

DEUTSCHES INSTITUT FÜR ERNÄHRUNGSFORSCHUNG POTSDAM-REHBRÜCKE  
ABTEILUNG BIOCHEMIE DER MIKRONÄHRSTOFFE

## **SELEN, SELENOPROTEINE UND DER WNT-SIGNALWEG**

Regulation der gastrointestinalen Glutathionperoxidase durch  $\beta$ -Catenin und  
Beeinflussung des Wnt-Signalwegs durch den Selenstatus

### **DISSERTATION**

zur

Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
in der Wissenschaftsdisziplin „Biochemie der Ernährung“

eingereicht an der

MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT  
der UNIVERSITÄT POTSDAM

von

**Anna Patricia Kipp**

geboren am 20.07.1980 in Frankfurt am Main

Potsdam, im Dezember 2008



**Gutachter:**

Prof. Dr. Regina Brigelius-Flohé

Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Abteilung Biochemie der Mikronährstoffe,  
Potsdam-Rehbrücke

Prof. Dr. Tilman Grune

Universität Hohenheim, Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft,  
Fachgruppe Biofunktionalität und Sicherheit der Lebensmittel, Stuttgart

Prof. Dr. Lars-Oliver Klotz

Universität Düsseldorf, Institut für umweltmedizinische Forschung, Arbeitsbereich molekulare  
Altersforschung, Düsseldorf

**Tag der mündlichen Prüfung: 05.05.2009**

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:  
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter gleichen  
Bedingungen 3.0 Deutschland

Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Online veröffentlicht auf dem  
Publikationsserver der Universität Potsdam:  
<http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2009/3048/>  
urn:nbn:de:kobv:517-opus-30484  
[<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-30484>]

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>SEITE</b>
Inhaltsverzeichnis	3
Verzeichnis der Abkürzungen	6
Verzeichnis der Abbildungen	8
Verzeichnis der Tabellen	9
<b>1 Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1 Selen und Selenoproteine .....	10
1.1.1 Das essentielle Spurenelement Selen .....	10
1.1.2 Funktionen von Selenoproteinen .....	11
1.1.3 Biosynthese von Selenoproteinen .....	13
1.1.4 Regulation der Selenoproteinbiosynthese .....	14
1.1.5 Glutathionperoxidasen .....	15
1.1.6 Gastrointestinale Glutathionperoxidase (GPx2) .....	15
1.2 Der kanonische Wnt-Signalweg .....	16
1.3 Das colorektale Karzinom .....	18
1.3.1 Aufbau und Homöostase des Gastrointestinaltrakts .....	18
1.3.2 Pathogenese des colorektalen Karzinoms .....	19
1.4 Selen und Darmkrebs .....	20
1.5 Ziele .....	22
<b>2 Methoden</b>	<b>23</b>
2.1 Genexpressionsanalysen im Mausmodell .....	23
2.1.1 Tierversuch .....	23
2.1.2 Microarrayanalyse .....	24
2.1.3 Signalweganalyse .....	25
2.1.4 Reverse Transkription .....	25
2.1.5 Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR) .....	26

2.1.6	PCR-Array .....	28
2.2	Zellkultur .....	28
2.2.1	Kultivierung verschiedener Zelllinien .....	28
2.2.2	MTT-Test .....	29
2.3	Reportergenanalysen .....	30
2.3.1	Transiente Transfektion .....	30
2.3.2	Luciferase-Messung .....	31
2.3.3	$\beta$ -Galaktosidase-Messung .....	31
2.3.4	Bestimmung der Transfektionseffizienz .....	31
2.4	Klonierung von PCR-Produkten .....	32
2.4.1	Computer-gestützte Analyse des GPx2 Promotors .....	32
2.4.2	Plasmidisolierung und –sequenzierung .....	32
2.4.3	Zielgerichtete Mutagenese des GPx2 Promotors .....	32
2.4.4	Agarosegelelektrophorese und Aufreinigung von PCR-Produkten .....	33
2.4.5	TA-Klonierung und Ligation .....	33
2.4.6	Transformation von <i>E. coli</i> .....	34
2.5	RNA-Isolierung aus Zellen .....	34
2.6	RNA-Gel .....	35
2.7	Proteinbestimmung nach Bradford .....	35
2.8	Messung von Enzymaktivitäten .....	35
2.8.1	Glutathionperoxidase-Aktivität .....	36
2.8.2	Thioredoxinreduktase-Aktivität .....	36
2.9	Gewinnung von Kernlysaten .....	36
2.10	SDS-PAGE und Western Blot .....	37
2.11	Bestimmung des Selengehalts in organischen Materialien .....	39
2.12	Statistik .....	39
3	Ergebnisse .....	40
3.1	Ergebnisse der Microarray-Analyse .....	40

3.1.1	Charakterisierung der Mäuse .....	40
3.1.2	Microarray-Analyse .....	41
3.1.3	Beeinflussung der Selenoproteinexpression auf mRNA-Ebene .....	42
3.1.4	Expression von Nicht-Selenoproteinen und Analyse der regulierten Signalwege im Colon .....	44
3.1.5	Analyse des Wnt-Signalwegs mittels PCR-Array und qPCR im Colon.....	46
3.2	Regulation von GPx2 durch den Wnt-Signalweg.....	48
3.2.1	Regulation des GPx2 Promotors durch den Wnt-Signalweg .....	48
3.2.2	Identifizierung und Untersuchung von $\beta$ -Catenin/TCF responsiven Elementen im GPx2-Promotor .....	52
3.2.3	Regulation der endogenen GPx2-Expression durch den Wnt-Signalweg .....	54
4	Diskussion .....	60
4.1	Genexpressionsanalyse im Colon .....	60
4.1.1	Biomarker für den Selenstatus .....	60
4.1.2	Analyse krebsrelevanter Signalwege.....	63
4.2	Regulation der GPx2 durch den Wnt-Signalweg .....	66
4.2.1	Konsequenzen der GPx2-Regulation durch $\beta$ -Catenin im gesunden Gewebe .....	68
4.2.2	Konsequenzen der GPx2-Regulation durch $\beta$ -Catenin in entarteten Zellen...	69
4.3	Selen und Wnt-Signalweg .....	71
4.4	Ausblick .....	73
5	Zusammenfassung .....	75
6	Literatur .....	77
7	Danksagung .....	92

## VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

3'-UTR	3'-untranslatierte Region
ACF	aberrante Kryptenfoci
AOM	Azoxymethan
APC	adenomatöse Polyposis Coli
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE	antioxidatives responsives Element
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	Rinderserumalbumin
BSS	<i>balanced salt solution</i>
CK1	Caseinkinase 1
COX-2	Cyclooxygenase 2
CtBP	<i>C-terminal binding protein</i>
Cy3	Cyanin 3-CTP
Cy5	Cyanin 5-CTP
DAN	2,3-Diaminonaphthalen
DCC	<i>deleted in colon cancer</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
Dkk	Dickkopf
DMBA	7,12-Dimethylbenz[a]Anthrazen
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dnTCF	dominant negatives TCF
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
Dvl	<i>dishevelled</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fötales Kälberserum
FDR	<i>false discovery rate</i>
GPx	Glutathionperoxidase
GSK3 $\beta$	Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$
HDAC1	Histondeacetylase 1
HO-1 bzw. Hmox1	Hämoxygenase 1
Hprt	Hypoxanthin-Guanin-Phospho-ribosyltransferase 1
LEF	<i>lymphoid enhancer factor</i>
LRP	<i>low density lipoprotein receptor related protein</i>
MsRB	Methionin-R-Sulfoxid-Reduktase
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NCHS	Nationales Zentrum für Gesundheitsstatistik

NF- $\kappa$ B	nukleärer Faktor $\kappa$ B
NMD	<i>non-sense mediated decay</i>
NOAEL	<i>no adverse effect level</i>
NQO1	NADPH-Quinonoxidoreduktase
Nrf2	NF-E2 <i>related factor 2</i>
Nrx	Nukleoredoxin
ONPG	O-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PPAR	<i>peroxisome proliferator activated receptor</i>
p-XSC	1,4-Phenylen-Bismethylen-Selenocyanat
RAR	Retinsäurerezeptor
Rpl13a	ribosomales Protein L13a
RPMI	<i>Rosewell Park Memorial Institute Medium</i>
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SBP2	<i>SECIS binding protein</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	Selenocystein
SECIS	<i>selenocysteine inserting sequence</i>
Secp43	43-kDa RNA-bindende Protein
SFRP	<i>secreted frizzled receptor protein</i>
SLA	<i>soluble liver antigen protein</i>
SOC	SOB-Medium (Super Optimal Broth) mit 20 mM Glucose
SPF	spezifisch pathogenfrei
SPS	Selenophosphatsynthetase
TBE	$\beta$ -Catenin/TCF Bindestelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCF	T-Zellfaktor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLE	<i>transducin-like enhancer of split</i>
TNB	5'-Thionitrobenzoesäure
Trsp	<i>transfer RNA selenoprotein</i>
TrxR	Thioredoxinreduktase
TSC	<i>tuberous sclerosis tumor-suppressor</i>
TSC	<i>tuberous sclerosis tumor-suppressor</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	World Health Organisation
WIF	<i>Wnt inhibitory factor</i>
Wnt	sekretierte, Cystein-reiche Glykoproteine
X-Gal	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid
$\beta$ -TrCP	<i><math>\beta</math>-transducin repeat containing protein</i>

## VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abb. 1 Selenoproteinbiosynthese.....	13
Abb.2. Der kanonische Wnt-Signalweg (modifiziert nach [97]) .....	17
Abb. 3. Gewichtsentwicklung der Mäuse .....	40
Abb. 4. Einfluss der Selenfütterung auf Plasmaselenspiegel, GPx- und TrxR-Aktivitäten .....	41
Abb. 5. Relative mRNA-Expression in Leukozyten von Sepw1, Gpx1, Selh und Selm in Abhängigkeit von Selen.....	43
Abb. 6. Relative mRNA-Expression von Trspap1, Ywhaq, Nqo1 und HO-1 in Abhängigkeit von Selen.....	44
Abb. 7. Relative mRNA-Expression von Genen des Wnt-Signalwegs in Abhängigkeit von Selen .....	48
Abb. 8. Basale GPx2-Promotoraktivität in verschiedenen Zelllinien .....	49
Abb. 9. Aktivierung des GPx2-Promotors in HepG2-Zellen durch Kotransfektion mit $\beta$ -Catenin und TCF .....	50
Abb. 10. Hemmung der GPx2-Promotoraktivität durch Wildtyp APC bzw. dnTCF .....	51
Abb. 11. Stimulation des GPx2-Promotors in Wnt3a-exprimierenden Zellen.....	52
Abb. 12. Skizze des GPx2-Promotors und Positionen der potentiellen TBEs.....	52
Abb. 13. Aktivierbarkeit verschiedener verkürzter Promotorkonstrukte durch $\beta$ -Catenin und TCF.....	53
Abb. 14. Reduzierte Aktivierbarkeit des GPx2-Promotors durch $\beta$ -Catenin und TCF durch Mutation von TBE 5.....	54
Abb. 15. Hemmung der endogenen GPx2-Expression auf mRNA und Proteinebene durch Transfektion von dnTCF in HepG2-Zellen.....	55
Abb. 16. Vergleich der nukleären Lokalisation von $\beta$ -Catenin und der GPx2 mRNA-Expression in Wildtyp und Wnt3a-exprimierenden 3T3-Zellen.....	56
Abb. 17. MTT-Test in HT-29 Wildtyp und HT-29 APC Zellen.....	57
Abb. 18. mRNA-Expression von APC, $\beta$ -Catenin, GPx2 und COX-2 in HT-29 Wildtyp und APC Zellen .....	58
Abb. 19. Protein-Expression von $\beta$ -Catenin und GPx2 in HT-29 Wildtyp und APC Zellen .....	59

Abb. 20. Modell zum Zusammenhang zwischen Selen, der GPx2-Expression und dem Wnt-Signalweg.....	72
---	----

#### **VERZEICHNIS DER TABELLEN**

Tab. 1. Humane Selenoproteine und ihre Funktionen (Übersicht in [24]) .....	12
Tab. 2. Oligonukleotidsequenzen (5' → 3') .....	27
Tab. 3. Zelllinien .....	28
Tab. 4. verwendete Plasmide .....	30
Tab. 5. Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel .....	37
Tab. 6. Vergleich der Microarray- und qPCR-Daten zur Selenoproteinexpression .....	42
Tab. 7. Liste der durch Selen beeinflussten Signalwege .....	46
Tab. 8. Vergleich zwischen Microarray, PCR-Array und qPCR .....	47

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Selen und Selenoproteine

### 1.1.1 Das essentielle Spurenelement Selen

Das Element Selen wurde bereits 1817 von dem schwedischen Chemiker Jöns Jakob von Berzelius entdeckt und nach der griechischen Mondgöttin Seléne benannt. Zunächst galt Selen ausschließlich als toxische Substanz, bis Schwarz und Foltz 1957 seine Bedeutung als essentielles Spurenelement nachwiesen [1]. In den 70er Jahren wurden die ersten Selenoproteine sowohl in Bakterien [2] als auch in Säugerzellen entdeckt [3, 4]. Im Gegensatz zu anderen Metallen, die als Kofaktoren mit Proteinen interagieren, wird Selen kotranslational als Bestandteil der Aminosäure Selenocystein (Sec) in Proteine eingebaut. Diese Selenoproteine sind für den größten Teil der biologischen Wirkung von Selen verantwortlich [5]. Im Vergleich zur Thiolgruppe im Cystein besitzt die Selenolgruppe des Selenocysteins einen niedrigeren pK-Wert, was dazu führt, dass bei physiologischem pH-Wert Selenocystein nahezu vollständig dissoziiert vorliegt. Deshalb ist das Selenol im Vergleich zum Thiol ein wirksameres Nukleophil mit höherer Reaktivität [6, 7].

