen Bedeutung von Se nahe legten, entschied ich mich, die Rolle von Se und von Selenoproteinen für die Funktion des Gehirns zu untersuchen.

#### **2.1.1 Schomburg, Schweizer et al. 2003 Biochem J 370:397-402.**

Seiten 31-36: **Schomburg, Schweizer et al. 2003 Biochem J 370:397-402.**  
<http://www.biochemj.org/bj/370/0397/bj3700397.htm>

### 2.1.2 Schweizer et al. 2004 Biochem J 378, 21-26

In dieser Publikation stellten wir die Frage, ob Supplementation mit anorganischem Se (Selenit) die Ausbildung der biochemischen, neurologischen und Wachstumsphänotypen verhindern kann. **Dahinter steht die Frage, ob der Mangel an Se oder der Mangel an SePP für die beobachteten Phänotypen verantwortlich ist.**

Wir supplementierten daher *Sepp*<sup>+/-</sup> Weibchen bereits ab der Verpaarung mit Natriumselenit im Trinkwasser. Sowohl die Wachstumsretardation als auch die Aktivität von Selenoenzymen in Geweben sowie der neurologische Phänotyp wurden durch Se Supplementation normalisiert bzw. verhindert. Durch Titration der Selenitkonzentration konnten wir zeigen, dass schon 10 µM Selenit ausreichen, alle gemessenen Parameter zu normalisieren, wobei bei dieser Konzentration auch keine Se Anreicherung bei Normaltieren zu beobachten war.

Wir können also aus diesen Daten schließen, dass nicht das Fehlen von SePP, sondern das Fehlen von Se im Gehirn für die Ausbildung des neurologischen Phänotyps verantwortlich ist. Damit erhebt sich aber für die Zukunft die Frage, wie die physiologische Funktion von Se im Gehirn vermittelt wird. Wir nehmen an, dass dies durch Selenoproteine geschieht und weiter unten wird dieser Gedanke weiter verfolgt.

In dieser Publikation nicht gezeigt sind Daten, in denen wir den Zeitpunkt der Se Supplementation variiert hatten. Wurde die Supplementation spätestens bei der Geburt begonnen, konnte der neurologische Phänotyp noch verhindert werden. Eine Supplementation ab dem Zeitpunkt des Absetzens von der Mutter reichte nicht mehr aus, die Entwicklung der neurologischen Defekte zu verhindern. Wir interpretierten diese Ergebnisse als einen Hinweis auf eine Se-abhängige Entwicklungsstörung des Gehirns. Wurde Se-supplementierten *Sepp*<sup>-/-</sup> Tieren erst im Erwachsenenalter das Se Supplement entzogen, kam es verzögert zur Ausbildung des Bewegungsphänotyps gefolgt von gelegentlichen epileptischen Anfällen. Dieser Befund ist wiederum ein Hinweis auf eine Neurodegeneration durch Se Mangel.

Diese Studien wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Thomas Klopstock in München vertieft, der bei *Sepp*<sup>-/-</sup> Tieren Video-EEG Aufnahmen durchführte, die die epileptischen Anfälle bestätigen. Die diesbezüglichen Daten sind jedoch noch unpubliziert (*in Vorbereitung*).

Seiten 38-43: **Schweizer et al. 2004 Biochem J 378, 21-26.**  
<http://www.biochemj.org/bj/378/0021/bj3780021.htm>

### 2.1.3 Schweizer et al., 2005 Biochem J 386: 221-226

In dieser Arbeit sind wir nochmals zur Frage nach der Rolle von SePP beim Se Transport zurückgekehrt. **Wir wollten wissen, ob die Leber die verantwortliche Quelle für Plasma SePP darstellt.**

Kurz vorher hatte die Gruppe von Dolph Hatfield die Brust-spezifische Inaktivierung der tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> (Gensymbol *Trsp*) publiziert (Kumaraswamy et al., 2003). Ich hatte daraufhin sofort Dr. Hatfield kontaktiert und gebeten, mir die konditionale *Trsp* Maus zur Verfügung zu stellen. Wir begannen auch sogleich eine Kooperation bezüglich Leber-spezifischer *Trsp*-defizienter Mäuse, da sie aus meiner Sicht auch als Leber-spezifische SePP knockout Mäuse interpretiert werden können, wenn man nicht die Leber, sondern den Rest des Körpers betrachtet.

Tatsächlich ist der Plasma Se Gehalt von *Alb-Cre; Trsp<sup>f/f</sup>* Mäusen praktisch identisch mit dem Plasma Se Gehalt von *Sepp<sup>-/-</sup>* Mäusen, und im Serum liegt SePP unter der Nachweisgrenze für Western Blots. Die Niere verarmt genauso an Se wie in *Sepp<sup>-/-</sup>* Mäusen, aber der Gehirn Se Gehalt und die Expression von Selenoenzymen im Gehirn sind normal. Auch entwickeln diese Tiere keine neurologischen Defekte. Sie ähneln daher eher Se-arm gefütterten Mäusen (deren Plasma Se Gehalt und Plasma SePP ebenfalls signifikant erniedrigt sind, die aber ebenfalls keine neurologischen Defekte zeigen).

Wir interpretierten diese Daten, indem wir in unserem Modell für den Se Stoffwechsel eine gewisse Unabhängigkeit des Gehirn Se Status vom zirkulierenden Se postulieren. Da der Import von Se via Plasma SePP in *Alb-Cre; Trsp<sup>f/f</sup>* Mäusen sehr erniedrigt sein sollte, fordern wir einen Mechanismus zur Se Retention im Gehirn, der ebenfalls SePP-abhängig ist (Schomburg et al., 2004). Dieses Modell setzt allerdings eine gezielte, wahrscheinlich Rezeptor-vermittelte SePP Aufnahme oder Bindung innerhalb des Gehirns voraus. Damit wird erstmals dem lokal im Gehirn exprimierten SePP eine Rolle zugewiesen. In unseren Augen sollte dieses lokal synthetisierte SePP einen reversibel nutzbaren Se Speicher im Gehirn darstellen, der andererseits aber für Zellen im Parenchym bioverfügbar ist.

Seiten 45-50: **Schweizer et al., 2005 Biochem J 386: 221-226.**  
<http://www.biochemj.org/bj/386/0221/bj3860221.htm>



#### 2.1.4 Renko et al., 2008 Biochem J 409: 741-749

In dieser Arbeit haben wir erneut die Frage nach der **relativen Bedeutung von hepatisch und cerebral synthetisierten SePP** gestellt.

Dazu haben wir in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Ingrid Renner-Müller (LMU München) humane *SEPP* cDNA unter der Kontrolle des Leber-spezifischen Transthyretin-Promotors transgen in der Maus exprimiert. Durch Kreuzung auf einen *Sepp*-defizienten genetischen Hintergrund konnten wir so Mäuse generieren, die SePP zwar in der Leber, aber nicht in anderen Organen, wie dem Gehirn, exprimieren. Das Experiment ist also konzeptionell das Negativbild der vorangestellten Arbeit, in der die SePP Expression nur in der Leber ausgeschaltet war. Die Verwendung einer humanen SEPP cDNA erlaubt uns, mit Hilfe unseres human-spezifischen SePP-ELISAs (Hollenbach et al., 2008) das hepatische humane SePP vom endogenen Maus-SePP zu unterscheiden.

Wir konnten eine funktionelle Komplementation mit hepatischem *SEPP* Transgen in *Sepp*<sup>-/-</sup> Mäusen zeigen. Sowohl die männliche Infertilität, der Wachstumsdefekt, die neurologischen Defekte, als auch die Expression von Selenoenzymen in Niere und Gehirn wurden fast oder vollständig normalisiert. Diese Befunde waren nicht unerwartet. Unser eigentliches Ziel war es jedoch, durch Se-arme Fütterung die Expression des hepatischen SePP im *Sepp*<sup>-/-; tgSEPP</sup> Modell zu erniedrigen und zu beobachten, ob sich ein neurologischer Phänotyp einstellt.

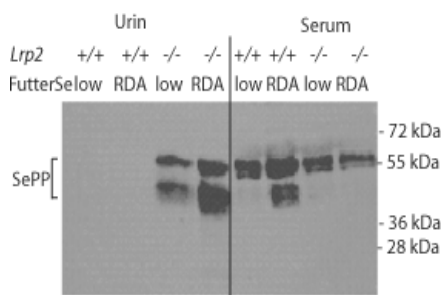
In der Tat ist unter Se Mangel Bedingungen das hepatische *SEPP* Transgen nicht mehr in der Lage, den Verlust von Se im Gehirn zu verhindern. Wir werten dieses Ergebnis als starken Hinweis darauf, dass in diesem Modell zwar der Transport von Se zum Gehirn via SePP stattfindet, aber das Se im Gehirn nicht durch lokal synthetisiertes SePP fixiert werden kann. Bei Se Mangel, wenn also der SePP Gehalt im Serum sinkt, wird der Se Verlust des Gehirns nicht mehr ausgeglichen. Es ist also die Expression von SePP im Gehirn, welche den Gehirn Se Gehalt von der Ernährung unabhängig macht.

Seiten 52-60: **Renko et al., 2008 Biochem J 409: 741-749.**  
<http://www.biochemj.org/bj/409/0741/bj4090741.htm>

### 2.1.5 Megalin als Rezeptor für Selenoprotein P

Die Arbeitsgruppe von Dr. Raymond Burk an der Vanderbilt Universität in Nashville, TN, hat kürzlich gezeigt, dass Lrp8/ApoER2 ein Rezeptor für SePP im Hoden ist (Olson et al., 2007). Füttert man *ApoER2*<sup>-/-</sup> Mäuse Se-armes Futter, so zeigen sie einen neurologischen Phänotyp, der an *Sepp*<sup>-/-</sup> Mäuse erinnert (Burk et al., 2007; Valentine et al., 2008). Aufgrund der gewebespezifischen Expression von ApoER2 ist anzunehmen, dass es noch weitere SePP Rezeptoren in Geweben wie z.B. der Niere gibt. Die breite Substratspezifität der LRP und ihre Homologie innerhalb der Genfamilie legten nahe, dass möglicherweise andere LRP ebenfalls SePP binden können. **Wir haben daher die Hypothese aufgestellt, dass Megalin (*Lrp2*) einen SePP Rezeptor in der Niere darstellen könnte.**

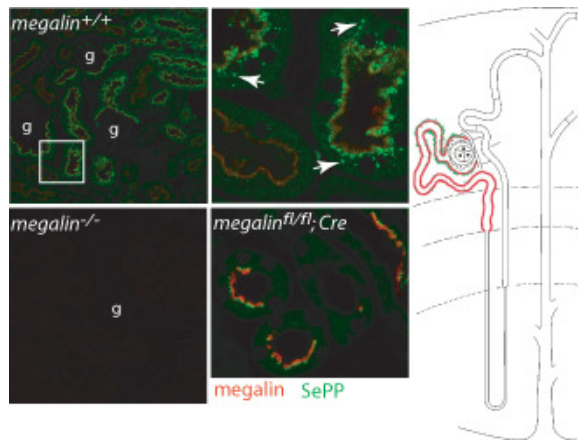
Um diese Hypothese zu prüfen, haben wir den Urin von *Megalin*<sup>-/-</sup> Mäusen per Western Blot auf die Gegenwart von SePP getestet. Während im Urin von Wildtypmäusen kein SePP nachweisbar ist, scheiden *Megalin*<sup>-/-</sup> Mäuse eindeutig SePP aus (Abb. 12). Dieser Befund ist ein guter Hinweis, dass SePP in der Niere filtriert wird und abhängig von Megalin im Nierentubulus aus dem glomerulären Filtrat resorbiert wird.



**Abbildung 12:** Nachweis von SePP im Urin von *Megalin(Lrp2)*<sup>-/-</sup> Mäusen. Die Tiere wurden entweder auf Se-adäquatem (RDA, *recommended dietary allowance*, 0,15 mgSe/kg) oder Se-armem Futter (low, 0,08 mgSe/kg) gehalten. Nur bei homozygoter Mutation in *Lrp2*, wird SePP im Urin ausgeschieden. Serum dient zum Größenvergleich.

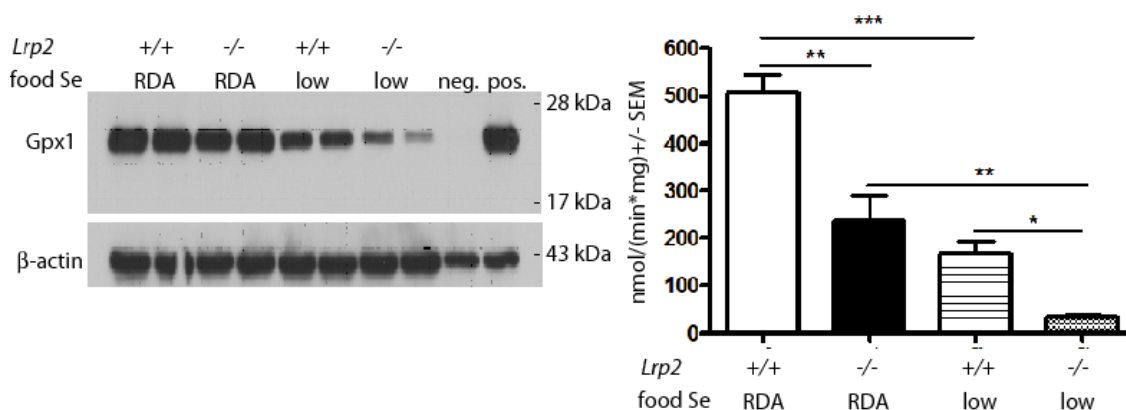
Wir haben daraufhin ein Projekt initiiert, um die Rolle von Megalin beim Se Transport in Niere und Gehirn zu untersuchen. Solche Untersuchungen sind sehr schwierig mit den klassischen *Megalin*<sup>-/-</sup> Mäusen, da mehr als 90% der homozygoten Mutanten bald nach der Geburt sterben. Im Gegensatz verwendeten wir einen Mausstamm mit einer STOP-Mutation (Y2721X) in der extrazellulären Domäne des *Megalin*-Gens, der durch chemische Mutagenese in FVB/N Mäusen erzeugt wurde (Zarbali et al., 2004). Vermutlich aufgrund des unterschiedlichen genetischen Hintergrunds (FVB/N versus C57Bl/6), überlebt ein signifikanter Anteil der Mäuse mit homozygoter *Megalin*-Mutation auf FVB/N Hintergrund.