Selen ist ein essentielles Spurenelement, dessen Zufuhrempfehlung zwischen 40 µg/Tag für erwachsene Männer bzw. 30 µg/Tag für erwachsene Frauen (Empfehlung der WHO) und 85 µg/Tag für Männer bzw. 70 µg/Tag für Frauen in Australien liegt [8]. Die DACH-Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr geben für den Bedarf in Deutschland einen Schätzwert von 30-70 µg/Tag an [9]. Unterhalb von 20 µg/Tag spricht man von einer mangelhaften Versorgung. Im Falle eines chronischen Selenmangels (< 10 µg/Tag), wie er in bestimmten Regionen Chinas zu finden ist, können Fälle der Keshan-Krankheit, einer Kardiomyopathie, und der Kashin-Beck-Krankheit, die mit der Degeneration der Gelenkknorpel einhergeht, auftreten [10, 11]. Eine zu hohe Zufuhr von Selen kann ab einer Tagesdosis von 800 µg (*no adverse effect level* = NOAEL) toxisch werden und geht ab einer täglichen Zufuhr von 2 mg mit Symptomen wie Haarausfall, Müdigkeit und Depression einher [12]. Selen kommt in der Nahrung vorrangig als Selenomethionin in pflanzlichen und Selenocystein in tierischen Lebensmitteln vor. Die Bioverfügbarkeit dieser organischen Selenverbindungen liegt bei 90 %. Anorganische Selenverbindungen wie Selenit sind vor allem in Supplementen enthalten und werden maximal zu 60 % absorbiert [12].

Viele Länder, vor allem in Europa, liegen mit ihrer tatsächlichen Selenzufuhr unter den Empfehlungen [8] und ihre Bevölkerung leidet somit unter einem moderaten Selenmangel, der möglicherweise Infektionen, aber auch die Entstehung chronischer Krankheiten wie Krebs, Alzheimer oder Morbus Parkinson begünstigt [13]. Die Zufuhrempfehlungen basieren in der

Regel auf der optimalen Enzymaktivität der Glutathionperoxidasen (GPx) im Plasma bzw. in Erythrozyten [14]. Die Supplementation von Personen in selenarmen Gebieten Chinas ergab, dass 37 µg Se/Tag in Form von Selenomethionin bzw. 66 µg Se/Tag in Form von Selenit ausreichen, um die GPx-Aktivität im Plasma zu maximieren. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Selenoprotein P, ein weiteres Selenoprotein im Plasma, mehr Selen benötigt, um seine volle Expression zu erreichen [15]. Da die Funktionen vieler Selenoproteine noch nicht vollständig bekannt sind, ist die Frage nach dem besten Biomarker für eine optimale Selenzufuhr noch offen.

### 1.1.2 Funktionen von Selenoproteinen

Selenoproteine sind sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten zu finden, allerdings nicht in Hefen und Pflanzen [16]. Analysen des humanen Genoms ergaben 25 Gene [17], die aufgrund von alternativem Splicing und anderer posttranslationaler Modifikationen bislang für 30 verschiedene Selenoproteine kodieren. Dies ergab auch eine Untersuchung mit markiertem <sup>75</sup>Se [18]. Selenoproteine können in verschiedene Familien eingeteilt werden: fünf Gene gehören zur Familie der Glutathionperoxidasen, drei zu den Thioredoxinreduktasen und drei zu den Dejodinasen (Tab. 1). Diese Selenoproteine sind bislang am besten charakterisiert. Außerdem können Selenoproteine aufgrund der Lage des Sec in zwei Gruppen eingeteilt werden [17]. Bei der einen Gruppe, die aus den Thioredoxinreduktasen und den Selenoproteinen S, X, O, I und K besteht, ist das Sec C-terminal lokalisiert, wenige Aminosäuren vom Stoppcodon entfernt. Bei allen anderen Selenoproteinen ist es N-terminal zu finden, wobei bei sechs Selenoproteinen, den so genannten Redoxinen, Sec Teil eines thioredoxinähnlichen CXXU-Motivs ist (Tab. 1) [19, 20]. Dies lässt darauf schließen, dass diese Selenoproteine an Redox-Reaktionen beteiligt sind. Ein Knockout des Gens *Trsp* (*transfer RNA selenoprotein*), das für die spezifische tRNA<sup>[ser]/sec</sup> zum Einbau von Sec kodiert, führt zu einem kompletten Verlust der Selenoproteinexpression und ist embryonal letal [21]. Bisher konnte außerdem für die Selenoproteine GPx4 [22], Thioredoxinreduktase 1 und 2 [23] gezeigt werden, dass ihre Gendeletionen mit letalem Verlauf einhergehen.

**Tab. 1. Humane Selenoproteine und ihre Funktionen** (Übersicht in [24])

Selenoprotein	Vorkommen	Funktion	Quelle
<b>Glutathionperoxidasen</b>			
GPx 1, cGPx	ubiquitär, cytosolisch	Reduktion von Hydroperoxiden	[3]
GPx 2, GI-GPx	Gastrointestinaltrakt, Krebszellen	Reduktion von Hydroperoxiden, Barriere gegen Hydroperoxidabsorption	[25, 26]
GPx 3, pGPx	Plasma	Reduktion von Hydroperoxiden	[27, 28]
GPx 4, PHGPx	ubiquitär	Reduktion von Hydroperoxiden, Spermienreifung, embryonale Entwicklung	[29, 30]
GPx 6	olfaktorisches Epithel	antioxidativer Schutz	[31]
<b>Thioredoxinreduktasen</b>			
TrxR 1	ubiquitär, cytosolisch und im Nukleus	Reduktion des oxidierten Thioredoxins (Trx)	[32]
TrxR 2	ubiquitär, mitochondrial	Reduktion des oxidierten Thioredoxins (Trx)	[33]
TrxR 3 (TGR)	Testis	Reduktion des oxidierten Thioredoxins (Trx), Glutathion- und Glutaredoxinreduktaseaktivität	[34]
<b>Dejodinasen</b>			
Dio 1	Leber, Niere, Schilddrüse, Hypophyse, Plasmamembran	T3-Synthese, Abbau von T3 und T4	[35]
Dio 2	Schilddrüse, Hypophyse, Muskel, ZNS, braunes Fettgewebe, ER-Membran	T3-Synthese	[36]
Dio 3	Plazenta, ZNS, Haut Plasmamembran	Abbau von T3 und T4	[37]
Selenoprotein H	ubiquitär	Redox-sensitives DNA-Bindeprotein, Redoxin-Familie	[38, 39]
Selenoprotein I	ubiquitär	in <i>E.coli</i> spezifische Ethanolamin-Phosphotransferase-Aktivität	[40]
Selenoprotein K	ubiquitär	antioxidative Funktion im Herz	[41]
Selenoprotein M	ubiquitär	Redoxin-Familie, Schutz vor Morbus Alzheimer	[42, 43]
Selenoprotein N	ubiquitär, ER-Membran	embryonale Entwicklung, Schutz vor Myopathien	[44]
Selenoprotein O	ubiquitär	unbekannt	[45]
Selenoprotein P	Plasma	Selentransport und –homöostase,	[46]
Selenoprotein S	ubiquitär, im ER	reguliert durch Glucose, zelluläres Redox-Gleichgewicht, Immunabwehr	[17]
Selenoprotein T	ubiquitär	Calcium-Homöostase, neuro-endokrine Sekretion, Redoxin-Familie	[47]
Selenoprotein V	Testis, Gehirn	Testisspezifische Form von SelW, Redoxin-Familie	[17]
Selenoprotein W	ubiquitär	Antioxidanz, Redoxin-Familie, Aufgabe in Muskel und Herz	[48]
Selenoprotein X (SelR)	ubiquitär	Methionin-R-Sulfoxid-Reduktase (MsRB2)	[49]
Selenoprotein 15	ubiquitär, im ER	Proteinfaltung im ER, aktiviert Apoptose, Redoxin-Familie	[50]
Selenophosphat-synthetase 2	ubiquitär	Selenophosphatsynthese für die Translation von Selenoproteinen	[51]

### 1.1.3 Biosynthese von Selenoproteinen

Die Selenoproteinbiosynthese ist ein sehr aufwendiger Vorgang, der im Vergleich zur normalen Proteinsynthese einige Besonderheiten aufweist. Die Aminosäure Selenocystein wird durch UGA, ein bislang nur als Stop-Codon bekanntes Basentriplett [52], codiert [53]. Um zwischen beiden Funktionen von UGA unterscheiden zu können, sind einige wichtige Elemente notwendig (Übersicht in [5]). Neben einigen spezifischen Proteinen ist zunächst die *selenocysteine inserting sequence* (SECIS), eine Haarnadelstruktur in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der mRNA aller eukaryotischer Selenoproteine, von besonderer Bedeutung. Diese Struktur verhindert einen vorzeitigen Kettenabbruch, indem sie mit Faktoren konkurriert, die zum Zerfall des mRNA-ribosomalen Komplexes führen würden. Eine weitere wichtige Komponente ist die spezifische tRNA<sup>[ser/sec]</sup> zur Übertragung von Sec. Im Gegensatz zu allen anderen Aminosäuren wird Sec direkt an seiner tRNA aus Serin synthetisiert [54], frei im Cytosol vorliegendes Sec wird also nicht zum spezifischen Einbau in Selenoproteine verwendet. Die Seryl-tRNA-Synthetase belädt die tRNA mit Serin, das nach der Phosphorylierung zu einem Phosphoseryl-Rest in einen Selenocysteylrest umgewandelt wird. Dieser letzte Schritt wird durch die Selenocysteinsynthetase katalysiert, die in Eukaryoten als das *soluble liver antigen protein* (SLA) identifiziert wurde [55]. Als Selenquelle dient Selenophosphat, das von der Selenophosphatsynthetase (SPS) aus Selenid und ATP gebildet wird. In Eukaryoten gibt es zwei Isoformen dieses Enzyms, wobei SPS2, das selbst ein Selenoprotein ist, direkt an der Synthese des Selenodonors beteiligt ist [51]. Dies geschieht innerhalb des Selenocystein-Synthesekomplexes, der neben der tRNA<sup>[ser/sec]</sup>, SLA und SPS2 auch noch das 43-kDa RNA-bindende Protein Secp43 enthält.

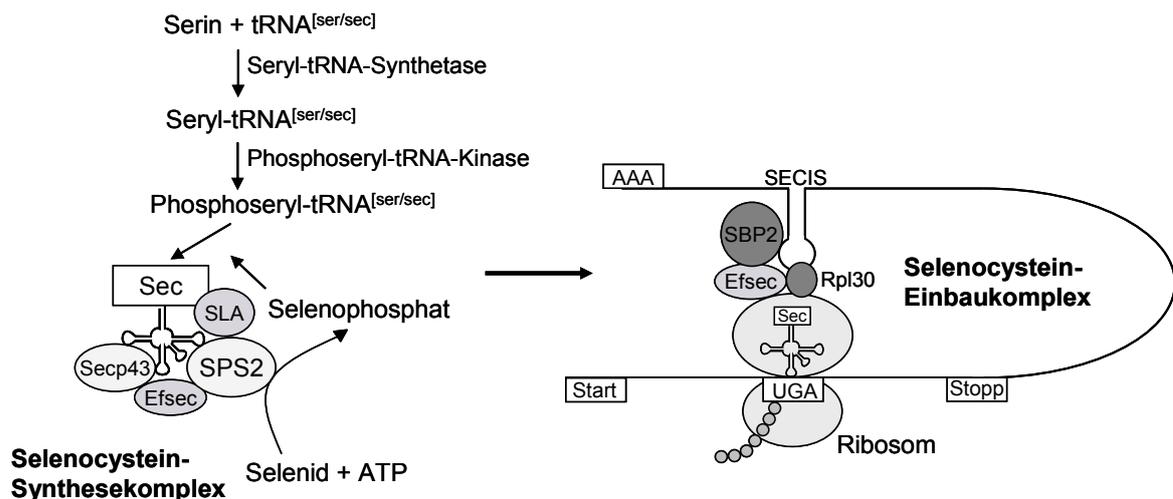


Abb. 1 Selenoproteinbiosynthese

Secp43 scheint in diesem Komplex die Aktivität der SPS, die Umwandlung der Seryl- zur Selenocysteyl-tRNA und die tRNA-Methylierung zu koordinieren [56]. Der für die Seleno-

proteinsynthese spezifische Elongationsfaktor Efsec erkennt die beladene tRNA<sup>[ser]/sec</sup> und transportiert sie zu den Ribosomen. Das *SECIS binding protein* (SBP2) transportiert die mRNA aus dem Kern ins Cytosol zu den Ribosomen und interagiert dort sowohl mit Rpl30 [57] als auch mit Efsec. Der entstehende Komplex aus SBP2, Rpl30, Efsec, der SECIS und der spezifischen tRNA<sup>[ser]/sec</sup> wird auch als Selenocystein-Einbaukomplex bezeichnet [58].

### 1.1.4 Regulation der Selenoproteinbiosynthese

Die Selenoproteinbiosynthese wird maßgeblich durch die Verfügbarkeit von Selen beeinflusst, was hauptsächlich auf post-transkriptionaler Ebene passiert. Zum einen kann Selen die mRNA-Stabilität verändern, indem es im Selenmangel zu einem verstärkten nonsensvermittelten Abbau (*non-sense mediated decay* = NMD) kommt, der innerhalb der Selenoproteine unterschiedlich stark auftritt [59, 60]. Diese unterschiedliche Stabilität der einzelnen Selenoprotein-mRNAs wird unter anderem durch die 3'UTR, insbesondere die SECIS, bestimmt [61]. Des Weiteren kann SBP2, das eine unterschiedlich starke Affinität zu den verschiedenen SECIS-Elementen hat, die mRNA vor ihrem Abbau schützen [62, 63]. Zum anderen führt ein Selenmangel zu einer verminderten Verfügbarkeit an Sec-tRNA<sup>[ser]/sec</sup>, was limitierend für die Selenoproteinsynthese ist. In diesem Fall wird das für Sec codierende UGA als Stopp-Codon genutzt. Nicht nur die absolute Menge an tRNA<sup>[ser]/sec</sup> wird durch die Selenversorgung beeinflusst, sondern auch das Verhältnis zweier tRNA<sup>[ser]/sec</sup>-Isoformen. Die tRNA<sup>[ser]/sec</sup> wird post-transkriptionell modifiziert: Adenin an Position 37 (A37) wird isopentenyliert, während Uridin an Position 34 (U34) methyliert wird, was in Methyl-Carboxyl-5'-Methyluridin (mcm<sup>5</sup>U) resultiert. Dieses modifizierte Uridin kann wiederum methyliert werden (als mcm<sup>5</sup>Um oder Um34 bezeichnet), was vermehrt bei steigendem Selengehalt der Fall ist [64, 65]. Um34 ist insbesondere für die Expression sogenannter Stress-responsiver Selenoproteine (z.B. GPx1, GPx3, SelX1, SelT, SelW, SelS) zuständig. Sogenannte *house-keeping*-Selenoproteine (GPx4, TrxR1 und 3), die trotz limitierter Selenversorgung exprimiert werden, werden durch tRNA<sup>[ser]/sec</sup> ohne zusätzliche Methylierung am U34 synthetisiert [66, 67]. Das Phänomen, dass verschiedene Selenoproteine unterschiedlich auf einen Selenmangel reagieren, wird auch als Hierarchie der Selenoproteine bezeichnet. So wird z.B. GPx1, die einen niedrigen Rang in der Hierarchie einnimmt, im Selenmangel kaum noch synthetisiert, und ihre erneute Synthese erfolgt bei Selenrepletion mit Verzögerung. GPx2, GPx4, Dejodinasen und Thioredoxinreduktasen werden hingegen erst durch einen lang andauernden, substantiellen Mangel beeinflusst [68, 69]. Diese Hierarchie ist allerdings bisher nur für ausgewählte Selenoproteine untersucht worden. Auch Organe werden entsprechend einer Hierarchie mit Selen versorgt. So sinkt bei mangelhafter Selenversorgung der Selengehalt im Gehirn und in den Testes deutlich später als in der Leber, Niere oder Lunge [68, 70].

Neben der Regulation durch Selen kann die Selenoproteinbiosynthese auch durch Veränderungen des Redox-Status reguliert werden, was logisch erscheint, da viele Selenoproteine an der Redoxkontrolle und an Detoxifikationsprozessen beteiligt sind. Unerwarteterweise wurde aber gezeigt, dass bei erhöhtem oxidativem Stress, SBP2 im Kern akkumuliert, was zu einem reduzierten Transport der Selenoprotein-mRNA zu den Ribosomen und damit zu einer reduzierten Translation führt [71]. Thioredoxin- und Glutaredoxin-Systeme können das oxidierte SBP2 reduzieren und dadurch die Selenoproteinbiosynthese wieder aktivieren.

### 1.1.5 Glutathionperoxidasen

Die Familie der Glutathionperoxidasen (GPx) besteht im Menschen aus bisher sieben bekannten Mitgliedern, wobei nur fünf davon Selenoproteine sind (Tab. 1). Alle Glutathionperoxidasen haben gemeinsam, dass sie Wasserstoffperoxid und organische Hydroperoxide zu ihren Alkoholen reduzieren können. Dabei wird Sec zu Selenensäure oxidiert. Dessen Reduktion erfolgt unter Verbrauch zweier Thiole, die in der Regel Glutathion sind, im Fall der GPx3 aber auch Glutaredoxin bzw. Thioredoxin oder Proteinthiole im Fall der GPx4 sein können [72]. So können diese Enzyme Zellen vor oxidativen Schäden schützen. Die konservierte katalytische Triade besteht bei allen vier Enzymen aus den Aminosäuren Selenocystein, Glutamin und Tryptophan [73]. Mit Ausnahme der GPx4, bei der es sich um ein monomeres Enzym handelt, liegen Glutathionperoxidasen als homotetramere Proteine vor. Weitere Unterschiede zwischen den Familienmitgliedern ergeben sich in Bezug auf ihre Gewebelokalisation (Tab. 1) und Substratspezifität. Während GPx1 und GPx2 nur lösliche Hydroperoxide umsetzen, können GPx4 und zu einem geringeren Anteil auch GPx3 Hydroperoxide degradieren, die Bestandteil komplexer Lipide sind [72]. Auch innerhalb der Familie der Glutathionperoxidasen gibt es eine Hierarchie: GPx2 ist das stabilste Familienmitglied, gefolgt von GPx4, während GPx1 und GPx3 ähnlich anfällig gegenüber Selenmangel sind [26, 68]. Geht man davon aus, dass nur besonders wichtige Selenoproteine auch im Selenmangel weiter gebildet werden, so ist GPx2 von besonderem Interesse.

### 1.1.6 Gastrointestinale Glutathionperoxidase (GPx2)

GPx2 wurde als epithelspezifische Glutathionperoxidase im Gastrointestinaltrakt identifiziert, wobei sie bei Menschen auch in der Leber exprimiert wird [25]. Aufgrund der spezifischen Expression im Gastrointestinaltrakt wurde ihre Rolle zunächst in einer Barrierefunktion zum Schutz vor Hydroperoxidabsorption gesehen [25], was im CaCo2-Zellkulturmodell gezeigt werden konnte [74]. Auffällig ist, dass die GPx2-Expression nicht gleichmäßig über das gesamte Darmepithel verteilt ist, sondern vermehrt in undifferenzierten, proliferierenden Zellen des Kryptengrunds der Lieberkühnschen Krypten und in Panethzellen des Dünndarms zu finden ist [75]. Außerdem wurde gezeigt, dass GPx2 auch in Krebszellen exprimiert wird. Sie

liegt während der neoplastischen Transformation von Plattenepithelzellen [76], im prämaligen Stadium des Barrett's Ösophagus [77] und in humanen colorektalen Adenomen vermehrt vor [75, 78, 79].

Ebenso wie GPx1 Knockout-Mäuse haben auch GPx2 Knockout-Mäuse keinen auffälligen Phänotyp [80]. Ein kombinierter Knockout jedoch resultiert in Wachstumseinbußen und in durch Bakterien induzierter, intestinaler Entzündung, die in die Ausbildung einer Colitis [81] und anschließende Tumorbildung mündet [82]. Die Heterozygotie für GPx2 bei gleichzeitigem GPx1-Knockout konnte diesen Phänotyp aufheben, was für GPx1 nicht der Fall war [83]. Dies deutet darauf hin, dass GPx2 eine Rolle bei Proliferations- und Transformationsprozessen spielt, welche ist allerdings noch ungeklärt. Auch die Erkenntnisse zur transkriptionellen Regulation der GPx2 klären diese Frage nicht. So kann die Transkription von GPx2 zum einen durch Retinsäure aktiviert werden, was in MCF-7-Zellen [84], einer Brustkrebszelllinie, und in Hepatoma-Zellen [85] gezeigt wurde. Zum anderen wird GPx2 durch das Nrf2-Keap1-System reguliert, das normalerweise die Expression protektiver Enzyme induziert [86]. Innerhalb des GPx2-Promotors wurde ein funktionelles antioxidatives responsives Element (ARE) identifiziert. Außerdem ist noch eine Regulation der GPx2 durch  $\Delta Np63$ , einen Transkriptionsfaktor, der vor allem in undifferenzierten Zellen aktiv ist, bekannt [87].

### 1.2 Der kanonische Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg ist evolutionär stark konserviert und von Nematoden bis zum Säugetier zu finden [88]. Er ist von großer Bedeutung für die Ausbildung der dorso-ventralen Achse und die Organreifung während der embryonalen Entwicklung [89]. Auch im adulten Organismus ist er überall dort aktiv, wo Stammzellen proliferieren [90]. Dies ist vor allem im zentralen Nervensystem, im Knochen, in den Testes, in der Haut, in Haarfollikeln, im blutbildenden System und im Gastrointestinaltrakt der Fall. Mit der Bezeichnung „Wnt“ sind sekretierte, Cystein-reiche Glykoproteine gemeint, die parakrine Zielzellen aktivieren, indem sie extrazellulär an Rezeptoren binden und so intrazellulär zur Aktivierung der Signalkaskade beitragen [91]. Im Menschen sind bisher 19 Gene bekannt, die für Wnt-Proteine kodieren [92]. Diese Wnt-Proteine können drei Signalwege aktivieren: den kanonischen Wnt- $\beta$ -Catenin-Signalweg (im Folgenden als Wnt-Signalweg bezeichnet), den Wnt/ $Ca^{2+}$ -Signalweg und den Wnt-Signalweg, der die planare Zellpolarität und den Aufbau des Zytoskeletts organisiert. In letzterem Fall stellt  $\beta$ -Catenin die Verbindung zwischen E-Cadherin und  $\alpha$ -Catenin und dem Actin-Zytoskelett her [93]. Welcher dieser drei Signalwege aktiviert wird, wird durch das vorliegende Wnt-Protein, dessen Bindung an einen der zehn Transmembranrezeptoren der Frizzled-Familie, die Bindung von Korezeptoren und intrazelluläre Protein-Protein-Interaktionen beeinflusst.



da stabilisierende Phosphorylierungen durch GSK3 $\beta$  an Axin und APC ausbleiben [101]. Dadurch liegt mehr  $\beta$ -Catenin im Cytosol vor und gelangt vermehrt in den Kern, wo es als Komplex mit TCF/LEF [102] und anderen Aktivatoren wie Bcl9 und Pygopus zur Transaktivierung der Zielgene beiträgt [103]. Zu den Zielgenen zählen eine Reihe von Genen, deren Translationsprodukte eine Vielzahl von Aufgaben in der Zelle übernehmen (Übersicht unter: <http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html>). Dazu gehören u.a. der Wachstumsfaktor VEGF [104], Cyclin D1 [105] als Aktivator des Zellzyklus, Cyclooxygenase 2 (COX-2) [106, 107], die Transkriptionsfaktoren c-Jun [108] und c-Myc [109] sowie eine Reihe von Genen des Signalwegs selbst. c-Myc ist insofern von besonderer Bedeutung, als es als transkriptioneller Regulator mehr als 15 % aller Gene kontrolliert und so einen Einfluss auf eine Vielzahl von Prozessen in der Zelle hat [110]. Ein Doppelknockout von APC und c-Myc ergab, dass viele der Wnt-Zielgene nicht mehr aktiviert wurden, obwohl  $\beta$ -Catenin vermehrt im Kern lokalisiert war [111].

Neben der Aktivierung des Signalwegs durch Wnt-Liganden gibt es noch weitere Möglichkeiten, durch Hemmung der GSK3 $\beta$  auf den Signalweg einzuwirken. Dies kann zum einen über Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) vermittelt werden, das durch Bindung an den EP<sub>2</sub>-Rezeptor intrazellulär eine G-Protein vermittelte Kaskade aktiviert (Abb.2 (3)). Während die  $\alpha$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins an Axin bindet, hemmen die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit über den Akt-Signalweg die GSK3 $\beta$  durch Phosphorylierung [112]. COX-2, die den ersten Teil der PGE<sub>2</sub>-Synthese bis zur Vorstufe PGH<sub>2</sub> katalysiert, zählt ebenfalls zu den Wnt-Zielgenen. Zum anderen kann der Wnt-Signalweg durch Verschiebung des zellulären Redox-Gleichgewichts beeinflusst werden. Angriffspunkt ist dabei Nukleoredoxin (Nrx), ein Thio-redoxin-verwandtes Protein, das Dvl bindet und so die Hemmung der GSK3 $\beta$  verhindert (Abb.2 (2)). Durch Oxidation (Stimulation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) werden Cystein-Reste von Nrx modifiziert, wird Dvl aus der Bindung gelöst und dadurch GSK3 $\beta$  inaktiviert [113]. Außerdem können lösliche Wnt-Inhibitoren wie WIF (*Wnt inhibitory factor*) oder SFRP (*secreted frizzled receptor protein*) die Bindung der Wnt-Liganden an Frizzled kompetitiv hemmen [114, 115] oder durch Bindung an LRP wie im Fall von Dickkopf (Dkk) eine Dimerisierung der Rezeptoren unterbinden [116].

### 1.3 Das colorektale Karzinom

#### 1.3.1 Aufbau und Homöostase des Gastrointestinaltrakts

Die Hauptaufgabe des Darms besteht vor allem in der Absorption von Nährstoffen. Die dafür benötigte Oberfläche bildet das absorptive Epithel, in dem es in Form von Einstülpungen (Krypten) und im Dünndarm zusätzlich in Form von fingerförmigen Verlängerungen (Villi) angeordnet ist. Die Epithelzellen haben eine Lebensspanne von 3-4 Tagen [117], so dass

der Erhalt des Darmepithels von einer kontrollierten, stetigen Proliferation abhängt. Im Kryptengrund befinden sich pluripotente Stammzellen und die daraus entstehenden, proliferierenden Vorläuferzellen, die zu Enterozyten, enteroendokrinen Zellen, Becherzellen und Panethzellen differenzieren [118]. Während dieser Reifung migrieren die Zellen vom Kryptengrund in Richtung Villusspitze, wo sich die sterbenden Zellen ablösen. Nur die Panethzellen, die nicht im Colon gebildet werden, verbleiben im Kryptengrund, wo sie eine Lebensspanne von etwa 60 Tagen haben [119]. Dieser komplizierte Vorgang wird durch eine Reihe von Signalwegen beeinflusst, aber maßgeblich von der Aktivität des Wnt-Signalwegs koordiniert [120]. Die Wnt-Liganden werden dazu von den Stammzellen selbst und vom mesenchymalen Gewebe sezerniert, das die Krypten umgibt [121]. Dadurch entsteht ein Gradient, der in Richtung Villusspitze abnimmt. Ephrine und ihre Rezeptoren sind ebenfalls Wnt-Zielgene und ihre gerichtete Expression führt entlang der Krypt-Villus-Achse zur Trennung zwischen Proliferations- und Differenzierungszone [122]. Der Wnt-Signalweg dient also der Erhaltung der Proliferation in den Stammzellen, führt aber gleichzeitig zur Reifung und Ausdifferenzierung der Panethzellen [123]. Die Hemmung des Signalwegs durch Depletion von TCF-4 resultiert im Verlust des epithelialen Stammzellkompartiments und der Kryptenstruktur [120], was ebenso durch Überexpression des Wnt-Inhibitors Dkk1 erreicht wird [124]. Überaktivierung hingegen führt innerhalb von fünf Tagen zu einer Vergrößerung der Krypten und im späteren Verlauf zur malignen Transformation durch Fehler in der Differenzierung, zu Hyperproliferation und atypischer Migration [125].