In den folgenden Abbildungen soll ein Einblick in die laufenden Untersuchungen eröffnet werden, die in unseren Augen nahe legen, dass Megalin als physiologischer SePP Rezeptor in Niere und Gehirn wirkt (*in Vorbereitung*).



**Abbildung 13:** Nachweis von SePP-Immunreaktivität an der apikalen Membran des proximalen Nierentubulus. SePP, grün; Megalin, rot; g, Glomerulus. SePP bindet nicht an *Megalin*-defiziente Zellen. Als weitere Kontrolle dienten Mäuse mit unvollständiger Inaktivierung von Megalin im Nierentubulus (*megalin<sup>fl/fl</sup>; Cre*). In Kollaboration mit Dr. Franziska Theilig, Centrum für Anatomie. Das Schema rechts verdeutlicht die Verteilung von SePP- und Megalin-Immunreaktivität in der Niere.

Während unserer Untersuchungen zeigten Burk und Kollegen unabhängig, dass die Assoziation von SePP an die Bürstensaummembran des proximalen Tubulus von Megalin abhängt und in embryonalen Nieren von *Megalin*<sup>-/-</sup> Mäusen nicht zu beobachten ist (Olson et al., 2008). Aufgrund der Verwendung von *Megalin*<sup>-/-</sup> Mäusen des Stammes C57Bl/6, konnten diese Autoren allerdings keine Aussagen zur Bedeutung von Megalin für den postnatalen Se Stoffwechsel machen. Mithilfe unseres Modells sind wir nun in der Lage, diese Frage zu adressieren.

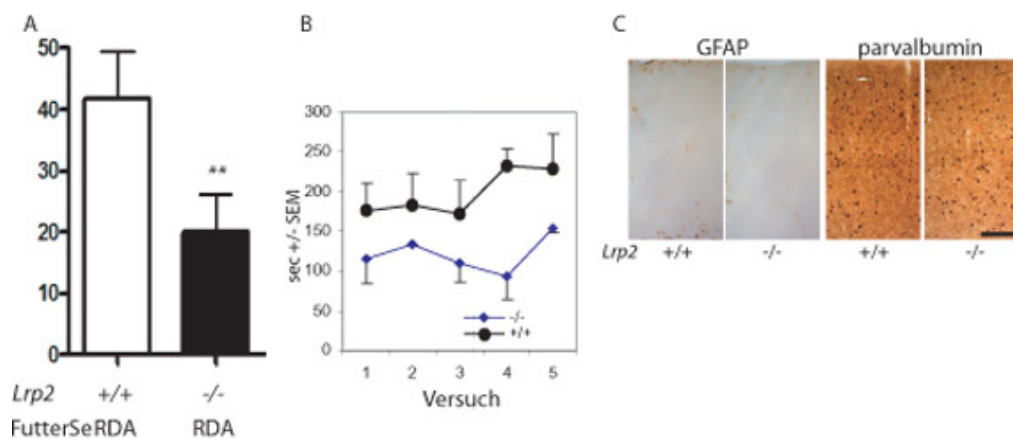


**Abbildung 14:** Expression von GPx1 Protein und Aktivität in Nieren von *Megalin*-defizienten Mäusen. Die Tiere wurden entweder auf Se-adäquatem (RDA, *recommended dietary allowance*, 0,15 mgSe/kg) oder Se-armem Futter (low, 0,08 mgSe/kg) gehalten.

Die erniedrigte Expression von GPx1 in den Nieren von *Megalin*-defizienten Mäusen lässt darauf schließen, dass ein signifikanter Anteil des Serum-Se bei diesen Mäusen im Urin ausgeschieden wird.

Was ist normalerweise die Bedeutung des tubulär rückresorbierten SePP? Wir sehen zwei hypothetische Möglichkeiten: Durch Transzytose von SePP durch das Tubulusepithel könnte SePP direkt in die Zirkulation zurückgeführt werden. Die zweite Möglichkeit wäre die Neusynthese von GPx3, dem zweiten Plasma-Selenoprotein, welches im S1 Segment des Tubulus in die Zirkulation sezerniert wird.

Wir fanden weiterhin eine Reduktion des Selengehalts und der GPx1 Aktivität im Gehirn von *Megalin*-defizienten Mäusen (Abb. 15). Ähnlich wie bei *Sepp*-defizienten Mäusen ist in diesen Tieren eine Beeinträchtigung der Bewegungskoordination beim Rotarod-Test nachweisbar, allerdings nur vergleichsweise mild und unter Se-defizienten Futterbedingungen. Anders als bei *Sepp*<sup>-/-</sup> Mäusen sind bei *Megalin*<sup>-/-</sup> Mäusen keine Astrogliose und kein Verlust der Parvalbumin-Expression in Interneuronen zu beobachten (s.u.).



**Abbildung 15:** Biochemische und neurobiologische Phänotypen von *Megalin*-defizienten Mäusen. (A) GPx1 Aktivität im Gehirn ist reduziert in *Lrp2*<sup>-/-</sup> Mäusen. (B) Rotarod-Analyse zeigt eine moderate Verschlechterung der Motorkoordination bei *Lrp2*<sup>-/-</sup> Mäusen. (C) Immunhistochemie gegen GFAP und Parvalbumin im Gehirn zeigen keine Unterschiede zwischen *Lrp2*<sup>-/-</sup> Mäusen und Kontrollen. \*\*p<0.01, Student's t-Test.

## **2.2 Selenoproteine im Gehirn**

Im vorhergehenden Abschnitt wurde die Frage behandelt, wie Se in das Gehirn transportiert und dort verteilt und gespeichert wird. In diesem Abschnitt soll die Frage beleuchtet werden, welche physiologischen Funktionen Se im Gehirn besitzt. Grundsätzlich ist nur ein Stoffwechselweg bekannt, in dem Se bei Säugern eine Rolle spielt, nämlich die Biosynthese von Selenoproteinen. Folgt man der Hypothese, dass das Fehlen von Selenoproteinen für die Entwicklung der neurologischen Defekte in Menschen und Tieren mit Se Mangel im Gehirn verantwortlich ist, dann stellen sich sofort die Fragen: Welche Selenoproteine sind im Gehirn wichtig? In welchen Zellen führen sie dort welche Funktionen aus?

### *2.2.1 Scharpf et al., 2007 J Neural Transmission 114(7): 877-884*

Es gibt keine systematischen Untersuchungen zur Expression von Selenoproteinen im menschlichen Gehirn. Die verfügbare Literatur dazu wurde bereits an anderem Ort zusammengefasst (Schweizer et al., 2004). Ausgehend von der Idee, dass SePP eine Rolle bei der Verteilung von Se im Gehirn spielen könnte, haben wir in der folgenden Publikation seine Expression im menschlichen Gehirn histologisch untersucht. Wir fanden SePP-Immunreaktivität vor allem auf Neuronen, in bzw. entlang von Fasertrakten und entlang des Ependyms. Darüber hinaus konnten wir SePP per Western Blot in menschlicher Zerebrospinalflüssigkeit nachweisen.

Seiten 65-72: **Scharpf et al., 2007 J Neural Transmission 114(7): 877-884.**  
<http://www.springerlink.com/content/p60rl76412428636/>

### 2.2.2 Zhang et al., 2008 J Biol Chem 284(4): 2427-2438

In dieser Publikation haben wir in Zusammenarbeit mit Dr. Vadim Gladyshev (damals Department of Biochemistry, Universität von Nebraska, Lincoln, jetzt Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston) die **Expression von Selenoproteinen im Gehirn der Maus** systematisch untersucht. Wir nutzten dazu die Veröffentlichung des Allen-Brain-Atlas (Lein et al., 2007), einer *online* Datenbank für die Expression aller Gene im Gehirn. Für den Allen Brain Atlas wurden im industriellen Maßstab genomweit *in situ*-Hybridisierungen auf Gehirnschnitten erwachsener Mäuse durchgeführt und die Daten orts aufgelöst mit ihrer Signalstärke abgelegt. Wir haben die resultierenden Daten bezüglich der Expression von Selenoproteinen und Komponenten ihrer Biosynthese systematisch ausgewertet. Dabei zeigte sich, (i) dass fast alle Selenoproteine im Gehirn als mRNA exprimiert sind, (ii) dass vier Gehirnregionen die höchste Anzahl an Selenoproteinen und die höchsten Spiegel an mRNA exprimieren: Riechkolben, Großhirnrinde, Kleinhirnrinde und Hippokampus. Drittens konnten wir zeigen, dass die Expressionsmuster fast immer neuronal sind. Nur *Sepp* wird nach den Daten Oligodendrozyten-spezifisch exprimiert.



Seiten 74-85: **Zhang et al., 2008 J Biol Chem 284(4): 2427-2438.**  
<http://www.jbc.org/content/283/4/2427.long>

### 2.2.3 Sørensen et al., 2008 PLoS One 3(3): e1813

Wie weiter unten beschrieben wird, haben wir die tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> zelltypspezifisch in Neuronen ausgeschaltet, um zu untersuchen, ob Selenoproteine in Neuronen essentiell sind. Dieses Experiment war ursprünglich als *proof-of-principle* angelegt, erwies sich aber im Laufe der Zeit als instruktiv für viel detailliertere Untersuchungen, die unten ausgeführt werden. Kurz zusammengefasst fanden wir, dass Selenoproteine essentiell für Neuronen sind, und starteten deshalb ein langfristig angelegtes Projekt, in dem das Fehlen aller Selenoproteine einzeln in transgenen Mäusen untersucht werden soll.

In Zusammenarbeit mit Dr. Markus Brielmeier, Helmholtz-Zentrum München, haben wir die **Thioredoxinreduktase 1 (*Txnrd1*) konditional in Neuronen ausgeschaltet**. Zu unserer Überraschung fanden wir außer der Reduktion der Thioredoxinreduktase-Aktivität im Gehirn keinen Phänotyp. Die neurale Inaktivierung der *Txnrd2* lieferte ebenfalls keinen Hinweis auf neurologische Defekte, weshalb wir die neuronspezifische Inaktivierung von *Txnrd2* abbrachen. Die Inaktivierung von *Txnrd1* in neuronalen Vorläufern, aus denen sowohl Neurone als auch Gliazellen hervorgehen, führte zu zerebellärer Hypoplasie und Ataxie. Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse in Abhängigkeit der verwendeten Cre-transgenen Mäuse nehmen wir an, dass möglicherweise die Radialglia *Txnrd1*-Aktivität braucht, während Neurone offenbar darauf verzichten können. Es wurden jeweils keine Vorderhirndefekte gefunden. Möglicherweise komplementieren in den transgenen Mutanten *Txnrd1* und *Txnrd2* den Verlust der jeweils anderen Isoform.

Seiten 87-96: **Sørensen et al., 2008 PLoS One 3(3): e1813.**  
<http://www.plosone.org/article/info:doi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0001813>

#### 2.2.4 Seiler et al., 2008 Cell Metabolism 8: 237–248

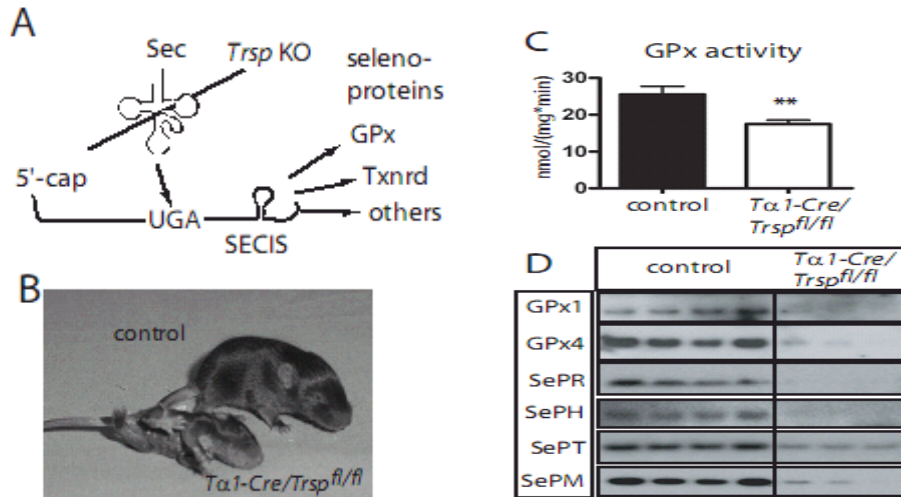
Glutathionperoxidase 4 ist essentiell (Yant et al., 2003). Wir haben deshalb in Zusammenarbeit mit Dr. Marcus Conrad, Helmholtz-Zentrum München, ***Gpx4* spezifisch in Neuronen ausgeschaltet**. Wir konnten zeigen, dass der Verlust von GPx4 in postmitotischen zerebrokortikalen Neuronen zu einem neurologischen Phänotyp mit Bewegungsstörungen und Übererregbarkeit führt. Neuronaler Zellverlust trat vor allem in der CA3 Region im Ammonshorn auf, allerdings konnten wir im ganzen Vorderhirn massive Astrogliose beobachten, die nahe legt, dass der Verlust von GPx4 in Neuronen in der ganzen Großhirnrinde zur Neurodegeneration führt. In primären neokortikalen Neuronkulturen konnten wir zeigen, dass *Gpx4*-defiziente Neurone nach ungefähr einer Woche in Kultur spontan und fast gleichzeitig absterben. Der neuronale Zelltod konnte durch Zugabe von Vitamin E verhindert werden. Wir werten das als Hinweis, dass die Lipidperoxidase-Aktivität von GPx4 essentiell ist, da Vitamin E der Lipidperoxidation ebenfalls entgegen wirken kann. In der gleichen Arbeit wird in Fibroblasten gezeigt, dass die Lipidperoxidation von 12/15-Lipoxygenase (12/15-Lox) initiiert wird und zur Freisetzung von *apoptosis-inducing-factor* (AIF) aus den Mitochondrien führt. Inhibition mit einem 12/15-Lox-Inhibitor, sowie genetische Defizienz von *12/15-Lox* oder Vitamin E unterbrechen die pro-apoptotische Signaltransduktion in *Gpx4*-defizienten Zellen. Da *12/15-Lox*-defiziente Mäuse im Ischämie-Modell teilweise geschützt sind (van Leyen et al., 2006), legen die Ergebnisse nahe, dass *Gpx4* eine wichtige Rolle für die Neuroprotektion spielen könnte. Gleichzeitig könnte GPx4 eine wichtige Verbindung zwischen Se und Neurodegeneration darstellen.