### **1.3.2 Pathogenese des colorektalen Karzinoms**

Das colorektale Karzinom ist eine der Haupttodesursachen in der westlichen Welt. Laut der Krebsstatistik des US-amerikanischen Nationalen Zentrums für Gesundheitsstatistik (NCHS) ist es die zweithäufigste durch Krebs herbeigeführte Todesursache. Jährlich werden in den USA rund 150.000 neue Fälle diagnostiziert, von denen etwa 50.000 letal verlaufen [126]. Tumore des Colons entwickeln sich aus normalen Epithelzellen, die in einem mehrstufigen Prozess zu aberranten Kryptenfoci (ACF), benignen Adenomen bis hin zu Karzinomen entarten [127]. Die Ursache dafür liegt im Kontakt mit einer Reihe von Umweltfaktoren sowie einer angeborenen oder erworbenen genetischen Prädisposition. Dadurch kommt es zu einer durch Mutationen verursachten Aktivierung von Onkogenen und/oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen.

Fearon und Vogelstein [127] entwickelten das folgende genetische Modell zur colorektalen Karzinogenese: Zunächst ist der Übergang vom gesunden zu einem hyperproliferierenden Colonepithel in 80 % der Fälle auf eine Mutation im Gen des Tumorsuppressors APC zurückzuführen [128]. Dadurch entsteht ein verkürztes APC-Protein, dem die Bindungsstellen für  $\beta$ -Catenin und Axin fehlen, was in einer konstitutiven Aktivierung des Wnt-Signalwegs

resultiert. Liegt keine APC-Mutation vor, so wird in der Initiationsphase alternativ  $\beta$ -Catenin an einer der für den Abbau wichtigen Phosphorylierungsstellen mutiert [129]. In beiden Fällen kommt es durch die Aktivierung des Wnt-Signalwegs zur Aktivierung von c-Myc und zur COX-2-Überexpression (siehe 1.2). In daraus erwachsenden, frühen Adenomen wird eine Mutation im Onkogen K-Ras durch DNA-Hypomethylierungen begünstigt. Die sich anschließenden Mutationen der Tumorsuppressorgene für Smad4, DCC (*deleted in colon cancer*) und p53 charakterisieren den Übergang zum Karzinom. Da die Mutation von APC ein sehr frühes Ereignis der Tumorentstehung ist, ist die daraus resultierende konstitutive Aktivierung des Wnt-Signalwegs von großem Interesse. Um die Veränderungen in einer entarteten Zelle besser verstehen zu können, sind deshalb die Identifizierung von Wnt-Zielgenen und Informationen über ihre Funktion von großer Bedeutung.

### 1.4 Selen und Darmkrebs

Ein möglicher inverser Zusammenhang zwischen Selen und Krebs wurde seit den 70er Jahren auf der Basis von epidemiologischen Studien postuliert. Diese zeigten, dass ein niedriger Serum-Selenspiegel mit einer deutlich erhöhten Krebsinzidenz und –mortalität korreliert [130, 131]. Außerdem ist Selen eines der wenigen Mikronährstoffe, für das ein antikanzergener Effekt in einer doppelblinden, randomisierten, Plazebo-kontrollierten Interventionsstudie nachgewiesen werden konnte [132]. Dazu wurden 1.312 Probanden für 4,5 Jahre täglich mit 200  $\mu$ g Selen in Form von selenangereicherter Hefe behandelt, was in einer Reduktion der Gesamtkrebsmortalität um 50 % resultierte. Diese Effekte betrafen vorrangig das Auftreten von Prostata-, Colon- und Lungenkrebs. Auch in Tiermodellen zeigte Selen antikanzerogene Effekte (Übersicht in [133]). So führte z.B. in einem durch Azoxymethan (AOM) induzierten Darmkrebsmodell in Ratten die Behandlung mit 1 und 2 ppm Selenomethionin zu verminderter Bildung prämaligener Läsionen [134]. Diese Studien deuten darauf hin, dass Selen in begrenztem Umfang das Risiko, an einem colorektalen Karzinom zu erkranken, senken kann [135]. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind allerdings noch ungeklärt, aber die folgenden Punkte werden in diesem Zusammenhang diskutiert.

Zunächst können antikanzerogenen Effekte durch Selenoproteine vermittelt werden. Hier sind vor allem die Familien der Glutathionperoxidasen und Thioredoxinreduktasen zu nennen, die als Schutzsysteme vor oxidativem Stress und damit vor oxidativen Schäden, z.B. in der DNA, fungieren. Des Weiteren reduzieren Glutathionperoxidasen Entzündungsprozesse, die die Tumorpromotion vorantreiben können [136], indem sie die COX-2 durch Herabsetzen des Hydroperoxidlevels hemmen [13]. Zahlreiche Studien belegen außerdem einen direkten Effekt von Selen auf das Immunsystem (Übersicht in [137]). Auch für Selenoprotein 15 wird vermutet, dass es an der Tumorreduktion beteiligt sein könnte [50]. Allerdings zeigten tierexperimentelle Supplementationsstudien und die vorgestellte Clark-Studie vor allem dann

Effekte, wenn die verabreichten Selendosen deutlich über der Zufuhrempfehlung lagen. Bei dieser Dosierung sollte die Selenoproteinexpression bereits abgesättigt sein. Die antikanzerogenen Effekte sind also zumindest zum Teil darauf zurückzuführen, dass Selenverbindungen, die nicht an Proteine gebunden sind, unabhängig von Selenoproteinen den Stoffwechsel von Zellen beeinflussen. Etwa 5 % des zirkulierenden Selen liegt nicht als Selenoprotein, sondern in Form von verschiedenen Metaboliten vor [137]. Insbesondere den monomethylierten Formen Methylselenol und Selenomethylselenocystein werden zusätzliche antikanzerogene Eigenschaften zugeschrieben [133]. In verschiedenen Zelllinien können Selenverbindungen das Zellwachstum hemmen, indem sie durch Zellzyklusarrest und eine erhöhte Apoptoserate die zelluläre Proliferation senken. So führt beispielsweise die hochdosierte Behandlung mit 250 nM Selenit oder Selenomethionin in HL-60-Zellen zum Zellzyklusarrest und zur Induktion von Apoptose [138] durch Aktivierung der Caspase-8 und -9-Signalwege [139]. Mit Hilfe einer Microarrayanalyse lässt sich die genomweite Genexpression durch Änderungen in der Selenversorgung erfassen (Übersicht in [140]). In verschiedenen transformierten Zelllinien ergab dies, dass eine hochdosierte Behandlung mit Selenomethionin, Selenit oder anderen Selenverbindungen in allen Fällen zu einer Regulation der Expression von Genen des Zellzyklus führte (Übersicht in [141]). Microarrayanalysen im Colon von Mäusen, die 90 Tage mit 1 mg Selenomethionin/kg Futter supplementiert wurden, ergaben ebenfalls eine durch Selen beeinflusste Expression von Genen, die an der Zellzykluskontrolle beteiligt sind [142]. Nicht nur die Tumorpromotion, sondern auch die Tumorzellinvasion und die nachfolgende Metastasierung werden durch Selen beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass Selenit im mikromolearen Bereich die Invasivität von HT1080-Zellen hemmt, indem es deren Fähigkeit der Adhäsion an eine Kollagenmatrix herabsetzt [143]. Dies wird durch die verminderte Expression der Matrixmetalloproteinasen 2 und 9 und eine erhöhte Expression eines Inhibitors der Metalloproteinasen TIMP1 erreicht. Auch die Expression und Sekretion von VEGF (*vascular endothelial growth factor*), einem angiogenen Faktor, kann durch methylierte Selenverbindungen gehemmt werden, was zu einer verminderten Neoangiogenese innerhalb des Tumors führt [144]. Seo *et al.* konnten zeigen, dass Selenomethionin Zellen vor DNA-Schäden schützen kann, indem es DNA-Reparatursysteme aktiviert [145]. Dies wird über den Transkriptionsfaktor p53 vermittelt, der durch Selenomethionin aktiviert wird [145]. Nicht zuletzt kann Selen die DNA-Methylierung beeinflussen, die ein wichtiger epigenetischer Mechanismus zur Kontrolle der Genexpression ist. Durch vermehrte Methylierung von Selenverbindungen kommt es zu einer Verknappung verfügbarer Methyl-Donoren und damit zu verminderter DNA-Methylierung, die einer der ersten Schritte der Kanzerogenese darstellt [146].

### 1.5 Ziele

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst, den Einfluss von Selen auf die globale Genexpression im murinen Colon mittels Microarray zu untersuchen. Dazu sollte ein Tierexperiment mit selenadäquat bzw. marginal defizient gefütterten Mäusen durchgeführt werden. Die Unterschiede in der Selenzufuhr sollten so gewählt werden, dass sie den Schwankungen der Selenzufuhr der europäischen Bevölkerung durch normale Variationen in der Ernährungsgewohnheit entsprechen. Zum einen sollte damit die Frage nach einem geeigneten Biomarker für eine adäquate Selenversorgung beantwortet werden. Dies sollte mit der Überprüfung aller im Colon exprimierten, für Selenoproteine kodierenden mRNAs mittels qPCR einhergehen. Zum anderen sollte der Einfluss einer marginal defizienten Selenversorgung auf die Genexpression von Nicht-Selenoproteinen untersucht werden. Signalweganalysen sollten darüber Aufschluss geben, ob Selen einen Einfluss auf Signalwege hat, die an der Entstehung von Krebs beteiligt sein können. Dies wäre ein möglicher Erklärungsansatz für die postulierte präventive Funktion von Selen gegenüber Darmkrebs bzw. die erhöhte Krebsinzidenz bei Selenunterversorgung.

In diesem Kontext sollte das Selenoprotein GPx2, die gastrointestinale Glutathionperoxidase, mit Hilfe verschiedener Zellkultursysteme näher untersucht werden. Da dieses Enzym physiologisch im Gastrointestinaltrakt, und zwar in den proliferierenden Zellen des Kryptengrunds, aber auch in Krebszellen exprimiert wird, sollte nach einem Regulationsmechanismus für diese spezifische Expression gesucht werden. Von Interesse war der Wnt-Signalweg, da dieser sowohl im Kryptengrund als auch in Krebszellen aktiviert ist und somit mit der GPx2-Expression kolokalisiert. Außerdem zeigten Microarraydaten der Gruppe um van de Wetering *et al.*, dass die Hemmung des Wnt-Signalwegs in einer verminderten GPx2-Expression resultiert [147]. Eine mögliche Regulation der GPx2 durch den Wnt-Signalweg sollte deshalb zunächst mit Hilfe von Reporteranalysen des GPx2-Promotors und mehrerer Promotordeletionskonstrukte untersucht werden. Außerdem sollte in verschiedenen Zelllinien, in denen der Wnt-Signalweg unterschiedlich aktiv ist, die Regulation der endogenen GPx2-Expression auf mRNA- und Proteinebene überprüft werden. Die hierbei erlangten Erkenntnisse sollten zu einem besseren Verständnis der selenunabhängigen Regulation der GPx2 und ihrer bislang unklaren Funktion sowohl unter physiologischen als auch unter pathophysiologischen Bedingungen beitragen.

## 2 METHODEN

### 2.1 Genexpressionsanalysen im Mausmodell

#### 2.1.1 Tierversuch

Männliche Mäuse des Stammes C57BL6/J wurden im Alter von 3-4 Wochen bei der Firma Charles River (Sulzfeld) erworben und einer selenarmen und einer selenadäquaten Fütterungsgruppe zugewiesen. Beide Gruppen bestanden aus je 12 Mäusen. Die Tiere wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF) und unter einem 12-stündigen Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten. Sie erhielten freien Zugang zu Wasser und Futter nach Vorschrift des Tierschutzgesetzes. Da das Futter in Form von Pulver verabreicht wurde, erhielten sie außerdem ein Nageholz. Das selenarme Futter (C1045, Altromin, Lage) auf Basis von Torulahefe, das laut Hersteller einen Selengehalt  $< 0,03$  mg/kg Futter haben sollte, hatte laut eigener Messung einen Selengehalt von  $0,086$  mg/kg Futter. Das selenadäquate Futter wurde durch Zumischung von Selenomethionin (Acros, Geel, Belgien) auf einen Selengehalt von  $0,15$  mg/kg Futter eingestellt. Die Selengehalte wurden mittels Fluorimetrie (siehe 2.11) bestimmt. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von sechs Wochen durch Fütterung auf den jeweiligen Selenstatus eingestellt, wobei die Gewichtsentwicklung und der Futterverbrauch wöchentlich bestimmt wurden. Anschließend wurden sie mit Isofluran (Abbot, Wiesbaden) narkotisiert und mittels retroorbitaler Punktion mit heparinisierten Kapillaren entblutet. Das Plasma wurde durch Zentrifugation des Blutes bei  $3000 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  für  $10$  min gewonnen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die betäubten Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet. Die entnommenen Organe wurden mit einer in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Gefrierzange schockgefroren und ebenfalls bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Aus der Milz wurden Leukozyten nach folgendem Protokoll isoliert. Nachdem das Milzgewebe zwischen zwei Objektträgern zerstört, in  $5$  ml des Zellkulturmediums RPMI mit  $5\%$  FCS aufgenommen und mit Hilfe einer  $6$  ml Spritze mit  $20$  G-Nadel weiter zerkleinert wurde, erfolgte die Trennung der Blutzellen vom Bindegewebe mit Hilfe eines  $100 \mu\text{m}$  Zellsiebs, das mit  $5$  ml RPMI gespült wurde. Nach einer  $5$ -minütigen Zentrifugation bei  $200 \times g$  und einem Waschschrift mit RPMI, wurden die Erythrozyten durch  $5$ -minütige Inkubation in  $5$  ml Lysepuffer ( $0,15$  M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $10$  mM  $\text{KHCO}_3$ ,  $0,1$  mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH  $7,4$ ) lysiert. Dann wurden  $15$  ml BSS mit  $0,2\%$  BSA hinzugefügt und die Suspension für  $5$  min bei  $200 \times g$  zentrifugiert. Das Pellet wurde in  $1$  ml PBS resuspendiert und  $30 \mu\text{l}$  der Suspension wurde auf Objektträgern ausgestrichen. Die restliche Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert ( $5$  min bei  $200 \times g$ ) und das Pellet bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Max-Grünwald-Giemsa-Färbung ergab, dass die isolierten Leukozyten aus  $79\%$  Lymphozyten,  $18\%$  Granulozyten und  $2\%$  Monozyten bestanden und dass das Verhältnis dieser Populationen nicht durch den Selenstatus der Tiere beeinflusst wurde.

### 2.1.2 Microarrayanalyse

Die Genexpression im Colon selenarm und selenadäquat gefütterter Mäuse wurde mittels *Whole Mouse Genome Oligo* 44K Microarrays (Agilent Technologies, Böblingen) untersucht. Für jede der 24 Proben wurde ein individueller Array benutzt. Alle Arrays entstammten derselben Charge.

Nachdem das Colon unter flüssigem Stickstoff gemörsert wurde, wurden 20-30 mg des Organpulvers in 800 µl kaltem Trizol (Invitrogen, Karlsruhe) aufgenommen und für 2 x 2 min bei 30 Hz im Tissuelyser homogenisiert. Um RNA aus den Milz-Leukozyten zu gewinnen, wurde das gesamte Pellet eingesetzt. Die RNA-Isolierung erfolgte nach dem Trizolprotokoll mit einigen Modifikationen. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 12.000 x g und 4°C wurde der Überstand mit 160 µl Chloroform versetzt. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 12.000 x g und 4°C wurde die obere wässrige Phase abgenommen und mit 400 µl Isopropanol (final 70 %) für 10 min inkubiert. Das RNA-Pellet wurde durch 10-minütige Zentrifugation bei 12.000 x g und 4°C sichtbar. Danach wurde die Probe zweimal mit 75%igem Ethanol gewaschen, um nach dem Trocknen des Pellets in 50 µl DEPC-Wasser (0,05 % v/v DEPC) aufgenommen zu werden. Anschließend wurden die Proben, die für Microarrays verwendet wurden, zusätzlich über RNeasy mini Säulen (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die RNA-Konzentration wurde mittels des Spektrophotometers Nanodrop 1000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt. Außerdem wurde eine Qualitätskontrolle mittels Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) durchgeführt. Alle für die Microarrays verwendeten Proben hatten eine RIN-Nummer über 9.0.

Die Mikroarrayanalysen wurden in Kooperation mit Dr. J. Keijer am RIKILT-Institut in Wageningen (Niederlande) durchgeführt [148]. 500 ng der RNA-Probe wurden für die cDNA Synthese und anschließende cRNA-Amplifikation mittels *Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit* (Agilent) eingesetzt. Nach der cDNA-Synthese wurde jede Probe in zwei Aliquots geteilt. Die eine Hälfte wurde mit Cyanin 5-CTP (Cy5, PerkinElmer, Bosten, MA, USA) markiert und diente als Probe. Die andere Hälfte wurde mit Cyanin 3-CTP (Cy3, Perkin Elmer) markiert und wurde als Referenz verwendet. Die markierten cRNAs wurden anschließend über RNeasy mini Säulen (Qiagen) aufgereinigt. Die spezifische Aktivität der Fluoreszenzfarbstoffe Cy5 und Cy3 wurde berechnet, nachdem die RNA-Konzentration und die Menge Fluoreszenzfarbstoff pro µl mit einem Nanodrop 1000 (Peqlab Biotechnologie GmbH) bestimmt worden waren, und in pmol Farbstoff/µg cRNA angegeben. Äquimolare Mengen jeder Cy3-markierten Probe aller 24 Tiere wurden verwendet, um einen Referenzpool zu erstellen, der den Vergleich aller 24 Arrays ermöglichte. 1 µg Cy5-markierte cRNA Probe und 1 µg des Cy3-markierten Referenzpools wurden pro Microarray nach dem Agilent Hybridisierungsprotokoll hybridisiert und anschließend gewaschen. Die Vermessung der

Microarrays erfolgte mit Hilfe des Scanarray Express HT Scanners (PerkinElmer). Die Signalintensität der einzelnen Spots wurde mit der ArrayVision Software 8.0 (Imaging Research, Ontario, Kanada) ermittelt. Spots, deren Signalintensität weniger als zweifach über dem Hintergrund lag, wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt und die entsprechenden Gene galten als nicht exprimiert. Die Qualität der Rohdaten wurde mit Hilfe der Software „R“ [149] und Microsoft Excel unter Verwendung von MA-Plots, Scatter-Plots und NP-Plots überprüft. Alle 24 Arrays entsprachen den vorgegebenen Qualitätskriterien. Anschließend wurden die Rohdaten mit Hilfe der Software GeneMaths XR 1.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien) normalisiert. Die *false discovery rate* (FDR) Analyse wurde auf Basis der Benjamini-Hochberg-Prozedur mit einer Signifikanzgrenze von  $< 5\%$  durchgeführt. Zusätzlich wurden signifikante Gene mit Hilfe des Student's T-Test ermittelt, wobei auch hier das Signifikanzniveau bei  $< 5\%$  lag.

### 2.1.3 Signalweganalyse

Die Signalweganalyse wurde in Zusammenarbeit mit Dr. C. Evelo am BigCat-Institut in Maastricht (Niederlande) durchgeführt, um die Daten der Arrayanalyse in den Kontext biologischer Signalwege einordnen zu können. Dazu wurden die Programme GenMAPP 2.1, Gene Map Annotator und Pathway Profiler [150] herangezogen. Zunächst mussten die Agilent-IDs der einzelnen Proben in Uniprot- und Ensemble-IDs umgewandelt werden, um kompatibel für GenMAPP zu sein. Dann wurden die interessanten Signalwege mit Hilfe der MAPPFinder-Funktion von GenMAPP basierend auf der Anzahl regulierter Gene ausgewählt [151]. Gene wurden als reguliert betrachtet, wenn sie das folgende Kriterium erfüllten: der Betrag derfachen Änderung war  $\geq 1,2$  und der p-Wert  $\leq 0,05$ . Für jeden Signalweg wurde ein „Z-Score“ kalkuliert, in dem die erwartete Anzahl der Gene, die per Zufall das Kriterium erfüllen, von der Anzahl Gene, die tatsächlich das Kriterium erfüllten, abgezogen wurde. Anschließend wurde dieser Wert durch die Standardabweichung der Gene, die tatsächlich das Kriterium erfüllten, geteilt. Ein positiver Z-Score bedeutet, dass mehr Gene das Kriterium erfüllen, als per Zufall zu erwarten wäre.

### 2.1.4 Reverse Transkription

Je 3  $\mu\text{g}$  RNA wurden mit 150 fmol Oligo(dT)15-Oligonukleotiden und 180 U der Moloney's *murine leukemia virus* reversen Transkriptase (Promega, Mannheim) in einem Gesamtvolumen von 45  $\mu\text{l}$  in cDNA umgeschrieben. Zunächst wurden RNA und Oligo(dT)15-Oligonukleotide in einem T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen) für 4 min auf 72°C erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen. Anschließend wurde der Reaktionsmix, bestehend aus 700  $\mu\text{M}$  dNTPs (Promega), 9  $\mu\text{l}$  5 x Puffer, 30 U RNAsin (Promega), 180 U reverser Transkriptase und 4,5  $\mu\text{g}$  BSA (NEB-Biolabs, Frankfurt a.M.) pro Ansatz, zugegeben.

Die 2-stündige Amplifikation der cDNA erfolgte bei 37°C, dem Temperaturoptimum der verwendeten reversen Transkriptase. Eine abschließende 10-minütige Erhitzung auf 95°C führte zur Hitzeinaktivierung des Enzyms.

### 2.1.5 Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR)

Die cDNA-Proben zur Verifizierung des Microarrays wurden zunächst 1 : 10 in H<sub>2</sub>O verdünnt. Für die qPCR wurde 1 µl cDNA in einem 25 µl-Ansatz eingesetzt, wobei SYBR Green I (Molecular Probes, Eugene, USA) als Fluoreszenzfarbstoff diente. Der Reaktionsmix pro Probe setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen: 2,5 µl 10 x Puffer mit 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP-Mischung, je 0,25 µM der entsprechenden Oligonukleotide (Tab. 2), 0,1 x SYBR Green in DMSO und 625 mU Perpetual-Taq-DNA-Polymerase (Roboclon, Berlin). Alle qPCRs wurden an einem Mx3005P™ QPCR System (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) durchgeführt. Das Standardprotokoll bestand, nach einer einmaligen Erhitzung für 5 min auf 95°C, aus folgenden Heizschritten, die 40 x wiederholt wurden: 30 sec bei 95°C, 30 sec bei 60°C und 30 sec bei 72°C. Danach schloss sich eine Schmelzkurvenanalyse an, die der Kontrolle der Produktgröße und Spezifität der PCR-Reaktion diente.

Die relative Quantifizierung der Proben erfolgte mit Hilfe einer Standardkurve aus aufgereinigten PCR-Produkten, die einen Konzentrationsbereich von 1 x 10<sup>4</sup> bis 1 x 10<sup>9</sup> Kopien/µl erfasste. Sowohl die Standards als auch die Proben wurden als Triplikat gemessen. Die Oligonukleotide (Sigma, Taufkirchen) wurden so gestaltet, dass sie spezifisch nur cDNA und keine genomische DNA amplifizieren können, indem mindestens ein Oligonukleotid über eine Exon/Intron-Grenze gelegt wurde. Dies geschah mit Hilfe des Programms PerlPrimer v1.1.14 [152]. Die Oligonukleotidsequenzen sind in Tabelle 2 angegeben. PCRs aus humanen Zellkulturproben wurden auf das Referenzgen  $\beta$ -Actin normalisiert. Für die Normalisierung der qPCRs zur Verifizierung der Microarrays wurden die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1 (Hprt) und das ribosomale Protein L13a (Rpl13a) auf Basis folgender Kriterien herangezogen: erstens zeigten sie im Microarray die geringste Variation zwischen allen Proben, zweitens war das Verhältnis der Expressionsniveaus zwischen selenarmer und -adäquater Fütterungsgruppe so nah wie möglich bei 1 und drittens lag ihr Expressionsniveau mehr als 10-fach über dem Hintergrund, was eine zuverlässige mRNA-Quantifizierung gewährleistete. Auch in der qPCR waren beide Referenzgene unbeeinflusst von der Selenfütterung und niedrigen Tier-zu-Tier-Schwankungen unterlegen. Um auf beide Referenzgene normalisieren zu können, wurde der Mittelwert aus beiden errechnet und alle untersuchten Gene wurden auf diesen Normalisierungsfaktor bezogen [153].

Tab. 2. Oligonukleotidsequenzen (5' → 3')

Gene	Spezies	Acc. Nummer	Primersequenz	Produkt
APC	Mensch	NM_000038.4	fwd TGAGTTAGCTGCTGGAGAAGGA rev GAGCCTCATCTGTACTTCTGCCT	100 bp
c-Myc	Maus	NM_010849.4	fwd AATCCTGTACCTCGTCCGATTCC rev TCTTGCTCTTCTCAGAGTCGCT	150 bp
Dio 1	Maus	NM_007860	fwd GGGATTTTCATTCAAGGCAGCAGG rev TGTGGAGGCAAAGTCATCTACGA	115 bp
Dvl2	Maus	NM_007888.3	fwd GGTGTCTCCTGGCTTGTGTC rev CCAAATTCACCTGGTCCCTTCTG	135 bp
GPx1	Maus	NM_008160	fwd GAAGAGATTCTGAATTCCTCAA rev CACACCAGGAGAATGGCAAGA	256 bp
GPx2	Maus/ Mensch	NM_030677	fwd GTGCTGATTGAGAATGTGGC rev AGGATGCTCGTTCTGCCCA	252 bp
GPx3	Maus	NM_001083929	fwd CCATTTGGCTTGGTCATTCTGGG rev CACCTGGTCGAACATACTTGAGAC	105 bp
GPx4	Maus	NM_001037741	fwd GCTGGGAAATGCCATCAAATGGA rev ACGGCAGGTCCTTCTCTATCAC	115 bp
Gsk3β	Maus	NM_19827	fwd ATCAGCTGTTTCAAGTCTAGCCT rev AGCTGCTTTGCACTTCCAAAGTC	132 bp
Lef1	Maus	NM_010703.3	fwd CCGAGATCAGTCATCCCGAAGAG rev TTGTCTGACCACCTCATGCC	109 bp
Selenoprotein H	Maus	NM_001037279	fwd CCTTATTCCACCAACGCGCCA rev GCGTCAGCTCGTACAATGCTC	154 bp
Selenoprotein I	Maus	NM_027652	fwd ACTGGTTACTGCTTCCTCTCCTC rev CTGCTTACCACCTTGTACGCC	145 bp
Selenoprotein K	Maus	NM_019979	fwd ATGGAAGAGGGCCACCAAGGA rev TTACCTTCTCATCCACCAGCC	100 bp
Selenoprotein M	Maus	NM_053267	fwd GGACATTCAACTGTACCACAACCT rev TAGAAGCCGAGCTCCTGTACCA	158 bp
Selenoprotein O	Maus	NM_027905	fwd TGACACTGAGTTCCAAAGGCAC rev GTTAGTGAAGTCAGCACCAGTCAG	138 bp
Selenoprotein P	Maus	NM_001042613	fwd CTCATCTATGACAGATGTGGCCGT rev AAGACTCGTGAGATTGCAGTTTCC	137 bp
Selenoprotein S	Maus	NM_024439.3	fwd GAAGGCCTCAGGAAGAAGATGGT rev GTCTCCAGGAGCAGGTTCCA	137 bp
Selenoprotein T	Maus	NM_001040396	fwd CTTTAAATGATGTGCCAGTGTGGT rev GGTAGGGCTATGATCGATGATGTG	140 bp
Selenoprotein W	Maus	NM_009156	fwd ATGCTGGACATTTGTGGCGA rev GCAGCTTTGATGGCGGTAC	152 bp
Selenoprotein X	Maus	NM_013759	fwd ACTTCGAGCCAGGTGTCTACG rev GGCACCTTGGTCACACTGTCTG	129 bp
Sep15	Maus	NM_053102	fwd GTTTCAAGCGCGTCTGCTC rev TGCTTCTTCTGACAGCACCC	159 bp
Sephs2	Maus	NM_009266.3	fwd CAAGTACGGAGAGGGTCACCA rev CGTTGGAATTATCAGGAGCAGCAG	148 bp
Tle2	Maus	NM_019725.1	fwd CTGGATTGCTGAACCGAGAC rev CTCTGCTTTGATCCGTGGTGTG	137 bp
Txnrd 1	Maus	NM_015762.1	fwd TACTGCATCAGCAGTGATGATC rev CCATGTTCTTCCATGTGTTTAC	206 bp
Txnrd 2	Maus	NM_013711.3	fwd TACAGCAATGTTCCACAACCTGTC rev CTATCCGCCACCGTGAATC	148 bp
Txnrd 3	Maus	NM_153162.3	fwd TCGACAACGAACGTGTGGTG rev AGTAGCTGCTTCGTGAGCCC	111 bp
Wnt3a	Maus	NM_009522.1	fwd GCACCACCGTCAGCAAC rev CTGGCATCGGCAAATC	256 bp
β-Catenin	Maus	NM_007614.2	fwd AGCTGGCCTGGTTTGATACTGAC rev CTAAAACCATTCACCCCTACCAA	130 bp
β-Catenin	Mensch	NM_001098209	fwd GGGTCCTCTGTGAATTGCTC rev CATATGTCGCCACACCTTCAATCC	116 bp
Referenzgene:				
β-Actin	Mensch	NM_001101.2	fwd CAAGAGATGGCCACGGCTGCT rev TCCTTCTGCATCCTGTCCGCA	274 bp
Hprt1	Maus	NM_013556	fwd GCAGTCCCAGCGTCGTG rev GGCTCCCATCTCCTTCAT	168 bp
Ribosomales Protein L13a	Maus	NM_009438	fwd GTTCGGCTGAAGCCTACCAG rev TTCCGTAACCTCAAGATCTGCT	157 bp