Seiten 98-109: **Seiler et al., 2008 Cell Metabolism 8: 237–248.**

<http://www.cell.com/cell-metabolism/fulltext/S1550-4131%2808%2900212-X>

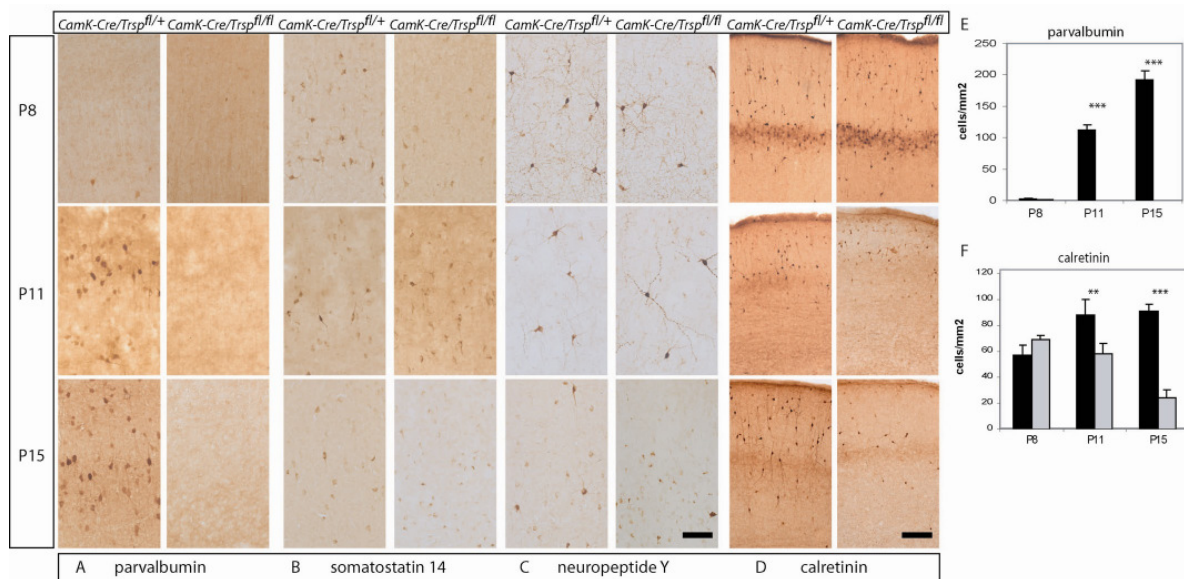
2.2.5 Wirth et al., 2009, FASEB J, im Druck

Die **neuronspezifische Inaktivierung der tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> (*Trsp*)** führt zu massiver Neurodegeneration innerhalb der ersten beiden Wochen nach der Geburt (Abb. 16).



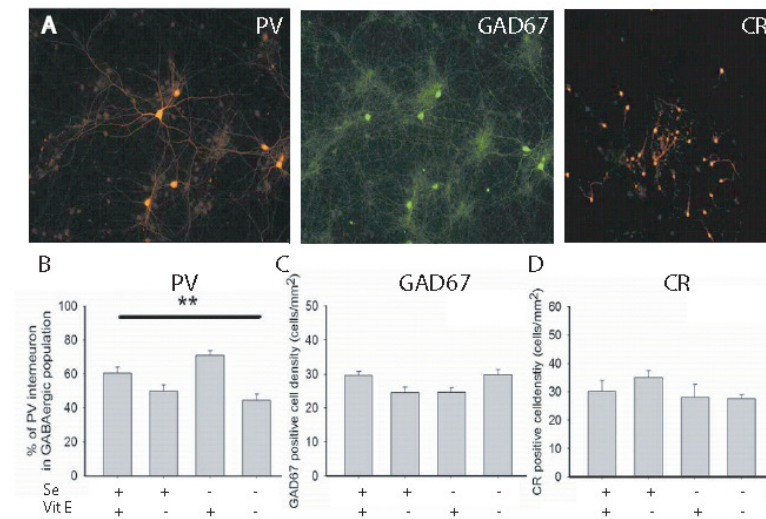
**Abbildung 16:** Neuronspezifische Inaktivierung der Selenoprotein-Biosynthese. (A) Schematische Darstellung der genetischen Manipulation. (B) Fehlende Kontrolle der Körperhaltung in *Tal-Cre/Trsp<sup>fl/fl</sup>* Mäusen. Postnataltag 10. (C) Glutathionperoxidaseaktivität ist reduziert im Vorderhirn der Mutanten. (D) Western Blot Analyse von Selenoproteinen im Gehirn.

Wir stellten fest, dass in *Trsp*-Mutanten die Expression von Parvalbumin (PV) in kortikalen Interneuronen in der zweiten postnatalen Woche signifikant reduziert war. Gleichzeitig blieb die Dichte der Somatostatin+, Neuropeptid Y+ und Calretinin (CR)+ Interneurone zunächst unverändert (Abb. 17).



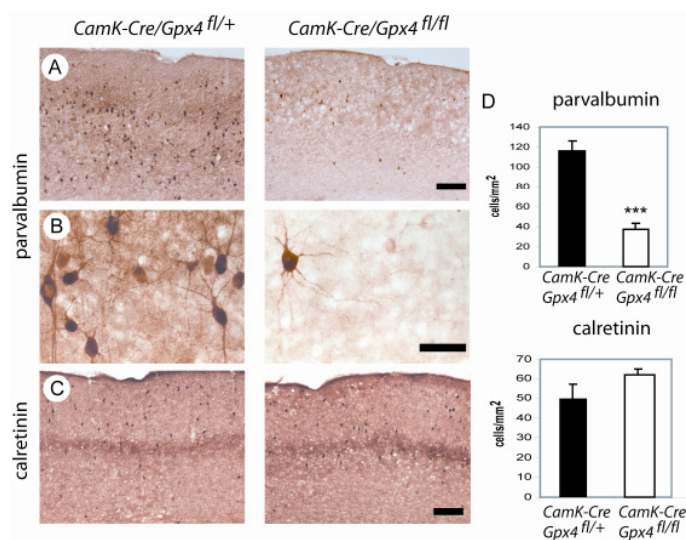
**Abbildung 17:** Entwicklung von PV+ Interneuronen in der Großhirnrinde. Immunhistochemischer Nachweis zu Postnataltagen (P) 8-15. (E, F) Quantitative Analyse.

Die Entwicklung von neokortikalen PV+ Interneuronen wurde *in vitro* durch Se- und Vitamin E-Mangel erniedrigt (Abb. 18).



**Abbildung 18:** Abhängigkeit der Parvalbumin Expression von Selen und Vitamin E *in vitro*. (A) Neokortikale Neuronen wurden nach 17 Tagen *in vitro* mit Antikörpern gegen Parvalbumin (PV), Calretinin (CR) und GAD67 gefärbt. (B-D) Quantifizierung der Anzahl immunopositiver Zellen in Abhängigkeit von Selenit und  $\alpha$ -Tocopherol im Medium.  $**p < 0.01$ , ANOVA.

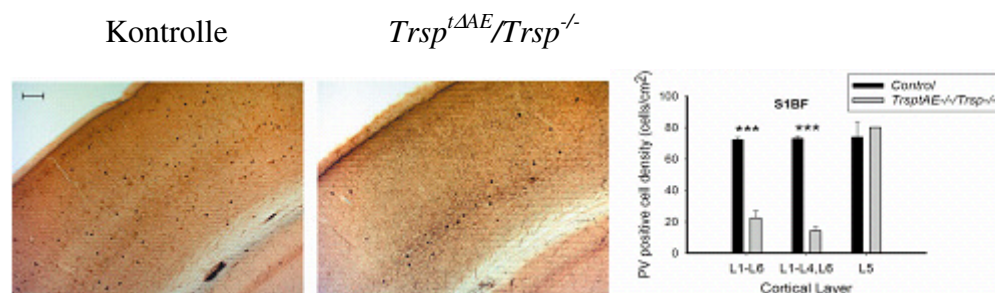
Wir schlossen daher auf eine mögliche Beteiligung der GPx4 an der Expression von PV und untersuchten die Entwicklung von kortikalen Interneuronen in neuronspezifischen *Gpx4*-defizienten Mäusen. Wie erwartet war die Reifung von PV+, aber nicht CR+, Interneuronen in den *Gpx4*-defizienten Mäusen signifikant erniedrigt (Abb. 19). Der Gewebeschaden in *Trsp*-defizienten Mäusen war größer als in *Gpx4*-defizienten, das bedeutet, dass vermutlich noch weitere Selenoproteine für Neuronen essentiell sind.



**Abbildung 19:** Entwicklung kortikaler Interneurone in *Gpx4*-defizienten Mäusen. Die Anzahl von Parvalbumin-exprimierenden Interneuronen ist reduziert, jedoch die von Calretinin-exprimierenden.  $***p < 0.001$ , Student's t-Test.

### 2.2.6 Carlson et al., 2009 Biochem J 418: 61-71

Die Mausmodelle mit Inaktivierung einzelner Selenoproteine in Neuronen sind einerseits artifiziiell, andererseits sind Mutationen in SEPN1 ja bereits bekannt. Überdies kann man sich vorstellen, dass Mutationen, welche die Selenoprotein Biosynthese Maschinerie betreffen, ebenfalls zu neurologischen Problemen führen. Im Falle von hypomorphen Allelen von SECISBP2 ist das zwar nicht der Fall (Dumitrescu et al., 2005), aber bei einem Mausmodell, welches ein **hypomorphes Allel der tRNA<sup>[Ser]Sec</sup>** trägt. Dazu wurde vor einem *Trsp*-defizienten genetischen Hintergrund ein mutiertes *Trsp* Allel transgen exprimiert, in welchem die Bindungsregion („activator region“-AE) für „selenocysteine tRNA activating factor“, Staf deletiert ist (*Trsp<sup>ΔAE</sup>*). Staf ist ein Transkriptionsfaktor, der sowohl mit RNA Polymerase II wie auch RNA Polymerase III kooperiert (Schuster et al., 1995; Myslinski et al., 2006). Diese Mäuse weisen einen neurologischen Phänotyp auf, der dem von *Sepp*-defizienten Mäusen frappierend ähnelt. Entsprechend ist die Expression von Selenoproteinen, einschließlich GPx4, im Gehirn und anderen Organen erniedrigt. Wir haben gefunden, dass diese Tiere eine Astrogliose im Neokortex aufweisen und eine Reduktion der Dichte von PV+ Zellen. Inzwischen haben wir den Verlust von PV+ Zellen in den Zellschichten der Großhirnrinde quantifiziert und ermittelt, dass Schicht 5 vom Verlust von PV+ Zellen ausgenommen ist (Abb. 20). Da die Expression von GPx4 von weiteren mRNA-bindenden Proteinen abhängig ist, sind diese potentielle Kandidaten für genetische Defekte, bei denen die Expression von GPx4 im Gehirn pathologisch gestört ist (Ufer et al., 2003; Ufer et al., 2008; Blackinton et al., 2009).



**Abbildung 20:** Reduktion der Dichte von PV+ Zellen in *Trsp<sup>ΔAE</sup>/Trsp<sup>-/-</sup>* Mäusen. PV immunopositive Neuronenprofile wurden im primären somatosensorischen Kortex (*barrel field*, S1BF) gezählt.



Seiten 113-123: **Carlson et al., 2009 Biochem J 418: 61-71.**  
<http://www.biochemj.org/bj/418/0061/bj4180061.htm>

### 3. DISKUSSION

In dieser Schrift werden die molekularen Mechanismen des Selentransports zum Gehirn und die Rolle von Selenoproteinen im Gehirn beschrieben. Die zentrale zugrunde liegende These besagt, dass die physiologische Bedeutung des essentiellen Spurenelements Selen für das Gehirn durch die Expression und die Aktivität von Selenoproteinen vermittelt wird.

Dem Selen kommt eine herausgehobene Stellung unter den Spurenelementen zu, denn es unterscheidet sich von anderen Spurenelementen, v.a. den Halbmetallen und Metallen, weil es als Sec obligater, kovalent gebundener Teil von Proteinen ist. Weiterhin wird Sec als 21ste proteinogene Aminosäure kotranslational in Proteine eingebaut. Die entsprechende mRNA von Selenoproteinen enthält daher ein UGA Codon, das im Zusammenwirken mit dem SECIS Element zu Selenocystein umkodiert wird. Vergleicht man die Anzahl von 24-25 Selenoproteinen in Säugern mit den zwei Cobalamin-, den vier Biotin- und vier Cu-abhängigen Enzymen, dann kann man ermessen, dass das Studium von Selenoproteinen nicht ohne Bedeutung ist. Darüberhinaus stellt die Umkodierung des UGA Codons bei der Biosynthese von Selenoproteinen ein Paradigma dar, dessen grundlegende Bedeutung unabhängig von der Erforschung von Spurenelementen ist.

Das in dieser Arbeit beschriebene Projekt der Aufklärung der biologischen Rolle von Selen im Gehirn nahm seinen Anfang in dem unerwarteten neurologischen Phänotyp der *Sepp*-defizienten Mäuse, die in unserem Labor generiert wurden (Schomburg et al., 2003). Bis dahin war eine Rolle von Selen im Gehirn allenfalls vermutet worden, weil anekdotisch die Expression des einen oder anderen Selenoproteins im Gehirn berichtet wurde oder klinische Fallberichte einen niedrigen Selenspiegel bei Patienten mit Epilepsie korrelierten. Es sind hingegen keine Berichte bekannt, die gezeigt hätten, dass selenarme Fütterung von Versuchstieren spontane neurologische Defekte provoziert. Zu Beginn des Projektes standen daher sehr grundsätzliche Fragen: Beruht der neurologische Phänotyp der *Sepp*-defizienten Mäuse auf Selenmangel oder ist der Phänotyp sekundär zu einem anderen metabolischen Problem? Gibt es neuropathologische Befunde, die mit dem neurologischen Phänotyp korrelieren? Wie kommt Selen ins Gehirn? Welche Selenoproteine sind im Gehirn exprimiert? An welchen Prozessen sind diese Selenoproteine im Gehirn beteiligt? Könnte eine Störung des Selenmetabolismus im Gehirn bei neurodegenerativen Erkrankungen des Menschen eine Rolle spielen?

Naturgemäß ist man versucht, die letzte Frage zuerst zu beantworten, um sich schnell eine Meinung zu bilden. Aber wie misst man eine potenzielle Störung des Selenmetabolismus im Gehirn? Nach Sichtung der verfügbaren Literatur hatten wir die Ansicht, dass die bisher erhobenen Daten deshalb unbrauchbar sind, weil niemals gezeigt worden war, ob und inwiefern Serum-, Haar- oder Zehennägel-Selengehalte die Expression von Selenoproteinen im Gehirn reflektieren (Schweizer et al., 2004). *Post-mortem* Analysen mögen Aufschluss über den Selengehalt im Gehirngewebe geben – aber welches Areal ist repräsentativ? Ist das Selen in der weißen Substanz bioverfügbar für Nervenzellen? Letztlich können *post-mortem* Analysen nur den Endpunkt der Erkrankung darstellen und erlauben keine Aussagen zur Kausalität.

Wir haben uns deshalb entschlossen, zwei Fragenkomplexe parallel und im Dialog zu entwickeln, um die Basis für ein Verständnis der Neurobiologie des Selens zu legen. Der erste Fragenkomplex dreht sich um den Transport von Selen im Körper und besonders ins Gehirn und die Rolle von Selenoprotein P und seiner möglichen Rezeptoren bei diesen Prozessen. Der zweite Fragenkomplex dreht sich um die Expression von Selenoproteinen im Gehirn, die Identifikation der „wichtigen“ Selenoproteine und der neurobiologischen Prozesse, an denen sie beteiligt sind.

### **Selenoprotein P und Selentransport**

Wir haben durch genetische Inaktivierung gezeigt, dass Selenoprotein P für den Selentransport bei der Maus notwendig ist (Schomburg et al., 2003). Die Ergebnisse decken sich mit den unabhängigen Untersuchungen von Dr. Burk aus Nashville (Hill et al., 2003). Die Responsivität des neurologischen Phänotyps von *Sepp*<sup>-/-</sup> Mäusen gegenüber anorganischer Selen-Supplementation legte nahe, dass das Gehirn zwar normalerweise von SePP abhängig ist, jedoch auch Selenit aufnehmen und in den Selenstoffwechsel einschleusen kann (Schweizer et al., 2004 und unpublizierte Daten), möglicherweise über Sulfattransporter, welche Selenit als Substrat akzeptieren könnten. Im Gegensatz dazu ist Selenomethionin kein Substrat für den Gehirn-Selen-Stoffwechsel in *Sepp*<sup>-/-</sup> Mäusen (Hill et al., 2004). Man könnte daher argumentieren, dass zur Metabolisierung des Selenomethionins der Transsulfurierungsweg notwendig ist, von dem man gemeinhin annimmt, dass er zwar in der Leber, aber nicht im Gehirn vorhanden ist. Gegen diese Sicht spricht aber zumindest ein Bericht, der den Transsulfurierungsweg im Gehirn nachgewiesen hat (Vitvitsky et al., 2006). Alternativ könnte das Selenomethionin im Experiment von Hill et al. quantitativ in den Methioninstoffwechsel eingeschleust worden sein. Schließlich ist es auch möglich, dass Selenomethionin nicht in der

Lage ist, als freie Aminosäure die Blut-Hirn-Schranke zu überqueren. *In vitro* sind Selenomethionin und Selenocystin Substrate der epithelialen Aminosäuretransporter  $b^{0,+}$ rBAT und  $B^0$  (Nickel et al., 2009).

Im nächsten Experiment fragten wir nach der Bedeutung der hepatischen SePP Biosynthese. Der Befund, dass die hepatische Inaktivierung der Selenoproteinbiosynthese die Plasma-SePP und –Selenspiegel genauso erniedrigt wie die Inaktivierung von *Sepp* legte nahe, dass die Leber der Hauptsyntheseort für SePP ist (Schweizer et al., 2005). Für sich genommen ist das kein überraschender Befund für ein Plasmaprotein. Bedeutung erlangt dieser Befund erst durch die Expression von SePP in weiteren Organen, die offensichtlich nicht zum Plasma-SePP beitragen.

Daraus ergab sich unsere Hypothese von SePP als lokaler Selenspeicher im Gehirn (Schomburg et al., 2004). Eine notwendige Voraussetzung dafür wäre aber die Expression von SePP im Gehirn, die wir im Folgenden auch beim Menschen zeigen konnten (Scharpf et al., 2007) und damit die Ergebnisse in Nagern und Rindern bestätigen (Saijoh et al., 1995; Steinert et al., 1998; Yang et al., 2000; Steinbrenner et al., 2006). Kürzlich haben Bellinger et al. unter Verwendung eines anderen Antikörpers ebenfalls SePP Immunreaktivität im menschlichen Gehirn gefunden (Bellinger et al., 2008). Die Frage nach der lokalen Expression von SePP erschien uns wichtig genug, um sie noch einmal mit einem neuen Modell anzugehen. Deshalb haben wir eine humane *SEPP* cDNA in Hepatozyten von *Sepp*<sup>-/-</sup> Mäusen exprimiert und damit alle Phänotypen von *Sepp*<sup>-/-</sup> Mäusen komplementieren können (Renko et al., 2008). Wurden diese Tiere jedoch mit selenarmer Nahrung gefüttert, dann entwickelten sie den bekannten Phänotyp von *Sepp*<sup>-/-</sup> Mäusen, während Wildtyp-Mäuse oder *Alb-Cre; Trsp*<sup>fl/fl</sup> Mäuse keinen Phänotyp zeigen. Der Unterschied zwischen diesen Mauslinien ist die lokale Expression von *Sepp* im Gehirn. Wir interpretieren diese Daten als gute Hinweise auf einen von Leber und Plasma relativ unabhängigen Selenstoffwechsel im Gehirn, in dessen Zentrum der lokale Speicher von Selen in Form von SePP steht. Folgt man dieser Argumentation, liegt auf der Hand, weshalb es nicht zielführend ist, periphere Selenmarker als Surrogatmarker für den Gehirn-Selen-Status zu verwenden.

Unsere Daten und die Ergebnisse aus dem Labor von Dr. Raymond Burk, Nashville, Tennessee, legen folgendes Modell für den Selentransport nahe: Selenoprotein P ist das Plasma-Selen-Transportprotein, welches mehr als die Hälfte des im Plasma vorhandenen Selens beinhaltet. Es wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert und bringt Selen zu Zielorganen wie Hoden, Niere und Gehirn. Die Zielorgane exprimieren endozytische Rezeptoren aus der Klasse der *Lipoprotein-receptor-Related Proteins* (LRP2 und LRP8). Da

die Leber selbst bei niedriger Aufnahme von Selen über die Nahrung eine vergleichsweise hohe Syntheserate für Selenoprotein P aufrechterhält, kann sie fast vollständig an Selen verarmen, um im Gegenzug die Versorgung von Zielorganen wie Gehirn und Hoden aufrecht zu erhalten. Die Expression von Selenoprotein P in Organen, die SePP nicht ins Plasma abgeben, könnte eine lokale Speicherfunktion zum Zweck haben.

Die Expression einer verkürzten Form von SePP (*Sepp<sup>ΔC</sup>*) in Mäusen verringert erwartungsgemäß die Effizienz des Selentransports (Hill et al., 2007). Kürzlich konnten Burk und Kollegen jedoch zeigen, dass der N-terminalen Domäne von SePP tatsächlich eine Funktion innewohnt, sind doch *Sepp<sup>ΔC</sup>* Mäuse gegenüber Trypanosomen besser geschützt als *Sepp<sup>-/-</sup>* Mäuse (Bosschaerts et al., 2008). Der N-terminalen Domäne von SePP wurde bereits eine schwache Lipidperoxidase-Aktivität zugesprochen (Saito et al., 1999). Formal wäre es aber durchaus möglich, dass das eine verbliebene Selenocystein in *SePP<sup>ΔC</sup>* eine residuale Selentransportfunktion aufrechterhält. Zur Klärung dieser Frage müsste man eine SePP Variante erzeugen und transgen exprimieren, die zwar Selenocystein enthält, jedoch trotzdem enzymatisch inaktiv ist.

Während die Studien von Burk und Kollegen (Burk et al., 2007; Valentine et al., 2008; Masiulis et al., 2009) nahe legen, dass SePP und ApoER2 ein einfaches Liganden-Rezeptor-Paar im Gehirn darstellen, weisen unsere Untersuchungen darauf hin, dass weitere Rezeptoren beteiligt sein sollten. Die Untersuchungen von Burk wurden bei suboptimalem Selengehalt (0,10 ppm) der Nahrung durchgeführt. Bei unserer Untersuchung von *ApoER2*-defizienten Mäusen bei adäquatem Selengehalt (0,15 ppm) trat kein Phänotyp bei den Mutanten auf, während bei *Sepp*-defizienten Tieren unter diesen Bedingungen der klassische neurologische Phänotyp mit Bewegungsstörungen und epileptischen Anfällen regelmäßig auftritt. Unter diesem Gesichtspunkt muss man berücksichtigen, dass die Expression von ApoER2 neuronal ist (Beffert et al., 2006). Soll also hepatisch sezerniertes SePP vom Neuron aufgenommen werden, so muss es die Blut-Hirn-Schranke überqueren. Wir müssen also annehmen, dass es einen nicht identifizierten endothelialen Rezeptor geben muss. Möglicherweise spielt Megalin eine Rolle als SePP-Rezeptor an der Blut-Hirn- und Blut-Liquor-Schranke. Daneben könnten Neuronen noch einen weiteren nicht identifizierten SePP Rezeptor exprimieren. Schließlich kommen Gliazellen, vor allem Astrozyten, in diesem Modell nicht vor, wobei sich offenkundig die Frage stellt, welche Rolle sie im Selenstoffwechsel des Neurons haben.

Auch außerhalb des Gehirns bleiben noch offene Fragen: Gibt es noch weitere SePP Zielorgane oder Zielzellen, z.B. Immunzellen? Wie nehmen Zellen Selen auf, die keine SePP Rezeptoren besitzen?

### **Selenoproteine im Gehirn**

Der neurologische bzw. neurodegenerative Phänotyp von Mäusen, in denen die Expression von Selenoproteinen in Neuronen global reduziert ist, legt nahe, dass Selen wichtig für die Aufrechterhaltung der Funktion und Integrität des Gehirns ist. Die neuronspezifische Inaktivierung der tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> ist ein entscheidendes Experiment, indem sie demonstriert, dass Selen in Neuronen seine Wirkung über den Einbau in Selenoproteine vermittelt. Dieser Befund schließt eine allgemeine metabolische Entgleisung mit sekundärer Schädigung des Gehirns vorerst als Ursache der Neurodegeneration in *Sepp*-defizienten Mäusen aus. Hier ist das Mausmodell mit dem hypomorphen *Trsp*<sup>tAAE</sup> Allel ebenfalls von besonderer Bedeutung, denn in diesem Modell ist nicht die Verteilung des Selens im Körper betroffen, sondern die Selenoproteinbiosynthese in der einzelnen Zelle.

Wenn wir hinnehmen, dass das gerne übersehene Spurenelement Selen irgendwelche essentiellen Funktionen im Gehirn hat, so stellt sich die Frage nach dem Mechanismus. In erster Linie möchte man das oder die essentiellen Selenoproteine für das Gehirn definieren. Die erste Frage ist daher, welche Selenoproteine im Gehirn exprimiert sind. Wir haben uns auf die Maus konzentriert und die Selenoproteinexpression erstmals systematisch untersucht. Dabei haben wir gefunden, dass praktisch alle Selenoprotein mRNAs im Gehirn der Maus vorkommen (Zhang et al., 2008). Die meisten Selenoproteine sind in Neuronen exprimiert, wobei die Rolle von Selenoproteinen in Gliazellen fast völlig unbearbeitet ist.