### 2.1.6 PCR-Array

Der PCR-Array bietet die Möglichkeit, in einer Probe parallel 84 Gene eines Signalwegs zu untersuchen. *Mouse Wnt Signaling Pathway RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR Arrays* und *RT<sup>2</sup> Real-Time SyBR Green/ROX Master Mix* wurden dazu von der Firma SuperArray Bioscience Corporation (Frederick, MD, USA) bezogen. Nach Angaben des Herstellers wurden 0,66 µg RNA Äquivalente pro 96-Loch-Platte eingesetzt. Die zwölf cDNAs der selenarmen und der selenadäquaten Gruppe wurden zu gleichen Anteilen vereinigt. Die Rohdaten der 84 Gene wurden mit Hilfe des *RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR Array Data Analysis Web Portals* normalisiert und auf Basis der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode analysiert. Für jedes Gen wurde die relative Expressionsänderung durch die Intervention mit selenarmem Futter berechnet.

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Kultivierung verschiedener Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

**Tab. 3. Zelllinien**

Bezeichnung	Zelltyp	Bezugsquelle
HepG2	humane epitheliale Lebercarcinomzelllinie	ATCC HB8065
SW480	humane epitheliale Colonicarcinomzelllinie	DSMZ ACC 313
BHK-21	fibroblastoide Hamsternierenzellen	DSMZ ACC 61
NIH-3T3	murine embryonale Fibroblastenzelllinie	DSMZ ACC 59
NIH-3T3 Wnt3a	3T3 mit stabiler Überexpression des humanen Wnt3a	Rolf Kemler
HT-29	humane epitheliale Colonicarcinomzelllinie	DSMZ ACC 299
HT-29 APC	HT-29 mit stabiler Überexpression des humanen WT APC	Bert Vogelstein

Die NIH-3T3 Wnt3a-Zellen (Kispert, 1998) wurden von Rolf Kemler vom Max-Planck-Institut in Freiburg und die HT-29 APC Zellen (Morin, 1996) von Bert Vogelstein (Johns Hopkins Universität, Baltimore, USA) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung aller Zellen erfolgte im Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>-Partialdruck und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre. Alle Arbeiten an den Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen erhielten Medium, das mit 10 % hitzeinaktiviertem, fötalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin angereichert wurde. Das verwendete FCS entstammte einer Charge, welche nur über einen sehr geringen Selengehalt verfügte (Chargennummer: 40F9314K; Biochrom, Berlin). Zur Repletion der zellulären Selenversorgung wurden die Zellen, wenn nicht anderes angegeben, mit 50 nM Natriumselenit (Sigma) supplementiert.

- HepG2: RPMI 1640 mit 2 mM L-Alanyl-L-Glutamin, pH 7,1
- SW480: DMEM high glucose mit 2 mM L-Alanyl-L-Glutamin und 1 % nicht-essentielle Aminosäuren, pH 7,1

- BHK-21: DMEM low glucose mit 2 mM L-Alanyl-L-Glutamin und 1 % nicht-essentielle Aminosäuren, pH 7,1
- NIH-3T3: DMEM high glucose mit 2 mM L-Alanyl-L-Glutamin, pH 7,1
- HT-29: DMEM high glucose mit 1 % nicht-essentielle Aminosäuren, pH 7,1  
(alle Zusätze zum Medium wurden von Invitrogen bezogen)

Des Weiteren wurden die Medien zur Selektion der stabil transfizierten Zellen während deren Erhaltung mit 400 µg/ml Geneticin (NIH-3T3 Wnt3a) bzw. 600 µg/ml Hygromycin B (HT-29 APC) versehen. Alle 3 – 4 Tage erfolgte eine Umsetzung der Zellen kurz vor dem Erreichen der Konfluenz. Dazu wurden die Zellen mit PBS (140 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin (Biochrom), 0,02 % EDTA in PBS, pH 7,4) für ca. 5 min im Brutschrank inkubiert. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min bei 250 x g) wurde das Zellpellet resuspendiert, verdünnt und in frischem Medium ausgesät. Um definierte Zellzahlen für Experimente aussäen zu können, wurden die Zellen mittels Neubauer-Kammer gezählt. 20 µl Zellsuspension wurden dazu mit 20 µl Trypanblau-Lösung (0,4 % Trypanblau (Sigma), 1 : 3 mit PBS verdünnt) versetzt und unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Nur die ungefärbten Zellen galten als vital und wurden für die Zellzahlberechnung herangezogen. Die Zellen befanden sich für maximal 25 Passagen in Kultur. Die Aufbewahrung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Hierzu wurden 1 x 10<sup>6</sup> Zellen in Medium mit 20 % FCS und 10 % DMSO aufgenommen. Zum Auftauen der Zellen wurden diese im Wasserbad kurz angetaut und in vorgewärmtem Medium aufgenommen. Zur Entfernung von toten Zellen und DMSO wurden die Zellen anschließend kurz bei 250 x g bei Raumtemperatur abzentrifugiert, in frischem Kulturmedium resuspendiert und erneut ausgesät. Die Zellen wurden 2 x passagiert, bevor sie für Experimente verwendet wurden.

### 2.2.2 MTT-Test

Die Vitalität der Zellen wurde mittels MTT-Test überprüft, bei dem die durch die mitochondrialen Dehydrogenasen katalysierte Reduktion des wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, Sigma) zu einer unlöslichen Formazanverbindung quantifiziert wird. Die photometrisch ermittelte Menge des gebildeten Formazans dient als Maß für die Menge an vitalen Zellen. 4 x 10<sup>4</sup> Zellen wurden pro Loch einer 96-Loch-Platte ausgesät und für 24 h mit der zu testenden Substanz inkubiert. Vor der Messung wurde 20 µl MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS) in einer finalen Konzentration von 1,2 mM zu jedem Ansatz gegeben und für 40 min bei 37°C inkubiert. Dann wurde das Medium entfernt und die Zellen für 10 min in 100 µl Lysepuffer (95 % Isopropanol, 5 % Methansäure)

aufgeschlossen. Die Extinktion wurde bei 550 nm gegen 690 nm in einem Plattenphotometer (Synergy2, Bio Tek, Bad Friedrichshall) gemessen.

## 2.3 Reporteranalysen

### 2.3.1 Transiente Transfektion

Für Reporteranalysen wurden 2.111 Basen des GPx2 Promotors (GI-prom 1) bzw. verkürzte Promotorteile (GI-prom 2-5) in den Vektor pGL3 basic (Promega) kloniert (Tab. 4) [86]. Als Reporter diente die in pGL3 basic enthaltene *Firefly*-Luciferase. Der Leervektor pGL3 basic wurde als Kontrolle mitgeführt. Die Expressionsplasmide für humanes  $\beta$ -Catenin (pCLneo-Cat1-WT), TCF4 (pHR-hTCF4) und APC (pCMVneo-APC1-WT) wurden von Dr. Bert Vogelstein (Johns Hopkins Universität, Baltimore, USA), S33Y  $\beta$ -Catenin (pCLneo-CatS33Y) und dnTCF4 (pcDNA1-dnTCF4) von Dr. Oliver Müller (MPI, Dortmund) zur Verfügung gestellt. Die jeweiligen Leervektoren, in der Regel pcDNA3, dienten als Kontrolle. PSV- $\beta$ -Galaktosidase (Promega) bzw. phRL-TK-Renilla (Promega) wurden bei allen Ansätzen kotransfiziert und zur Normalisierung der *Firefly*-Luciferaseaktivität herangezogen.

**Tab. 4. verwendete Plasmide**

Plasmid	kurze Beschreibung
pGL3 basic	leerer Luciferase-Reportervektor ohne Promotor
GI-prom 1	pGL3 basic mit 2111 bp des GPx2-Promotors
GI-prom 2	pGL3 basic mit 1589 bp des GPx2-Promotors
GI-prom 3	pGL3 basic mit 1258 bp des GPx2-Promotors
GI-prom 4	pGL3 basic mit 879 bp des GPx2-Promotors
GI-prom 5	pGL3 basic mit 302 bp des GPx2-Promotors
GI-prom 1 mut TBE	GI-prom 1 mit Punktmutation im Bereich des TBE 5
GI-prom 5 mut TBE	GI-prom 5 mit Punktmutation im Bereich des TBE 5
pcDNA3	leeres Expressionsplasmid
pHR-hTCF4	Expressionsplasmid mit der cDNA des humanen TCF4
pcDNA1-dnTCF4	Expressionsplasmid mit der cDNA des dominant negativen TCF4
pCLneo-Cat1-WT	Expressionsplasmid mit der cDNA des humanen $\beta$ -Catenins
pCLneo-CatS33Y	Expressionsplasmid mit der cDNA des mutierten, humanen $\beta$ -Catenins
pCMVneo-APC1-WT	Expressionsplasmid mit der cDNA des humanen APC
pSV- $\beta$ -Gal	$\beta$ -Galactosidase-Kontrollplasmid zur Normierung der Transfektionseffizienz
phRL-TK-Renilla	Renilla-Kontrollplasmid zur Normierung der Transfektionseffizienz

24 Stunden vor der Transfektion wurden  $2,5 \times 10^5$  Zellen in 24-Loch-Platten ausgesät. Der Standardansatz sah die Transfektion von 0,15  $\mu$ g Reporterplasmid, verschiedenen Mengen (0,075 – 1  $\mu$ g) an Expressionsplasmiden und 0,4  $\mu$ g pSV  $\beta$ -Galaktosidase bzw. 15 ng phRL-TK-Renilla vor. Die DNA-Konzentration wurde bei zu vergleichenden Experimenten durch Kotransfektion mit dem jeweiligen Leervektor konstant gehalten und lag unter 1,5  $\mu$ g. Für Reporteranalysen in HepG2-, SW480- und BHK-21-Zellen wurde das Tfx<sup>TM</sup>20-Reagenz (Promega) nach Anleitung des Herstellers benutzt und in der 1,5-fachen Menge der DNA-Konzentration eingesetzt. HT-29- und 3T3-Zellen wurden mit Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen) nach Anleitung des Herstellers transfiziert. Es wurde die 3,75-fache Menge an

Transfektionsreagenz eingesetzt. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion in je 150  $\mu$ l 1 x Reporter-Lysepuffer geerntet und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Vor der Messung der  $\beta$ -Galaktosidase- bzw. Renilla- und *Firefly*-Luciferaseaktivität wurde das Lysat für 2 min bei 11.000 x g und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert.

### 2.3.2 Luciferase-Messung

Zur Bestimmung der *Firefly*-Luciferaseaktivität wurden 20  $\mu$ l Lysat in eine blickdichte 96-Loch-Platte pipettiert und in einem Luminoscan Ascent (Labsystems, Finnland) gemessen. Als Substrat diente Luciferin, das wie folgt angesetzt wurde: 5 ml 100 mM Tris (pH 7,8), 6,2 mg Coenzym A (Sigma), 4,3 mg Luciferin (P.J.K., Kleinbittersdorf), 8,84 mg ATP (Sigma). Anschließend wurde das Luciferingemisch in 500  $\mu$ l Aliquots lyophilisiert und eines davon in 3 ml Reaktionspuffer (20 mM Tricin, 1,07 mM  $\text{MgCO}_3$ , 0,1 mM EDTA, 2,67 mM  $\text{MgSO}_4$ , 33,3 mM DTT, pH 7,8 – 8,0) aufgenommen und lichtgeschützt bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. 100  $\mu$ l dieses Luciferin-Mixes wurden mit Hilfe des Luminoscan Ascent zum Lysat gegeben, um das entstehende Lichtsignal sofort erfassen zu können.

Die Renilla-Luciferaseaktivität wurde mittels Renilla Luciferase Assay System (Promega) bestimmt. Zu 20  $\mu$ l Lysat wurden in einem Luminoscan Ascent 75  $\mu$ l des Substrats für Renilla, das nach Angaben des Herstellers im mitgelieferten Puffer verdünnt wurde, gegeben. Dann wurde sofort die entstehende Chemilumineszenz gemessen.