Folgende Selenoproteine sind vermutlich nicht für die beschriebenen Phänotypen verantwortlich, denn die entsprechenden *knockout* Mäuse zeigen keine neurologischen Defekte: *Gpx1*, *Gpx2*, *Txnrd2*, *Dio1*, *Dio2*, *Dio3*, *SePR*. Wir haben drei weitere Mutanten untersucht, aber keine neurologischen Defekte gefunden. Neurologische Phänotypen fanden wir bei Mutation von *Txnrd1* (nur glial), *Sepp*, *Gpx4*, sowie *Trsp*. Da unsere Daten darauf hindeuten, dass neben GPx4 noch mindestens ein weiteres Selenoprotein essentiell für Neurone ist, konzentriert sich die Suche auf die Selenoproteine 15, H, I, K, M, N, O, S, T und W. Selenoprotein H wirkt in kultivierten Zellen protektiv gegen oxidative Schädigung (Novoselov et al., 2007), dasselbe gilt für SePW (Chung et al., 2009). Selenoprotein S ist am Abbau falsch gefalteter Proteine beteiligt (Ye et al., 2004) und Selenoprotein T wurde mit Vesikelfreisetzung und Ca<sup>2+</sup> Signalen in Verbindung gebracht (Grumolato et al., 2008). Auch

wenn diese Prozesse alle sehr grundlegend erscheinen, sollte man nicht vergessen, dass manche Zelltypen vollständig auf alle Selenoproteine verzichten können, z.B. Hepatozyten (Schweizer et al., 2005). Es steht zu erwarten, dass die verbliebenen Selenoproteine bald in der Maus ausgeschaltet sein werden. Im Zentrum der nächsten Phase wird dann die Aufklärung der physiologischen Rollen dieser Selenoproteine im Gehirn stehen. Die Analyse der *Gpx4*-defizienten Mäuse hat hierzu den Startschuss gegeben. Wir kennen jetzt (zumindest in Fibroblasten) einen pro-apoptotischen Signalweg, der über spezifische, enzymatische (*12/15-Lox*) Lipidperoxidation die Translokation des AIF vermittelt. Dieser Signalweg kann durch GPx4 unterbrochen werden (Seiler et al., 2008). Diese Ergebnisse liefern jetzt retrospektiv eine mechanistische Erklärung für die protektive Wirkung von GPx4 Überexpression für Neurone und Zelllinien (Yant et al., 2003; Ran et al., 2004; Savaskan et al., 2007). Allerdings ist die Frage, wie genau *12/15-Lox* aktiviert wird, noch offen.

Die Effekte auf die Reifung von Interneuronen, bzw. die Expression von PV bedürfen noch weiterer Untersuchung. Leider tolerierten primäre neokortikale Neurone den verwendeten *12/15-Lox*-Inhibitor nicht, sodass wir nicht direkt testen können, ob die Expression von PV sensitiv auf endogene Lipidperoxide reagiert. Die Analyse von *12/15 Lox*<sup>-/-</sup> Mäusen bietet für die Zukunft einen Ansatzpunkt. Alternativ könnte die Reifung der Interneurone auch mittelbar über eine verminderte Ausschüttung von BDNF seitens der Pyramidenzellen vermittelt werden. Diese Hypothese sollte zukünftig ebenfalls verfolgt werden. Auch wenn der genaue Mechanismus noch nicht bekannt ist, kann man festhalten, dass eine reduzierte Expression von GPx4 im Gehirn die Reifung von kortikalen Interneuronen hemmt.

### **Selenoproteine und neuropsychiatrische Erkrankungen**

Die bisher bekannten pathologischen Auswirkungen des Fehlens von Selenoproteinen sind Astrogliose (Valentine et al., 2008; Seiler et al., 2008; Carlson et al., 2009), axonale Degeneration (Valentine et al., 2005), Verlust/Reduktion von PV+ Zellen (Seiler et al., 2008; Carlson et al., 2009) und Neurodegeneration (Ramaekers et al., 1994; Seiler et al., 2008). Die Patienten bzw. Mäuse leiden an Ataxie und epileptischen Anfällen.

Während die neurodegenerativen Zeichen relativ unspezifisch sind, zeigt der Verlust oder Reifungsdefekt der Interneurone eine Richtung für weitere Studien an. Einerseits könnte ein Funktionsverlust von inhibitorischen Interneuronen relativ zwanglos einen epileptischen Phänotyp erklären. Andererseits wird die besondere Empfindlichkeit von PV+ Neuronen gegenüber Drogen (NMDA-Rezeptor-Antagonisten wie z.B. Ketamin) über oxidative Schädigung vermittelt (Behrens et al., 2007). Bei Schizophreniepatienten wurde ein

spezifischer Verlust von PV Zellen im präfrontalen Kortex beschrieben (Lewis et al., 2005). Im Tiermodell wird dieser Effekt durch die Applikation des Glutathionsynthase-Inhibitors Buthioninsulfoximid (BSO) erreicht (Cabungcal et al., 2007). Wir haben gefunden, dass BSO auch *in vitro* die Reifung von PV+ Zellen unterdrückt (SiJie Zhang und U.S., *unpubliziert*). Interessanterweise ist die Glutathionkonzentration im Liquor von Schizophreniepatienten reduziert (Do et al., 2000) und ein großer Anteil der Patienten trägt Mutationen in der regulatorischen Untereinheit der Glutathionsynthase, *GCLM* (Tosic et al., 2006; Gysin et al., 2007). Wie könnte ein Glutathiondefizit spezifisch auf PV+ Zellen wirken? Aus Perspektive unserer Ergebnisse springt ins Auge, dass Glutathion neben Selen für die Aktivität der GPx4 notwendig ist. Könnte also GPx4 eine besondere Rolle für die Biologie der PV+ Zellen spielen, sodass der Verlust der GPx4 Aktivität entweder durch Glutathion- oder durch Selenmangel zu einem Funktionsverlust führt?

Auf Mutationen in *GPX4* kann man mit genetischen Methoden in Patientenkohorten testen, aber wie testet man auf die Expression von Selenoproteinen im Gehirn? Wir haben unseren Immunoassay für SePP auf Liquor umgestellt (Linda Avena, Merve Kilinc und U.S., *unpubliziert*). Wir sind jetzt in der Lage, anhand der Menge von SePP im Liquor bei Patienten auf die Expression von Selenoproteinen im Gehirn zu schließen. Mit diesem Test können wir jetzt auch beim Menschen Störungen des Selentransports zum Gehirn aufdecken.

Während zu Beginn des Projektes Zweifel bestanden, ob Selen überhaupt eine Bedeutung für das Gehirn des Säugers hat, und ob wir mit unserem Mausmodell nicht einem Artefakt, wenigstens aber einem sekundären Phänotyp, aufsitzen, können wir heute durchaus gesichert belegen, dass Selenoproteine wichtig für das Gehirn sind. Von dieser Basis aus können wir jetzt die Mechanismen verfolgen, an denen Selenoproteine beteiligt sind und überprüfen, ob Störungen der Selenbiologie im Gehirn beim Menschen mit neurodegenerativen oder neuropsychiatrischen Erkrankungen assoziiert sind.



## 4. ZUSAMMENFASSUNG

Selen (Se) ist ein essentielles Spurenelement für Säugetiere. Selenabhängige Proteine, Selenoproteine, enthalten Se als Teil der 21sten proteinogenen Aminosäure, Selenocystein. Selenoenzyme sind an vielfältigen Reaktionen beteiligt, von der Reduktion von Peroxiden bis zur Dejodierung von Schilddrüsenhormonen. Die Funktionen etwa der Hälfte der Selenoproteine sind noch nicht aufgeklärt.

Ausgehend von der Beobachtung, dass Mäuse mit genetischer Inaktivierung von Selenoprotein P (SePP) erniedrigte Selenspiegel und Selenoenzymaktivitäten im Gehirn aufweisen, die mit einem neurologischen Phänotyp korrelieren, haben wir uns zum Ziel gesetzt, die Rolle des Spurenelements Se im Gehirn von Säugern zu verstehen.

Zum einen sollte der Mechanismus des Se-Transports in das Gehirn untersucht, zum anderen sollte die Rolle von Selenoproteinen für die Integrität und Funktion des Gehirns definiert werden.

Durch die stringente Anwendung der transgenen Maustechnologie konnte ein Modell des SePP-abhängigen Se-Transports ins Gehirn erarbeitet und die Beteiligung der endozytischen Rezeptoren aus der LRP-Genfamilie an der gewebespezifischen SePP-Aufnahme herausgearbeitet werden.

Die Expression aller Selenoproteine im Gehirn der Maus wurde systematisch beschrieben. Durch Neuron-spezifische Ausschaltung der tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> konnte gezeigt werden, dass Selenoproteine in Neuronen essentiell sind. Die gezielte Ausschaltung einzelner Selenoproteine ergab, dass Glutathionperoxidase 4 (GPx4) in Neuronen von besonderer Bedeutung ist, während die Thioredoxin Reduktasen 1 und 2 anscheinend für Neurone verzichtbar sind. Schließlich konnte gezeigt werden, dass allen Selenoprotein-, also GPx4-, defizienten Mausmodellen das Fehlen oder der Verlust von Parvalbumin-positiven (PV+) Interneuronen gemeinsam ist. Auch beim Wildtyp ist die Entwicklung von PV+ Zellen *in vitro* von Se und Vitamin E abhängig. Unsere Daten deuten darauf hin, dass es noch weitere in Neuronen essentielle Selenoproteine gibt.

Die Ergebnisse zeigen, dass Selenoproteine für das Säugergehirn essentiell sind. Besonders GPx4 ist für das neuronale Überleben und für die Reifung von PV+ Interneuronen notwendig. In Analogie zu den Mausmodellen besteht die Möglichkeit, dass neurodegenerative Erkrankungen beim Menschen durch Se moduliert werden könnten.

## Summary

Selenium (Se) is an essential trace element for mammals. Selenium-dependent proteins, selenoproteins, contain Se in the form of the 21<sup>st</sup> proteinogenic amino acid, selenocysteine. Selenoenzymes are involved in many different types of reactions, ranging from reduction of peroxides to deiodination of thyroid hormones. The functions of about half of all selenoproteins are still unknown.

Mice lacking the selenoprotein P (SePP) gene display reduced levels of tissue Se and activities of selenoenzymes, which correlate with a neurological phenotype. Starting from this observation, we wanted to understand the physiological role of Se in the mammalian brain.

On one hand, we investigated the mechanism how Se is transported into the brain. On the other hand, we started to define the roles of selenoproteins for integrity and function of the brain.

Aided by stringent application of transgenic mouse technologies, we were able to develop a model explaining how SePP functions as a Se carrier which is taken up in a tissue-specific manner by endocytic receptors of the LRP gene family.

We systematically described the expression of all selenoproteins in the mouse brain. Neuron-specific inactivation of tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> revealed that selenoproteins are essential for neurons. Targeted disruption of individual selenoprotein genes showed that glutathion peroxidase 4 (GPx4) is essential for neurons, while thioredoxin reductases 1 and 2 are apparently dispensable. Finally, we showed that all mouse models lacking selenoprotein – i.e. GPx4 – expression suffer a lack or loss of parvalbumin (PV)-expressing interneurons. We further demonstrated that development of PV+ cells *in vitro* depends on Se and vitamin E. Our data suggest that more selenoproteins are essential for neurons.

These results demonstrate that selenoproteins are indispensable for neurons. In particular, GPx4 is required for neuronal survival and maturation of PV+ interneurons. By analogy, we expect that neurodegenerative disease in humans may be modulated by Se status.

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

Allamand V, Richard P, Lescure A, Ledeuil C, Desjardin D, Petit N, Gartioux C, Ferreiro A, Krol A, Pellegrini N, Urtizbera JA, Guicheney P (2006) A single homozygous point mutation in a 3'untranslated region motif of selenoprotein N mRNA causes SEPNI-related myopathy. *EMBO Rep* 7: 450-454.

Andersen JK (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 10 Suppl: S18-S25.

Andreesen JR, Ljungdahl LG (1973) Formate dehydrogenase of *Clostridium thermoaceticum*: incorporation of selenium-75, and the effects of selenite, molybdate, and tungstate on the enzyme. *J Bacteriol* 116: 867-873.

Arteel GE, Mostert V, Oubrahim H, Briviba K, Abel J, Sies H (1998) Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration. *Biol Chem* 379: 1201-1205.

Arthur JR, Nicol F, Beckett GJ (1990) Hepatic iodothyronine 5'-deiodinase. The role of selenium. *Biochem J* 272: 537-540.

Baron C, Heider J, Böck A (1993) Interaction of translation factor SELB with the formate dehydrogenase H selenopolypeptide mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 4181-4185.

Beffert U, Nematollah FF, Masiulis I, Hammer RE, Yoon SO, Giehl KM, Herz J (2006) ApoE receptor 2 controls neuronal survival in the adult brain. *Curr Biol* 16: 2446-2452.

Behne D, Hilmert H, Scheid S, Gessner H, Elger W (1988) Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins. *Biochim Biophys Acta* 966: 12-21.

Behne D, Kyriakopoulos A, Meinhold H, Köhrle J (1990) Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 173: 1143-1149.

Behrens MM, Ali SS, Dao DN, Lucero J, Shekhtman G, Quick KL, Dugan LL (2007) Ketamine-induced loss of phenotype of fast-spiking interneurons is mediated by NADPH-oxidase. *Science* 318: 1645-1647.

Bellinger FP, He QP, Bellinger MT, Lin Y, Raman AV, White LR, Berry MJ (2008) Association of selenoprotein p with Alzheimer's pathology in human cortex. *J Alzheimers Dis* 15: 465-472.

Bergqvist AG, Chee CM, Lutchka L, Rychik J, Stallings VA (2003) Selenium deficiency associated with cardiomyopathy: a complication of the ketogenic diet. *Epilepsia* 44: 618-620.

Bermano G, Nicol F, Dyer JA, Sunde RA, Beckett GJ, Arthur JR, Hesketh JE (1995) Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats. *Biochem J* 311 ( Pt 2): 425-430.

Bermano G, Pagmantidis V, Holloway N, Kadri S, Mowat NA, Shiel RS, Arthur JR, Mathers JC, Daly AK, Broom J, Hesketh JE (2007) Evidence that a polymorphism within the 3'UTR of glutathione peroxidase 4 is functional and is associated with susceptibility to colorectal cancer. *Genes Nutr* 2: 225-232.

Berry MJ, Banu L, Chen YY, Mandel SJ, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR (1991a) Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature* 353: 273-276.