### 2.3.3 $\beta$ -Galaktosidase-Messung

Ziel der  $\beta$ -Galaktosidasemessung ist es, die Luciferasewerte um Fehler durch schwankende Transfektionseffizienz und Vitalität der Zellen korrigieren zu können, was mathematisch die Division der Luciferaseaktivität durch die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität bedeutet. Zur Ermittlung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wurde der Umsatz von O-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (ONPG) zu O-Nitrophenol photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm in einem Plattenphotometer MR 5000 (Dynatech, Denkendorf) gemessen. Je 50  $\mu$ l Lysat der transfizierten Zellen wurden in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Dazu kamen 70  $\mu$ l  $\beta$ -Galaktosidasepuffer (120 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 80 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 7,3) und 30  $\mu$ l ONPG-Lösung (4 mg/ml ONPG in 60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,5). Die Platte wurde so lange bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert, bis eine Gelbfärbung sichtbar war. Als Blindwert diente 1 x Reporter-Lysepuffer.

### 2.3.4 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz diente der Nachweis von  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität mittels Färbung mit dem Substrat X-Gal (5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid). 48 h nach der Transfektion mit 0,5  $\mu$ g pSV- $\beta$ -Galaktosidase (siehe 2.3.1) wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen und anschließend für 10 min bei RT mit 500  $\mu$ l Glutaraldehyd (0,05 % v/v in

PBS) fixiert. Nach erneutem Waschen wurden 500 µl Reaktionspuffer (20 mM  $K_3Fe(CN)_6$ , 20 mM  $K_4Fe(CN)_6$ , 1,5 mM  $MgSO_4$ , pH 8,0 in PBS) zu den Zellen gegeben, die anschließend für 24 h bei 37°C inkubiert wurden. Die Blaufärbung der Zellen durch das freigesetzte X-Gal-Indolderivat wurde mit einem Mikroskop (Eclipse TE300, Nikon, Düsseldorf) und dem Programm Lucia Image (Version 4.61, Nikon) erfasst und mit der angeschlossenen Kamera (Modell DXM1200, Nikon) festgehalten.

## **2.4 Klonierung von PCR-Produkten**

### **2.4.1 Computer-gestützte Analyse des GPx2 Promotors**

Die Sequenzen des humanen (AF199441) und des murinen (U62658) GPx2-Promotors wurden hinsichtlich der potentiell darin enthaltenen Transkriptionsfaktorbindestellen untersucht. Hierfür wurden die Sequenzen mit Hilfe des Computerprogrammes „MatInspector“ [154] analysiert. Unter vielen anderen wurden potentielle TCF-Bindestellen mit der Konsensus-Sequenz GCTCAAAGC identifiziert.

### **2.4.2 Plasmidisolierung und –sequenzierung**

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* Übernachtskulturen erfolgte mit Plasmid Mini bzw. Midi-Kits (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers. Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde extern durch die Firma Seqlab (Göttingen) durchgeführt.

### **2.4.3 Zielgerichtete Mutagenese des GPx2 Promotors**

Mittels „overlap-extension-PCR“ wurde eine Punktmutation im GPx2-Promotor innerhalb einer der potentiellen TCF Bindestellen mit der Konsensus-Sequenz GCTCAAAGC eingefügt. Hierbei wurde das mittlere A gegen ein C ausgetauscht (fett gedruckt im Schema). Dies erfolgte mittels zweier ausgewählter Oligonukleotide, die die Mutation enthielten und diese während zwei unabhängigen PCR-Reaktionen in den oberen bzw. unteren DNA-Doppelstrang einfügten (PCR 1 und 2). Als DNA-Matrize für diese Reaktion diente 1 µl Plasmid-DNA des pCR-II-Topo-Vektors, der entweder GI-prom 1 oder GI-prom 5 enthielt. Der PCR-Mix wurde analog zum Standardansatz (siehe 2.1.5), allerdings in doppelter Ausführung (50 µl), hergestellt. Die PCR setzte sich nach einer 5-minütigen Erhitzung auf 95°C aus folgenden Heizschritten zusammen, die 30 x wiederholt wurden: 30 sec bei 95°C, 30 sec bei 63°C und 2 min bei 72°C. Da die beiden PCR-Produkte einen kurzen, die Mutation enthaltenden Bereich mit identischer Sequenz besaßen, konnten sie jeweils als Matrize füreinander fungieren. Diese Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, aufgereinigt und dienten als Ausgangsprodukte für eine weitere PCR unter den oben genannten Bedingungen, die zur Synthese des gesamten Promotors (GI-prom 1) bzw. des verkürzten Promotors GI-prom 5 mit eingebauter Punktmutation führte.

PCR 1: DNA-Matrize (GI-prom 1 oder GI-prom 5)

Amplifikations-Oligonukleotid 1 für GI-prom 1 (pGLfor1):

CCA CTG AAT TGG AAT CAC TGG AGG

bzw. Amplifikations-Oligonukleotid 1 für GI-prom 5 (pGLfor5):

GAC CTT TAG GGT ACC GGT TTC CTG T

und Mutagenese-Oligonukleotid 1 (GI-prom mut TBE rev):

AAT GGA GCT GTG AGC ATC CCC AGG A

PCR 2: DNA-Matrize (GI-prom 5)

Mutagenese-Oligonukleotid 2 (GI-prom mut TBE fwd):

GGA TGC TCA CAG CTC CAT TGT TAG A

und Amplifikations-Oligonukleotid 2 (pGLrev):

TTG GCA ATG AAA CGC GTG GTG AAG C

PCR 3: DNA-Matrize (PCR-Produkt 1 je für GI-prom 1 und GI-prom 5 und PCR-Produkt 2)

Oligonukleotide: Amplifikations-Oligonukleotid 1 und Amplifikations-Oligonukleotid 2

### 2.4.4 Agarosegelelektrophorese und Aufreinigung von PCR-Produkten

Mittels Agarosegelelektrophorese können PCR-Produkte nach ihrer Größe aufgetrennt werden. In Abhängigkeit von der Produktgröße wurden 1-2%ige (w/v) Agarosegele hergestellt, indem die Agarose (Sigma) in TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA (0,5 M, pH 8,0)) gelöst und nach dem Aufkochen in eine Gelkammer (Biometra) gegossen wurde. Zu jedem 25 µl-PCR-Ansatz wurden 3 µl 10 x Ladepuffer (20 % Ficoll 400 (w/v) in 0,1 M EDTA, pH 8, 1 % SDS (w/v), 0,025 % Bromphenolblau (w/v)) gegeben und 10 µl auf das Gel aufgetragen. Als Marker für den Größenvergleich wurden 2 µl eines 100 bp DNA-Längen-Standards aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V und maximaler Stromstärke (Spannungsquelle: Power Pack 25, Biometra) in TBE-Puffer. Zur Sichtbarmachung der DNA wurde das Gel anschließend mit Ethidiumbromid (5 µg/ml in TBE-Puffer) gefärbt und an einem Gel Doc™ 2000 System (Biorad, München) ausgewertet.

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das Produkt der gewünschten Größe aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Invisorb *Spin DNA Extraction* Kit (Invitex, Berlin) extrahiert.

### 2.4.5 TA-Klonierung und Ligation

Bei der PCR mit Taq-Polymerasen entstehen Fragmente mit unspezifischem 3'-desoxy-Adenosin-Überhang, die genutzt werden, um diese in einen linearisierten Vektor mit komplementärem 3'-desoxy-Thymidin-Überhang zu klonieren. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde entsprechend den Angaben des Herstellers (Invitrogen) unter Verwendung des TOPO TA-Cloning®-Kits in den pCR-II-Topo kloniert und in *E.coli* transformiert. Die sich anschließende Umklonierung in den Vektor pGL3-basic setzte voraus, dass sowohl die mittels Plasmidisolierung gewonnenen pCR-II-Topo-Plasmide, die das *Insert* enthalten, als auch der

leere pGL3-basic mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten werden. Dies geschah für 2 h bei 37°C in einem 50 µl-Ansatz, der die Restriktionsenzyme Kpn I und Mlu I (NEB) enthielt. Nach erneuter Aufreinigung der geschnittenen Fragmente erfolgte die Ligation mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase (NEB, Frankfurt) für 12 h bei 16°C mit anschließender Hitzeinaktivierung der Ligase in einem 15 µl-Ansatz. Um eine effektive Ligation zu erreichen, wurden Vektor- und Insert-DNA im Verhältnis von 1 : 5 eingesetzt.

### **2.4.6 Transformation von *E.coli***

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden Top 10 *E.coli* (Invitrogen) verwendet, die mittels CaCl<sub>2</sub> kompetent gemacht wurden. 250 ml einer *E.coli*-Übernachtskultur mit einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 wurden nach dem Abzentrifugieren bei 5.000 x g und 4°C in 30 ml CaCl<sub>2</sub> (100 mM) aufgenommen, 30 min auf Eis inkubiert und dann erneut abzentrifugiert. Zum Einfrieren der Bakterien wurden diese in 5 ml CaCl<sub>2</sub> und 15 % (v/v) Glycerin aufgenommen, in 50-100 µl Portionen aliquotiert und bei -80°C gelagert. Für die Transformation wurden 50 µl Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut und mit 5-10 µl des Plasmid- bzw. Ligationsansatzes 15 min auf Eis inkubiert. Die DNA-Aufnahme wurde durch einen Hitzeschock für 30 sec bei 42°C gestoppt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium (2 % Trypton (w/v), 0,5 % Hefeextrakt (w/v), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glucose, pH 7,4) und einer einstündigen Inkubation bei 37°C und horizontaler Rotation (200 rpm) wurden die Bakterien auf S1-Agarplatten auf Basis von S1-Nähragar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Agarplatten enthielten je nach Resistenz Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (100 µg/ml). Im Falle einer „Blau-Weiss-Selektion“, basierend auf der Umsetzung von X-Gal durch das Enzym β-Galaktosidase, wurden die Agarplatten zuvor noch mit je 70 µl X-Gal (40 mg/ml in DMF; Roth, Karlsruhe) bestrichen. Die entstandenen Kolonien wurden in einer erneuten Übernachtskultur vermehrt, nach der Plasmidisolierung mittels Restriktionsverdau überprüft und anschließend in S1-Medium auf Basis von S1-Nährbouillon mit 5 % DMSO bei -80°C gelagert.

### **2.5 RNA-Isolierung aus Zellen**

48 h nach der Aussaat von 1 x 10<sup>5</sup> Zellen in 24-Loch-Platten wurden diese in 266 µl Trizol/Loch geerntet und je drei gleichbehandelte Löcher vereint, um daraus RNA nach der Trizol-Methode (siehe 2.1.2) zu isolieren. Nach dem Aufnehmen des RNA-Pellets in DEPC-Wasser wurden die Proben mit jeweils 10 U RQ1 DNase (Promega) für 30 min bei 37°C behandelt und einer Phenol-Chloroform-Fällung mit anschließender Ethanol-fällung unterzogen. Die RNA-Konzentration wurde mittels Nanodrop 1000 (Peqlab Biotechnologie GmbH) bestimmt. Die Proben wurden standardmäßig auf genomische Kontaminationen hin untersucht,

indem eine PCR mit Oligonukleotiden durchgeführt wurde, die entweder innerhalb eines Introns oder in der 3'UTR lagen.

### **2.6 RNA-Gel**

Die Qualität der isolierten RNA wurde mittels RNA-Gelelektrophorese überprüft. Für das RNA-Mini-Gel (1,2 %) wurden 0,72 g RNase freie Agarose mit 51 ml sterilem reist Wasser aufgeköcht, auf 70 °C abgekühlt und mit 6 ml 10 x MOPS-Puffer (400 mM MPS, 100 mM Natriumacetat, 10 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 7,2) und 3,3 ml Formaldehyd (37 %) versetzt. 3 µg RNA wurden im Vakuumkonzentrator eingengt und in 20 µl Ladepuffer (7,2 ml deionisiertes Formamid, 1,6 ml 10 x MOPS-Puffer, 2,6 ml Formaldehyd (37 %), 1,8 ml DEPC-Wasser (0,05 % (v/v)), 1 ml RNase-freies Glycerin, 0,8 ml Bromphenolblau) resuspendiert, der 10 µg/ml Ethidiumbromid enthält. Das anschließende Erhitzen auf 95 °C für fünf Minuten diente der Denaturierung der RNA. Es wurden je 10 µl Probe auf das Gel aufgetragen und bei 80 V ca. zwei Stunden in 10 x MOPS-Laufpuffer laufen gelassen. Die RNA wurde durch das interkalierte Ethidiumbromid unter UV-Licht bei 302 nm sichtbar gemacht.

### **2.7 Proteinbestimmung nach Bradford**

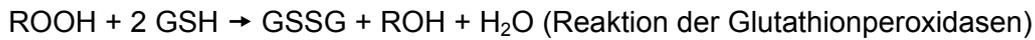
Der Proteingehalt der eingesetzten Zellysate wurde in einer 96-Loch-Platte nach der von Bradford beschriebenen Methode bei einer Wellenlänge von 630 nm im Plattenphotometer MR5000 bestimmt [155]. Der verwendete Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G 250 verschiebt sein Extinktionsmaximums von 465 nm nach 595 nm, wenn er an saure und basische Aminosäuren in Proteinen bindet. Von den verdünnten Proben wurden 10 µl mit je 200 µl Bradford-Färbelösung (1 : 5 verdünnt, BioRad) versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Zur Quantifizierung diente eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen von bovinem Serumalbumin (BSA, Protein Assay Standard II, BioRad) zwischen 20 und 300 µg/ml, die in H<sub>2</sub>O gelöst vorlagen.

### **2.8 Messung von Enzymaktivitäten**

Um Lysate für die Messung von Enzymaktivitäten herzustellen, wurde zunächst ein homogenes Organpulver durch Mörsern unter flüssigem Stickstoff hergestellt. 20 mg dieses Organpulvers wurden in 500 µl Homogenisationspuffer aufgenommen, der 4 µl Proteaseinhibitorcocktail (Calbiochem, Bad Soden) enthält. Die vollständige Lyse wurde durch eine 2 x 2 minütige Behandlung im Tissuelyser (Qiagen) bei 30 Hz erreicht. Dazwischen wurde die Probe auf Eis abgekühlt, um eine Erwärmung zu vermeiden. Anschließend wurden die Proben bei 20.000 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Für die Aktivitätsmessungen wurden die Colonlysate 1 : 10, die Leberlysate 1 : 50 mit Homogenisationspuffer (100 mM Tris/HCl, 300 mM KCl, 0,1% Triton X-100, pH 7,6) verdünnt.