Berry MJ, Banu L, Larsen PR (1991b) Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature* 349: 438-440.

Berry MJ, Maia AL, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR (1992) Substitution of cysteine for selenocysteine in type I iodothyronine deiodinase reduces the catalytic efficiency of the protein but enhances its translation. *Endocrinology* 131: 1848-1852.

Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR (2002) Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 23: 38-89.

Blackinton J, Kumaran R, van der Brug MP, Ahmad R, Olson L, Galter D, Lees A, Bandopadhyay R, Cookson MR (2009) Post-transcriptional regulation of mRNA associated with DJ-1 in sporadic Parkinson disease. *Neurosci Lett* 452: 8-11.

Blight SK, Larue RC, Mahapatra A, Longstaff DG, Chang E, Zhao G, Kang PT, Green-Church KB, Chan MK, Krzycki JA (2004) Direct charging of tRNA(CUA) with pyrrolysine in vitro and in vivo. *Nature* 431: 333-335.

Böck A, Forchhammer K, Heider J, Baron C (1991) Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. *Trends Biochem Sci* 16: 463-467.

Bosschaerts T, Guilliams M, Noel W, Herin M, Burk RF, Hill KE, Brys L, Raes G, Ghassabeh GH, De Baetselier P, Beschin A (2008) Alternatively activated myeloid cells limit pathogenicity associated with African trypanosomiasis through the IL-10 inducible gene selenoprotein P. *J Immunol* 180: 6168-6175.

Brigelius-Flohé R, Kipp A (2009) Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta*.

Brown MR, Cohen HJ, Lyons JM, Curtis TW, Thunberg B, Cochran WJ, Klish WJ (1986) Proximal muscle weakness and selenium deficiency associated with long term parenteral nutrition. *Am J Clin Nutr* 43: 549-554.

Budiman ME, Bubenik JL, Miniard AC, Middleton LM, Gerber CA, Cash A, Driscoll DM (2009) Eukaryotic Initiation Factor 4a3 Is a Selenium-Regulated RNA-Binding Protein that Selectively Inhibits Selenocysteine Incorporation. *Mol Cell* 35: 479-489.

Burk RF, Hill KE (2005) Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annu Rev Nutr* 25: 215-235.

Burk RF, Hill KE, Olson GE, Weeber EJ, Motley AK, Winfrey VP, Austin LM (2007) Deletion of apolipoprotein E receptor-2 in mice lowers brain selenium and causes severe neurological dysfunction and death when a low-selenium diet is fed. *J Neurosci* 27: 6207-6211.

Cabungcal JH, Preissmann D, Delseth C, Cuenod M, Do KQ, Schenk F (2007) Transitory glutathione deficit during brain development induces cognitive impairment in juvenile and adult rats: relevance to schizophrenia. *Neurobiol Dis* 26: 634-645.

Carlson BA, Moustafa ME, Sengupta A, Schweizer U, Shrimali R, Rao M, Zhong N, Wang S, Feigenbaum L, Lee BJ, Gladyshev VN, Hatfield DL (2007) Selective restoration of the selenoprotein population in a mouse hepatocyte selenoproteinless background with different mutant selenocysteine tRNAs lacking Um34. *J Biol Chem* 282: 32591-32602.

Carlson BA, Schweizer U, Perella C, Shrimali RK, Feigenbaum L, Shen L, Speransky S, Floss T, Jeong SJ, Watts J, Hoffmann V, Combs GF, Gladyshev VN, Hatfield DL (2009) The selenocysteine

tRNA STAF-binding region is essential for adequate selenocysteine tRNA status, selenoprotein expression and early age survival of mice. *Biochem J* 418: 61-71.

Carlson BA, Xu XM, Gladyshev VN, Hatfield DL (2005) Selective rescue of selenoprotein expression in mice lacking a highly specialized methyl group in selenocysteine tRNA. *J Biol Chem* 280: 5542-5548.

Carlson BA, Xu XM, Kryukov GV, Rao M, Berry MJ, Gladyshev VN, Hatfield DL (2004) Identification and characterization of phosphoseryl-tRNA[Ser]<sup>Sec</sup> kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 12848-12853.

Chambers I, Frampton J, Goldfarb P, Affara N, McBain W, Harrison PR (1986) The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *EMBO J* 5: 1221-1227.

Chen J, Berry MJ (2003) Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J Neurochem* 86: 1-12.

Chittum HS, Hill KE, Carlson BA, Lee BJ, Burk RF, Hatfield DL (1997) Replenishment of selenium deficient rats with selenium results in redistribution of the selenocysteine tRNA population in a tissue specific manner. *Biochim Biophys Acta* 1359: 25-34.

Chung YW, Jeong D, Noh OJ, Park YH, Kang SI, Lee MG, Lee TH, Yim MB, Kim IY (2009) Antioxidative role of selenoprotein W in oxidant-induced mouse embryonic neuronal cell death. *Mol Cells* 27: 609-613.

Ciorba MA, Heinemann SH, Weissbach H, Brot N, Hoshi T (1997) Modulation of potassium channel function by methionine oxidation and reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 9932-9937.

Clark LC, Combs GF, Jr., Turnbull BW, Slate EH, Chalker DK, Chow J, Davis LS, Glover RA, Graham GF, Gross EG, Krongrad A, Leshner JL, Jr., Park HK, Sanders BB, Jr., Smith CL, Taylor JR (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: 1957-1963.

Collipp PJ, Chen SY (1981) Cardiomyopathy and selenium deficiency in a two-year-old girl. *N Engl J Med* 304: 1304-1305.

Conrad M, Jakupoglu C, Moreno SG, Lippl S, Banjac A, Schneider M, Beck H, Hatzopoulos AK, Just U, Sinowatz F, Schmahl W, Chien KR, Wurst W, Bornkamm GW, Brielmeier M (2004) Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. *Mol Cell Biol* 24: 9414-9423.

Conrad M, Moreno SG, Sinowatz F, Ursini F, Kolle S, Roveri A, Brielmeier M, Wurst W, Maiorino M, Bornkamm GW (2005) The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Mol Cell Biol* 25: 7637-7644.

Cooper ML, Adami HO, Gronberg H, Wiklund F, Green FR, Rayman MP (2008) Interaction between single nucleotide polymorphisms in selenoprotein P and mitochondrial superoxide dismutase determines prostate cancer risk. *Cancer Res* 68: 10171-10177.

Copeland PR, Driscoll DM (1999) Purification, redox sensitivity, and RNA binding properties of SECIS-binding protein 2, a protein involved in selenoprotein biosynthesis. *J Biol Chem* 274: 25447-25454.

- Copeland PR, Fletcher JE, Carlson BA, Hatfield DL, Driscoll DM (2000) A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. *EMBO J* 19: 306-314.
- Coyle JT, Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262: 689-695.
- Crick FH (1963) On the genetic code. *Science* 139: 461-464.
- Curran JE, Jowett JB, Elliott KS, Gao Y, Gluschenko K, Wang J, Abel Azim DM, Cai G, Mahaney MC, Comuzzie AG, Dyer TD, Walder KR, Zimmet P, MacCluer JW, Collier GR, Kissebah AH, Blangero J (2005) Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response. *Nat Genet* 37: 1234-1241.
- Deniziak M, Thisse C, Rederstorff M, Hindelang C, Thisse B, Lescure A (2007) Loss of selenoprotein N function causes disruption of muscle architecture in the zebrafish embryo. *Exp Cell Res* 313: 156-167.
- Diwadkar-Navsariwala V, Prins GS, Swanson SM, Birch LA, Ray VH, Hedayat S, Lantvit DL, Diamond AM (2006) Selenoprotein deficiency accelerates prostate carcinogenesis in a transgenic model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 8179-8184.
- Do KQ, Trabesinger AH, Kirsten-Kruger M, Lauer CJ, Dydak U, Hell D, Holsboer F, Boesiger P, Cuenod M (2000) Schizophrenia: glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo. *Eur J Neurosci* 12: 3721-3728.
- Dumitrescu AM, Liao XH, Abdullah MS, Lado-Abeal J, Majed FA, Moeller LC, Boran G, Schomburg L, Weiss RE, Refetoff S (2005) Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism. *Nat Genet* 37: 1247-1252.
- Erickson JR, Joiner ML, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, Zimmerman MC, Zimmerman K, Ham AJ, Weiss RM, Spitz DR, Shea MA, Colbran RJ, Mohler PJ, Anderson ME (2008) A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* 133: 462-474.
- Esworthy RS, Aranda R, Martin MG, Doroshov JH, Binder SW, Chu FF (2001) Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G848-G855.
- Fagegaltier D, Hubert N, Yamada K, Mizutani T, Carbon P, Krol A (2000) Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation. *EMBO J* 19: 4796-4805.
- Fleming CR, Lie JT, McCall JT, O'Brien JF, Baillie EE, Thistle JL (1982) Selenium deficiency and fatal cardiomyopathy in a patient on home parenteral nutrition. *Gastroenterology* 83: 689-693.
- Flohe L (2009) The labour pains of biochemical selenology: The history of selenoprotein biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*.
- Flohé L (2009) The labour pains of biochemical selenology: The history of selenoprotein biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*.
- Flohé L, Günzler WA, Schock HH (1973) Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett* 32: 132-134.
- Fomenko DE, Novoselov SV, Natarajan SK, Lee BC, Koc A, Carlson BA, Lee TH, Kim HY, Hatfield DL, Gladyshev VN (2008) Methionine-R-sulfoxide reductase 1 (MsrB1) knockout Mice: Roles of MsrB1 in redox regulation and identification of a novel selenoprotein form. *J Biol Chem*.

- Fomenko DE, Xing W, Adair BM, Thomas DJ, Gladyshev VN (2007) High-throughput identification of catalytic redox-active cysteine residues. *Science* 315: 387-389.
- Forchhammer K, Böck A (1991) Selenocysteine synthase from *Escherichia coli*. Analysis of the reaction sequence. *J Biol Chem* 266: 6324-6328.
- Forchhammer K, Leinfelder W, Böck A (1989) Identification of a novel translation factor necessary for the incorporation of selenocysteine into protein. *Nature* 342: 453-456.
- Forstrom JW, Zakowski JJ, Tappel AL (1978) Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry* 17: 2639-2644.
- Ganichkin OM, Xu XM, Carlson BA, Mix H, Hatfield DL, Gladyshev VN, Wahl MC (2008) Structure and catalytic mechanism of eukaryotic selenocysteine synthase. *J Biol Chem* 283: 5849-5865.
- Gladyshev VN, Jeang KT, Stadtman TC (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: 6146-6151.
- Gross M, Oertel M, Köhrle J (1995) Differential selenium-dependent expression of type I 5'-deiodinase and glutathione peroxidase in the porcine epithelial kidney cell line LLC-PK1. *Biochem J* 306 ( Pt 3): 851-856.
- Grumolato L, Ghzili H, Montero-Hadjadje M, Gasman S, Lesage J, Tanguy Y, Galas L, Ait-Ali D, Leprince J, Guerineau NC, Elkahloun AG, Fournier A, Vieau D, Vaudry H, Anouar Y (2008) Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and neuroendocrine secretion. *FASEB J*.
- Guimaraes MJ, Peterson D, Vicari A, Cocks BG, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Ferrick DA, Kastelein RA, Bazan JF, Zlotnik A (1996) Identification of a novel selD homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism? *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 15086-15091.
- Gysin R, Kraftsik R, Sandell J, Bovet P, Chappuis C, Conus P, Deppen P, Preisig M, Ruiz V, Steullet P, Tosic M, Werge T, Cuenod M, Do KQ (2007) Impaired glutathione synthesis in schizophrenia: convergent genetic and functional evidence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 16621-16626.
- Hao B, Gong W, Ferguson TK, James CM, Krzycki JA, Chan MK (2002) A new UAG-encoded residue in the structure of a methanogen methyltransferase. *Science* 296: 1462-1466.
- Hatfield D, Portugal FH (1970) Seryl-tRNA in mammalian tissues: chromatographic differences in brain and liver and a specific response to the codon, UGA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 67: 1200-1206.
- Hatfield DL, Carlson BA, Xu XM, Mix H, Gladyshev VN (2006) Selenocysteine incorporation machinery and the role of selenoproteins in development and health. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 81: 97-142.
- Hatfield DL, Gladyshev VN (2009) The Outcome of Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT) reveals the need for better understanding of selenium biology. *Mol Interv* 9: 18-21.
- Hernandez A, Martinez ME, Fiering S, Galton VA, St Germain D (2006) Type 3 deiodinase is critical for the maturation and function of the thyroid axis. *J Clin Invest* 116: 476-484.
- Hill KE, Lloyd RS, Yang JG, Read R, Burk RF (1991) The cDNA for rat selenoprotein P contains 10 TGA codons in the open reading frame. *J Biol Chem* 266: 10050-10053.

- Hill KE, Zhou J, Austin LM, Motley AK, Ham AJ, Olson GE, Atkins JF, Gesteland RF, Burk RF (2007) The selenium-rich C-terminal domain of mouse selenoprotein P is necessary for the supply of selenium to brain and testis but not for the maintenance of whole body selenium. *J Biol Chem* 282: 10972-10980.
- Hill KE, Zhou J, McMahan WJ, Motley AK, Burk RF (2004) Neurological dysfunction occurs in mice with targeted deletion of the selenoprotein p gene. *J Nutr* 134: 157-161.
- Hirosawa-Takamori M, Ossipov D, Novoselov SV, Turanov AA, Zhang Y, Gladyshev VN, Krol A, Vorbrüggen G, Jäckle H (2009) A novel stem loop control element-dependent UGA read-through system without translational selenocysteine incorporation in *Drosophila*. *FASEB J* 23: 107-113.
- Ho YS, Magnenat JL, Bronson RT, Cao J, Gargano M, Sugawara M, Funk CD (1997) Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J Biol Chem* 272: 16644-16651.
- Hollenbach B, Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A, Köhrle J, Schomburg L (2008) New assay for the measurement of selenoprotein P as a sepsis biomarker from serum. *J Trace Elem Med Biol* 22: 24-32.
- Howard MT, Moyle MW, Aggarwal G, Carlson BA, Anderson CB (2007) A recoding element that stimulates decoding of UGA codons by Sec tRNA[Ser]Sec. *RNA* 13: 912-920.
- Hu Y, Benya RV, Carroll RE, Diamond AM (2005) Allelic loss of the gene for the GPX1 selenium-containing protein is a common event in cancer. *J Nutr* 135: 3021S-3024S.
- Hu YJ, Diamond AM (2003) Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: loss of heterozygosity and allelic differences in the response to selenium. *Cancer Res* 63: 3347-3351.
- Hu YJ, Korotkov KV, Mehta R, Hatfield DL, Rotimi CN, Luke A, Prewitt TE, Cooper RS, Stock W, Vokes EE, Dolan ME, Gladyshev VN, Diamond AM (2001) Distribution and functional consequences of nucleotide polymorphisms in the 3'-untranslated region of the human Sep15 gene. *Cancer Res* 61: 2307-2310.
- Irons R, Carlson BA, Hatfield DL, Davis CD (2006) Both selenoproteins and low molecular weight selenocompounds reduce colon cancer risk in mice with genetically impaired selenoprotein expression. *J Nutr* 136: 1311-1317.
- Jablonska E, Gromadzinska J, Sobala W, Reszka E, Wasowicz W (2008) Lung cancer risk associated with selenium status is modified in smoking individuals by Sep15 polymorphism. *Eur J Nutr* 47: 47-54.
- Jakupoglu C, Przemeczek GK, Schneider M, Moreno SG, Mayr N, Hatzopoulos AK, de Angelis MH, Wurst W, Bornkamm GW, Brielmeier M, Conrad M (2005) Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development. *Mol Cell Biol* 25: 1980-1988.
- Jurynek MJ, Xia R, Mackrill JJ, Gunther D, Crawford T, Flanigan KM, Abramson JJ, Howard MT, Grunwald DJ (2008) Selenoprotein N is required for ryanodine receptor calcium release channel activity in human and zebrafish muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 12485-12490.
- Kim HY, Gladyshev VN (2005) Different catalytic mechanisms in mammalian selenocysteine- and cysteine-containing methionine-R-sulfoxide reductases. *PLoS Biol* 3: e375.
- Köhrle J (2002) Iodothyronine deiodinases. *Methods Enzymol* 347: 125-167.
- Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, Gladyshev VN (2003) Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 300: 1439-1443.



- Kryukov GV, Kryukov VM, Gladyshev VN (1999) New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements. *J Biol Chem* 274: 33888-33897.
- Kumaraswamy E, Carlson BA, Morgan F, Miyoshi K, Robinson GW, Su D, Wang S, Southon E, Tessarollo L, Lee BJ, Gladyshev VN, Hennighausen L, Hatfield DL (2003) Selective removal of the selenocysteine tRNA [Ser]<sup>Sec</sup> gene (*Trsp*) in mouse mammary epithelium. *Mol Cell Biol* 23: 1477-1488.
- Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN (2007) The Sep15 protein family: roles in disulfide bond formation and quality control in the endoplasmic reticulum. *IUBMB Life* 59: 1-5.
- Ladenstein R, Epp O, Bartels K, Jones A, Huber R, Wendel A (1979) Structure analysis and molecular model of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol* 134: 199-218.
- Lee BJ, Worland PJ, Davis JN, Stadtman TC, Hatfield DL (1989) Identification of a selenocysteyl-tRNA(Ser) in mammalian cells that recognizes the nonsense codon, UGA. *J Biol Chem* 264: 9724-9727.
- Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, Chen L, Chen L, Chen TM, Chin MC, Chong J, Crook BE, Czaplinska A, Dang CN, Datta S, Dee NR, Desaki AL, Desta T, Diep E, Dolbeare TA, Donelan MJ, Dong HW, Dougherty JG, Duncan BJ, Ebbert AJ, Eichele G, Estin LK, Faber C, Facer BA, Fields R, Fischer SR, Fliss TP, Frensley C, Gates SN, Glattfelder KJ, Halverson KR, Hart MR, Hohmann JG, Howell MP, Jeung DP, Johnson RA, Karr PT, Kawal R, Kidney JM, Knapik RH, Kuan CL, Lake JH, Laramie AR, Larsen KD, Lau C, Lemon TA, Liang AJ, Liu Y, Luong LT, Michaels J, Morgan JJ, Morgan RJ, Mortrud MT, Mosqueda NF, Ng LL, Ng R, Orta GJ, Overly CC, Pak TH, Parry SE, Pathak SD, Pearson OC, Puchalski RB, Riley ZL, Rockett HR, Rowland SA, Royall JJ, Ruiz MJ, Sarno NR, Schaffnit K, Shapovalova NV, Sivisay T, Slaughterbeck CR, Smith SC, Smith KA, Smith BI, Sodt AJ, Stewart NN, Stumpf KR, Sunkin SM, Sutram M, Tam A, Teemer CD, Thaller C, Thompson CL, Varnam LR, Visel A, Whitlock RM, Wohnoutka PE, Wolkey CK, Wong VY, Wood M, Yaylaoglu MB, Young RC, Youngstrom BL, Yuan XF, Zhang B, Zwingman TA, Jones AR (2007) Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445: 168-176.
- Leinfelder W, Forchhammer K, Veprek B, Zehelein E, Böck A (1990) In vitro synthesis of selenocysteinyl-tRNA(UCA) from seryl-tRNA(UCA): involvement and characterization of the *selD* gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 543-547.
- Leinfelder W, Zehelein E, Mandrand-Berthelot MA, Böck A (1988) Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine. *Nature* 331: 723-725.
- Lescure A, Gautheret D, Carbon P, Krol A (1999) Novel selenoproteins identified in silico and in vivo by using a conserved RNA structural motif. *J Biol Chem* 274: 38147-38154.
- Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW (2005) Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 6: 312-324.
- Lobanov AV, Hatfield DL, Gladyshev VN (2009) Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes. *Biochim Biophys Acta*.
- Masiulis I, Quill TA, Burk RF, Herz J (2009) Differential functions of the Apoer2 intracellular domain in selenium uptake and cell signaling. *Biol Chem* 390: 67-73.
- Meplan C, Crosley LK, Nicol F, Beckett GJ, Howie AF, Hill KE, Horgan G, Mathers JC, Arthur JR, Hesketh JE (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: doi: 10.1096/fj.07-8166com.

- Meplan C, Crosley LK, Nicol F, Horgan GW, Mathers JC, Arthur JR, Hesketh JE (2008) Functional effects of a common single-nucleotide polymorphism (GPX4c718t) in the glutathione peroxidase 4 gene: interaction with sex. *Am J Clin Nutr* 87: 1019-1027.
- Moghadaszadeh B, Petit N, Jaillard C, Brockington M, Roy SQ, Merlini L, Romero N, Estournet B, Desguerre I, Chaigne D, Muntoni F, Topaloglu H, Guicheney P (2001) Mutations in SEPN1 cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome. *Nat Genet* 29: 17-18.
- Mörk H, Al Taie OH, Bähr K, Zierer A, Beck C, Scheurlen M, Jakob F, Köhrle J (2000) Inverse mRNA expression of the selenocysteine-containing proteins GI-GPx and SeP in colorectal adenomas compared with adjacent normal mucosa. *Nutr Cancer* 37: 108-116.
- Mörk H, Lex B, Scheurlen M, Dreher I, Schütze N, Köhrle J, Jakob F (1998) Expression pattern of gastrointestinal selenoproteins--targets for selenium supplementation. *Nutr Cancer* 32: 64-70.
- Moskovitz J, Bar-Noy S, Williams WM, Requena J, Berlett BS, Stadtman ER (2001) Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12920-12925.
- Moskovitz J, Stadtman ER (2003) Selenium-deficient diet enhances protein oxidation and affects methionine sulfoxide reductase (MsrB) protein level in certain mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7486-7490.
- Moustafa ME, Carlson BA, El Saadani MA, Kryukov GV, Sun QA, Harney JW, Hill KE, Combs GF, Feigenbaum L, Mansur DB, Burk RF, Berry MJ, Diamond AM, Lee BJ, Gladyshev VN, Hatfield DL (2001) Selective inhibition of selenocysteine tRNA maturation and selenoprotein synthesis in transgenic mice expressing isopentenyladenosine-deficient selenocysteine tRNA. *Mol Cell Biol* 21: 3840-3852.
- Muth OH, Oldfield JE, REMMERT LF, SCHUBERT JR (1958) Effects of selenium and vitamin E on white muscle disease. *Science* 128: 1090.
- Myslinski E, Gerard MA, Krol A, Carbon P (2006) A genome scale location analysis of human Staf/ZNF143-binding sites suggests a widespread role for human Staf/ZNF143 in mammalian promoters. *J Biol Chem* 281: 39953-39962.
- Nickel A, Kottra G, Schmidt G, Danier J, Hofmann T, Daniel H (2009) Characteristics of transport of selenoamino acids by epithelial amino acid transporters. *Chem Biol Interact* 177: 234-241.
- Nirenberg M, Caskey T, Marshall R, Brimacombe R, Kellogg D, Doctor B, Hatfield D, Levin J, Rottman F, Pestka S, Wilcox M, Anderson F (1966) The RNA code and protein synthesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 31: 11-24.
- Novoselov SV, Kryukov GV, Xu XM, Carlson BA, Hatfield DL, Gladyshev VN (2007) Selenoprotein H is a nucleolar thioredoxin-like protein with a unique expression pattern. *J Biol Chem*.
- Olson GE, Winfrey VP, Hill KE, Burk RF (2008) Megalin mediates selenoprotein P uptake by kidney proximal tubule epithelial cells. *J Biol Chem*.
- Olson GE, Winfrey VP, Nagdas SK, Hill KE, Burk RF (2007) Apolipoprotein E receptor-2 (ApoER2) mediates selenium uptake from selenoprotein P by the mouse testis. *J Biol Chem* 282: 12290-12297.
- Pedersen ND, Whanger PD, Weswig PH, Muth OH (1972) Selenium binding proteins in tissues of normal and selenium responsive myopathic lambs. *Bioinorg Chem* 2: 33-45.

- Peters U, Chatterjee N, Hayes RB, Schoen RE, Wang Y, Chanock SJ, Foster CB (2008) Variation in the selenoenzyme genes and risk of advanced distal colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17: 1144-1154.
- Piehl S, Heberer T, Balizs G, Scanlan TS, Smits R, Kokscho B, Köhrle J (2008) Thyronamines are isozyme specific substrates of deiodinases. *Endocrinology* 149: 3037-3045.
- Pinsent J (1954a) The need for selenite and molybdate in the formation of formic dehydrogenase by members of the coli-aerogenes group of bacteria. *Biochem J* 57: 10-16.
- Pinsent J (1954b) The need for selenite and molybdate in the formation of formic dehydrogenase by members of the coli-aerogenes group of bacteria. *Biochem J* 57: 10-16.
- Ramaekers VT, Calomme M, Vanden Berghe D, Makropoulos W (1994) Selenium deficiency triggering intractable seizures. *Neuropediatrics* 25: 217-223.
- Ran Q, Liang H, Gu M, Qi W, Walter CA, Roberts LJ, Herman B, Richardson A, Van Remmen H (2004) Transgenic mice overexpressing glutathione peroxidase 4 are protected against oxidative stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 279: 55137-55146.
- Rayman MP (2000) The importance of selenium to human health. *Lancet* 356: 233-241.
- Renko K, Werner M, Renner-Müller I, Cooper TG, Yeung CH, Hollenbach B, Scharpf M, Köhrle J, Schomburg L, Schweizer U (2008) Hepatic selenoprotein P (SePP) expression restores selenium transport and prevents infertility and motor-incoordination in Sepp-knockout mice. *Biochem J* 409: 741-749.
- Riese C, Michaelis M, Mentrup B, Götz F, Köhrle J, Schweizer U, Schomburg L (2006) Selenium-dependent pre- and posttranscriptional mechanisms are responsible for sexual dimorphic expression of selenoproteins in murine tissues. *Endocrinology* 147: 5883-5892.
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179: 588-590.
- Ruan H, Tang XD, Chen ML, Joiner ML, Sun G, Brot N, Weissbach H, Heinemann SH, Iverson L, Wu CF, Hoshi T, Chen ML, Joiner MA, Heinemann SH (2002) High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2748-2753.
- Saijoh K, Saito N, Lee MJ, Fujii M, Kobayashi T, Sumino K (1995) Molecular cloning of cDNA encoding a bovine selenoprotein P-like protein containing 12 selenocysteines and a (His-Pro) rich domain insertion, and its regional expression. *Brain Res Mol Brain Res* 30: 301-311.
- Saito Y, Hayashi T, Tanaka A, Watanabe Y, Suzuki M, Saito E, Takahashi K (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: 2866-2871.
- Savaskan NE, Borchert A, Brauer AU, Kuhn H (2007) Role for glutathione peroxidase-4 in brain development and neuronal apoptosis: specific induction of enzyme expression in reactive astrocytes following brain injury. *Free Radic Biol Med* 43: 191-201.
- Scharpf M, Schweizer U, Arzberger T, Roggendorf W, Schomburg L, Köhrle J (2007) Neuronal and ependymal expression of selenoprotein P in the human brain. *J Neural Transm* 114: 877-884.
- Scheerer P, Borchert A, Krauss N, Wessner H, Gerth C, Hohne W, Kühn H (2007) Structural basis for catalytic activity and enzyme polymerization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase-4 (GPx4). *Biochemistry* 46: 9041-9049.

- Schneider M, Forster H, Boersma A, Seiler A, Wehnes H, Sinowatz F, Neumuller C, Deutsch MJ, Walch A, Hrabec dA, Wurst W, Ursini F, Roveri A, Maleszewski M, Maiorino M, Conrad M (2009) Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *FASEB J*.
- Schneider MJ, Fiering SN, Pallud SE, Parlow AF, St Germain DL, Galton VA (2001) Targeted disruption of the type 2 selenodeiodinase gene (DIO2) results in a phenotype of pituitary resistance to T4. *Mol Endocrinol* 15: 2137-2148.
- Schneider MJ, Fiering SN, Thai B, Wu SY, St Germain E, Parlow AF, St Germain DL, Galton VA (2006) Targeted disruption of the type 1 selenodeiodinase gene (Dio1) results in marked changes in thyroid hormone economy in mice. *Endocrinology* 147: 580-589.
- Schomburg L, Dumitrescu AM, Liao XH, Bin-Abbas B, Hoeflich J, Kohrle J, Refetoff S (2009) Selenium supplementation fails to correct the selenoprotein synthesis defect in subjects with SBP2 gene mutations. *Thyroid* 19: 277-281.
- Schomburg L, Schweizer U (2009) Hierarchical regulation of selenoprotein expression and sex-specific effects of selenium. *Biochim Biophys Acta*.
- Schomburg L, Schweizer U, Holtmann B, Flohé L, Sendtner M, Köhrle J (2003) Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *Biochem J* 370: 397-402.
- Schomburg L, Schweizer U, Köhrle J (2004) Selenium and selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, enigmatic. *Cell Mol Life Sci* 61: 1988-1995.
- Schuster C, Myslinski E, Krol A, Carbon P (1995) Staf, a novel zinc finger protein that activates the RNA polymerase III promoter of the selenocysteine tRNA gene. *EMBO J* 14: 3777-3787.
- Schwarz K, Foltz CM (1957) Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *Nutrition* 15: 255-264.
- Schwarz K, Foltz CM (1958) Factor 3 activity of selenium compounds. *J Biol Chem* 233: 245-251.
- Schweizer U, Bräuer AU, Köhrle J, Nitsch R, Savaskan NE (2004) Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. *Brain Res Brain Res Rev* 45: 164-178.
- Schweizer U, Chiu J, Köhrle J (2008a) Peroxides and peroxide-degrading enzymes in the thyroid. *Antioxid Redox Signal* 10: 1577-1592.
- Schweizer U, Schomburg L (2005) New insights into the physiological actions of selenoproteins from genetically modified mice. *IUBMB Life* 57: 737-744.
- Schweizer U, Streckfuss F, Pelt P, Carlson BA, Hatfield DL, Köhrle J, Schomburg L (2005) Hepatically derived selenoprotein P is a key factor for kidney but not for brain selenium supply. *Biochem J* 386: 221-226.
- Schweizer U, Weitzel JM, Schomburg L (2008b) Think globally: act locally. New insights into the local regulation of thyroid hormone availability challenge long accepted dogmas. *Mol Cell Endocrinol* 289: 1-9.
- Seiler A, Schneider M, Förster H, Roth S, Wirth EK, Culmsee C, Plesnila N, Kremmer E, Radmark O, Wurst W, Bornkamm GW, Schweizer U, Conrad M (2008) Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell Metab* 8: 237-248.

- Shum AC, Murphy JC (1972) Effects of selenium compounds on formate metabolism and coincidence of selenium-75 incorporation and formic dehydrogenase activity in cell-free preparations of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 110: 447-449.
- Sies H (1986) Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Intl Ed* 25: 1058-1071.
- Soerensen J, Jakupoglu C, Beck H, Förster H, Schmidt J, Schmahl W, Schweizer U, Conrad M, Brielmeier M (2008) The role of thioredoxin reductases in brain development. *PLoS ONE* 3: e1813.
- Srinivasan G, James CM, Krzycki JA (2002) Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA. *Science* 296: 1459-1462.
- Stadtman TC (1974) Selenium biochemistry. *Science* 183: 915-922.
- Steinbrenner H, Alili L, Bilgic E, Sies H, Brenneisen P (2006) Involvement of selenoprotein P in protection of human astrocytes from oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 40: 1513-1523.
- Steinert P, Bachner D, Flohé L (1998) Analysis of the mouse selenoprotein P gene. *Biol Chem* 379: 683-691.
- Streckfuss F, Hamann I, Schomburg L, Michaelis M, Sapin R, Klein MO, Köhrle J, Schweizer U (2005) Hepatic deiodinase activity is dispensable for the maintenance of normal circulating thyroid hormone levels in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 337: 739-745.
- Tosic M, Ott J, Barral S, Bovet P, Deppen P, Gheorghita F, Matthey ML, Parnas J, Preisig M, Saraga M, Solida A, Timm S, Wang AG, Werge T, Cuenod M, Do KQ (2006) Schizophrenia and oxidative stress: glutamate cysteine ligase modifier as a susceptibility gene. *Am J Hum Genet* 79: 586-592.
- Turanov AA, Lobanov AV, Fomenko DE, Morrison HG, Sogin ML, Klobutcher LA, Hatfield DL, Gladyshev VN (2009) Genetic code supports targeted insertion of two amino acids by one codon. *Science* 323: 259-261.
- Ufer C, Borchert A, Kuhn H (2003) Functional characterization of cis- and trans-regulatory elements involved in expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Nucleic Acids Res* 31: 4293-4303.
- Ufer C, Wang CC, Fahling M, Schiebel H, Thiele BJ, Billett EE, Kuhn H, Borchert A (2008) Translational regulation of glutathione peroxidase 4 expression through guanine-rich sequence-binding factor 1 is essential for embryonic brain development. *Genes Dev* 22: 1838-1850.
- Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Flohé L (1999) Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* 285: 1393-1396.
- Valentine WM, Abel TW, Hill KE, Austin LM, Burk RF (2008) Neurodegeneration in mice resulting from loss of functional selenoprotein P or its receptor apolipoprotein E receptor 2. *J Neuropathol Exp Neurol* 67: 68-77.
- Valentine WM, Hill KE, Austin LM, Valentine HL, Goldowitz D, Burk RF (2005) Brainstem axonal degeneration in mice with deletion of selenoprotein p. *Toxicol Pathol* 33: 570-576.
- van Leyen K, Kim HY, Lee SR, Jin G, Arai K, Lo EH (2006) Baicalein and 12/15-lipoxygenase in the ischemic brain. *Stroke* 37: 3014-3018.
- Vendeland SC, Beilstein MA, Chen CL, Jensen ON, Barofsky E, Whanger PD (1993) Purification and properties of selenoprotein W from rat muscle. *J Biol Chem* 268: 17103-17107.

- Vendeland SC, Beilstein MA, Yeh JY, Ream W, Whanger PD (1995) Rat skeletal muscle selenoprotein W: cDNA clone and mRNA modulation by dietary selenium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8749-8753.
- Vitvitsky V, Thomas M, Ghorpade A, Gendelman HE, Banerjee R (2006) A functional transsulfuration pathway in the brain links to glutathione homeostasis. *J Biol Chem* 281: 35785-35793.
- Waring W, Werkman C (1944) Iron deficiency in bacterial metabolism. *Arch Biochem Biophys* 4: 75-87.
- Warner GJ, Berry MJ, Moustafa ME, Carlson BA, Hatfield DL, Faust JR (2000) Inhibition of selenoprotein synthesis by selenocysteine tRNA[Ser]<sup>Sec</sup> lacking isopentenyladenosine. *J Biol Chem* 275: 28110-28119.
- Weber GF, Maertens P, Meng XZ, Pippenger CE (1991) Glutathione peroxidase deficiency and childhood seizures. *Lancet* 337: 1443-1444.
- Xu XM, Carlson BA, Mix H, Zhang Y, Saira K, Glass RS, Berry MJ, Gladyshev VN, Hatfield DL (2007) Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes. *PLoS Biol* 5: e4.
- Yang X, Hill KE, Maguire MJ, Burk RF (2000) Synthesis and secretion of selenoprotein P by cultured rat astrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1474: 390-396.
- Yant LJ, Ran Q, Rao L, Van Remmen H, Shibata T, Belter JG, Motta L, Richardson A, Prolla TA (2003) The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic Biol Med* 34: 496-502.
- Ye Y, Shibata Y, Yun C, Ron D, Rapoport TA (2004) A membrane protein complex mediates retrotranslocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* 429: 841-847.
- Yoneda S, Suzuki KT (1997) Equimolar Hg-Se complex binds to selenoprotein P. *Biochem Biophys Res Commun* 231: 7-11.
- Zarbalis K, May SR, Shen Y, Ekker M, Rubenstein JL, Peterson AS (2004) A focused and efficient genetic screening strategy in the mouse: identification of mutations that disrupt cortical development. *PLoS Biol* 2: E219.
- Zhuo P, Diamond AM (2009) Molecular mechanisms by which selenoproteins affect cancer risk and progression. *Biochim Biophys Acta*.
- Zinoni F, Birkmann A, Leinfelder W, Böck A (1987) Cotranslational insertion of selenocysteine into formate dehydrogenase from *Escherichia coli* directed by a UGA codon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 3156-3160.
- Zinoni F, Birkmann A, Stadtman TC, Böck A (1986) Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine-containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogen-lyase-linked) from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 4650-4654.

## DANKSAGUNG

Die Abfassung einer Habilitationsschrift ist nicht das Ziel wissenschaftlicher Arbeit, sondern ein Begleitprodukt, eher eine Zwischenzeit, die man nimmt, die genommen wird, die jedoch Anlass gibt, auf den bisher zurückgelegten Weg zurück zublicken, während man doch sonst eher das ferne Ziel vor Augen hat. Der Weg war lang, mitunter anstrengend und wie bei jeder langen Tour waren die Aussichten schön, spannend, manchmal sogar atemberaubend. Und immer war es der Mühen wert.

Odysseus hat die Troier übrigens nicht alleine besiegt. Eiffel hat den Turm nicht alleine gebaut, und Hillary war auch nicht alleine auf dem Mount Everest. Graig Venter hat nicht selber das Humangenom sequenziert. Einer musste zwar den Plan haben, aber andere mussten navigieren, andere mussten den Proviant tragen, andere mussten die Leitern vorher fixieren... Deshalb möchte ich hier meinen Dank all denjenigen ausdrücken, die mit mir diesen Weg gegangen sind, manche nur einen Abschnitt, manche die ganze Zeit, manche haben navigiert und andere haben die Leitern fixiert.

Da es hier um die Wissenschaft geht, möchte ich an erster Stelle meinen akademischen Lehrern danken. Man merkt erst mit einigem Abstand, wie sehr man im Studium und danach geprägt wird durch die Art des Umgangs, der Motivation, der kritischen Diskussion, der Liebe zum Detail, durch die Ermunterung, die Welt mit offenen Augen zu sehen und sich die abstrusen Lieblingsideen Anderer mal anzuhören. Schließlich hat man ja auch eine Lieblingsidee. Und man muss lernen im richtigen Moment beherzt zuzuschlagen!

Für viele Lektionen in diesen Disziplinen möchte ich (in chronologischer Reihenfolge) Prof. Dr. Matthias Sprinzl, Prof. Dr. Gerhard Krauss, Dr. John Hallenbeck, Prof. Dr. Michael Sendtner und Prof. Dr. Josef Köhrle danken. Ihnen Allen danke ich auch für Ihren Langmut, der oftmals vonnöten war, wenn ich mit den Fragen im Konjunktiv kam oder, noch schlimmer, die berüchtigten Sinnfragen stellte.

Genauso viel Langmut haben auch Dr. Mike Brenner, Dr. Dolph Hatfield, Prof. Dr. Stefan Wiese, Dr. Sibylle Jablonka, Dr. Maria da Peña Berzaghi, Prof. Dr. Clemens Steegborn, Prof. Dr. Annette Grüters und Prof. Dr. Lutz Schomburg aufgebracht – vielen, lieben Dank Euch Allen für gemeinsame Blicke in den ersten Kreis der Hölle sowie in arkadische Landschaften! Zurück zu Proviant tragen und Leitern stellen, zu Steine klopfen und Kunst am Bau! Ich hatte das Glück, meine Entdeckungsreisen mit vielen lieben Menschen gemeinsam zu erleben. Zu Beginn war es eine kleine Seilschaft mit Lutz Schomburg, dem es gelang, mich von der Schönheit der intellektuellen und praktischen Beschäftigung mit Selen zu überzeugen. Danach stießen Vartitér Seher, Anita Kinne und Antje Kretschmer zum Team, ohne die ich nie so weit gekommen wäre. Inzwischen sind viele liebe und begabte Menschen in die AG Uli gekommen und haben mit mir am gleichen Strang (und meist in die gleiche Richtung) gezogen – vielen Dank, Ihr habt Alle mehr hinterlassen als Kisten im Kühlschrank und Einträge in der Datenbank! Es war eine Freude mit Euch die Welt und die Menschen zu erforschen, meistens experimentell und mitunter auch in tiefgründigen Gesprächen.

Wo fängt man an, wo hört man auf? Insider und Zugelaufene? Vielleicht alphabetisch? Dr. Alexandra Mihalache, Anna Ahlendorf, Anja Fischbach, Boris Ballmer, Dr. Cornelia Riese, Carolin Höfig, Doreen Braun, Eva Wirth, Florian Streckfuß, Florian Knapp, Jazmin Chiu, Julia Drebes, Dr. Kostja Renko, Margarethe Werner, Dr. Marten Michaelis, SiJie Zhang, Silke Kappler, Stephan Roth. Ich danke außerdem Herrn Prof. Peter-Michael Kloetzel für die Möglichkeit, mich an der Lehre für Biochemie zu beteiligen.

Danken will ich hier auch meinem stark vernachlässigten Freundeskreis und meiner Familie, die ich hoffentlich nicht vernachlässigt habe, auch wenn ich mal Heiligabend noch schnell in den Stall geschaut habe... Besonders meinen Eltern, und Steffi, Leopold und Ferdinand. Euch danke ich auch für das regelmäßige Nachjustieren der Maßstäbe.