### 2.8.1 Glutathionperoxidase-Aktivität

Die GPx-Aktivität wurde mittels eines Glutathionreduktase-gekoppelten Tests bestimmt. Diesem liegen folgende Reaktionen zugrunde:



890  $\mu\text{l}$  des Reaktionsmixes (100 mM Tris/HCl (pH 7,6), 5 mM EDTA, 1 mM  $\text{NaN}_3$ , 3 mM GSH, 0,1 mM NADPH, 0,1 % Triton X-100, 600 mU Glutathionreduktase (Sigma)) wurden mit 100  $\mu\text{l}$  Probe für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (finale Konzentration: 50  $\mu\text{M}$ ) gestartet, das unspezifisch als Substrat für alle Glutathionperoxidasen dient. Der NADPH-Verbrauch wurde für 5 min bei 340 nm am Photometer (DYNATECH MR5000, Denkendorf) gemessen und  $\Delta E/\text{min}$  für die Berechnung der Enzymaktivität in mU/mg Protein nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ( $\epsilon_{[\text{NADPH}]}$ : 6,3  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) herangezogen.

### 2.8.2 Thioredoxinreduktase-Aktivität

Unter Verbrauch von NADPH katalysieren Thioredoxinreduktasen die Umwandlung von 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) zu 5'-Thionitrobenzoesäure (TNB), die für die Aktivitätsbestimmung von Thioredoxinreduktasen genutzt wird [156]. Dazu wurden 100  $\mu\text{l}$  des verdünnten Organlysats mit 820  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer (100 mM Kaliumphosphat, 2 mM EDTA, pH 7,4) und 30  $\mu\text{l}$  DTNB (100 mM in DMSO) in einer Küvette gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  NADPH (4 mM in Reaktionspuffer) gestartet. Um eine TrxR-unabhängige, unspezifische Umwandlung von DTNB zu TNB von der spezifischen Reaktion subtrahieren zu können, wurden alle Proben auch ohne Zugabe von NADPH gemessen. Die Änderung der Absorption durch das entstandene TNB wurde bei 412 nm über einen Zeitraum von 2 min ermittelt. Über die Zunahme der Absorption pro min wurde mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes ( $\epsilon_{[\text{TNB}]}$ : 13,6  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) die Aktivität der Thioredoxinreduktase in mU/mg Protein berechnet.

## 2.9 Gewinnung von Kernlysaten

Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen abgeschabt und mit 2 x 5 ml PBS in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 250 x g und 4°C wurde das Pellet in 400  $\mu\text{l}$  hypotonischem Homogenisationspuffer (20 mM Hepes, 1 mM EDTA, 1  $\mu\text{l}/\text{ml}$  Protease-Inhibitor Cocktail Set III (Merck, Darmstadt), 50  $\mu\text{l}$   $\text{Na}_4\text{VO}_3$ , pH 7,5) resuspendiert und mittels eines Potter-S-Homogenisators (B. Braun Biotech International, Melsungen) auf Eis homogenisiert (50 x). Eine erneute Zentrifugation für 30 min bei 720 x g und 4°C führte zur Trennung des Cytosols von den Kernen, die als Pellet vorlagen. Dieses

Pellet wurde erneut in 200 µl Homogenisationspuffer aufgenommen, mit 20 Stößen Ultraschall bei einer Amplitude von 80 % und einer Frequenz von 0,5 sec behandelt (Ultraschallprozessor UP 50 H, Dr. Hielscher GmbH, Teltow) und 30 min bei 720 x g und 4°C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde dann als Kernextrakt verwendet.

## 2.10 SDS-PAGE und Western Blot

Der Western Blot ist eine immunologische Methode, bei der mit Hilfe von spezifischen Antikörpern die Expression einzelner Proteine untersucht werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die GPx2- und  $\beta$ -Catenin-Expression in Gesamtzelllysaten untersucht, die mittels RIPA-Lysepuffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,1 % SDS, 0,5 % N-Desoxycholat, 1 % Nonidet-P40, pH 7,8) gewonnen wurden. Dazu wurden zum einen  $1 \times 10^6$  Zellen/Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät und nach 72 h geerntet. Zum anderen wurden HepG2-Zellen mit 0,4 µg Expressionsplasmid nach dem Lipofectamine-Protokoll transient transfiziert. Dazu wurden 24 h vor der Transfektion  $1 \times 10^5$  Zellen in 24-Loch-Platten ausgesät. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen in 40 µl RIPA-Puffer/Loch geerntet und je drei gleichbehandelte Löcher vereint. Die Expression von GPx2 und  $\beta$ -Catenin im Gesamtlysat wurde auf  $\beta$ -Actin normalisiert. Des Weiteren wurde die Lokalisation von  $\beta$ -Catenin im Kern untersucht, wozu Proben, wie unter 2.8 beschrieben, hergestellt wurden. In diesem Fall wurden die Banden auf die Gelfärbung mit Coomassie-Brillant-Blue normalisiert.

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer molaren Masse. Dazu wurden gleiche Mengen der zu vergleichenden Proben nach einer Denaturierung für 5 min bei 95°C in 1x reduzierendem Lämmli-Puffer (62,5 mM Tris (pH 6,8), 2 % SDS, 2,5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol, 10 % Glycerin, 1,25 % Bromphenolblau) auf 10%ige SDS-Polyacrylamid-Gele (Tab. 5) in einer Minigelapparatur (Biometra) geladen.

**Tab. 5. Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel**

Sammelgel (5,5%)		Trenngel (10%)	
H <sub>2</sub> O	1,53 ml	H <sub>2</sub> O	2,82 ml
AA (29:1) 40 %	319 µl	AA (29:1) 40 %	1,5 ml
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	625 µl	Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	1,5 ml
SDS 10 %	25 µl	SDS 10 %	60 µl
APS 10 %	25 µl	APS 10 %	60 µl
TEMED 10 %	25 µl	TEMED 10 %	60 µl

Die Auftrennung erfolgte bei einer Stromstärke von 15 mA pro Gel in 1 x Elektrophoresepuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 3,4 mM SDS, pH 8,5). Um eine schärfere Bandentrennung zu erreichen, wurden die Proben zunächst mittels eines 5,5%igen Sammelgels fokussiert.

Zur Größenbestimmung wurde ein Marker (BioRad) mit Proteinen bekannter Größe mitgeführt.

Die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schüll, Dassel) erfolgte im *semi-dry*-Verfahren mit einer HoeferRSemiPhor™ Blotapparatur (Amersham Biosciences, Freiburg). Dazu wurden sowohl das Gel als auch die Membran und mehrere Filter in Blotpuffer (25 mM Tris, 100 mM Glycin, 15 % Methanol, pH 8,3) getränkt und anschließend für 2 h bei 4°C einer Stromstärke von 1,2 mA/cm<sup>2</sup> ausgesetzt. Die Transfereffizienz konnte durch reversibles Anfärben der Blotmembran mit einer Ponceau-S-Lösung (0,1 % Ponceau S (Sigma), 5 % Essigsäure) überprüft werden. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde die Membran dann für mindestens 1 h in 5%iger Magermilchlösung in Tris-gepufferter Kochsalzlösung mit Tween 20 (TTBS; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20, pH 7,5) blockiert und vor der Zugabe des Primärantikörpers, verdünnt in TTBS, mehrfach in TTBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C unter Einsatz der folgenden Verdünnungen: Kaninchen-anti-Human GPx2 Antiserum (GBF, Braunschweig; Böcher et al., 1997) 1 : 5.000, Maus-anti-Human  $\beta$ -Catenin Antiserum (BD Biosciences) 1 : 3.000 und Kaninchen-anti-Human  $\beta$ -Actin Antiserum (Biozol, Eching) 1 : 5.000.

Nach erneutem Waschen wurde die Membran mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper in TTBS für 1 h bei RT inkubiert. Dabei handelte es sich um die folgenden Sekundärantikörper: Ziege-anti-Kaninchen-IgG-POD (Chemicon, Hofheim) 1 : 50.000 und Ziege-anti-Maus-IgG-POD (Chemicon) 1 : 5.000.

Nach dem gleichmäßigen Überschichten der Membran mit dem Luminol-haltigen Detektionsreagenz Supersignal West Dura (Perbio, Bonn) erfolgte die Visualisierung der Immunreaktion mittels Chemilumineszenz an einem Fuji LAS3000-CCD-Kamerasystem. Mit Hilfe der Software Aida/2D Densitometry 4.0 (Raytest, Straubenhardt) wurden die Proteinbanden ausgewertet. Als Kontrolle wurde die Membran nach der Detektion mit Fast Green (0,1 % Fast Green (Sigma), 10 % Essigsäure, 30 % Ethanol) angefärbt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen. Auch das Gel wurde nach dem Blotten mit Coomassie-Brilliant-Blue (1 g Coomassie-Brilliant-Blue (Serva, Heidelberg), 425 ml Ethanol, 50 ml Methanol, 100 ml Essigsäure (96 %) in 425 ml H<sub>2</sub>O) angefärbt und anschließend fixiert (7 % Essigsäure, 10 % Methanol). Um mehrere Antikörper auf einer Membran einsetzen zu können, wurden diese für 30 min mit Stripp-Puffer Restore™ Western Blot (Perbio, Bonn) behandelt, erneut 1 h in 5 % Magermilchlösung blockiert und anschließend erneut mit Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert.

### 2.11 Bestimmung des Selengehalts in organischen Materialien

Um den Selengehalt des Futters und des Plasmas fluorimetrisch messen zu können [157, 158], musste zunächst das Selen (Se) aus allen anorganischen und organischen Verbindungen gelöst werden. Dazu wurden 60-80 mg Futter bzw. 30 µl Plasma mit 100 µl Wasser verdünnt und mit 500 µl Säuremix (HNO<sub>3</sub>/HClO<sub>4</sub>, 4 : 1, v/v) für 30 min bei 100°C, 30 min bei 120°C und 120 min bei 190°C in einem Thermostat VLM 4.0 Heizblock (VLM GmbH, Leopoldshöhe, D) inkubiert. Selen wurde freigesetzt und durch das Salpetersäure/Perchlorsäure-Gemisch zu Se (VI) oxidiert. Während der ersten beiden Heizschritte wurden die Probengefäße zweimal geöffnet, um entstandene Gase verdampfen zu lassen. Nachdem die Proben über Nacht auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden sie nach Zugabe von 500 µl HCl (37 %) für 15 min auf 90°C und für 45 min auf 150°C erhitzt. Dadurch wurde das freigesetzte Se (VI) zu Se (IV) reduziert. Nach erneutem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 2 ml EDTA (2,5 mM, pH 8,0) und 500 µl 2,3-Diaminonaphthalen (DAN; 6,3 mM in 0,1 M HCl) zugegeben und für 30 min bei 55°C inkubiert. Dies ermöglichte die Komplexbildung zwischen Se und DAN. Abschließend wurden die Proben mit Cyclohexan extrahiert und 24 h später analysiert. Die Fluoreszenz wurde in einem AB2 Lumineszenzspektrometer (SLM-AMINCO®) bei 346 nm Anregung und 520 nm Emission gemessen. Zur Quantifizierung wurde eine Standardgerade ausgehend von einer Atomabsorptionsspektroskopie-Selen-Standardlösung (Sigma-Aldrich, Steinheim) mit Konzentrationen zwischen 0 und 450 µg Selen/l mitgeführt.

### 2.12 Statistik

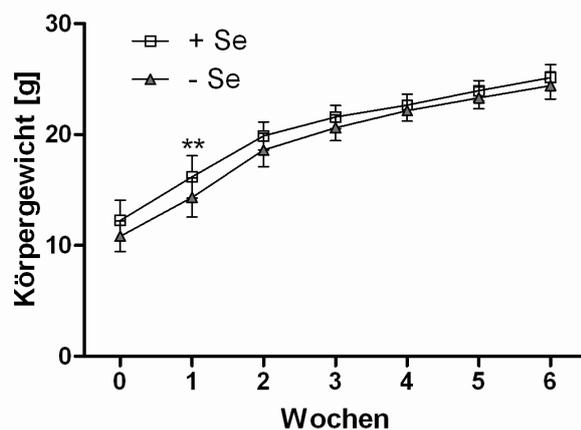
Alle Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Anschließend wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Bei paarweisen Vergleichen wurden die Signifikanzen mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's T-Test ermittelt. Wurden mehr als zwei Gruppen mit nur einem Untersuchungsparameter verglichen, wurde die Statistik mittels einseitigem ANOVA untersucht. Bei mehr als zwei Gruppen und mehreren Untersuchungsparametern kam der zweiseitige ANOVA-Test mit anschließendem Bonferroni Post-Test zum Einsatz. Alle Tests wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism Version 5 (La Jolla, USA) durchgeführt, wobei das Signifikanzniveau bei < 5 % lag.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Ergebnisse der Microarray-Analyse

##### 3.1.1 Charakterisierung der Mäuse

Je zwölf Mäuse erhielten für die Versuchsdauer von sechs Wochen entweder eine selenarme oder eine selenadäquate Diät, die ihnen in Form von Pulver ad libitum zur Verfügung stand. Das Alter der Tiere betrug zu Versuchsbeginn 3-4 Wochen, was dem Zeitpunkt des Absetzens entsprach. Der Gewichtsverlauf zeigt, dass es in der ersten Woche einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Fütterungsgruppen gab. Dieser war allerdings bereits ab der zweiten Fütterungswoche nicht mehr existent. Während der letzten fünf Wochen der Fütterungsperiode wurde die Gewichtsentwicklung der Mäuse nicht durch den Selengehalt des Futters beeinflusst (Abb. 3). Auch die täglich verzehrte Futtermenge pro Maus blieb über den genannten Zeitraum konstant bei durchschnittlich 4 g pro Tag.



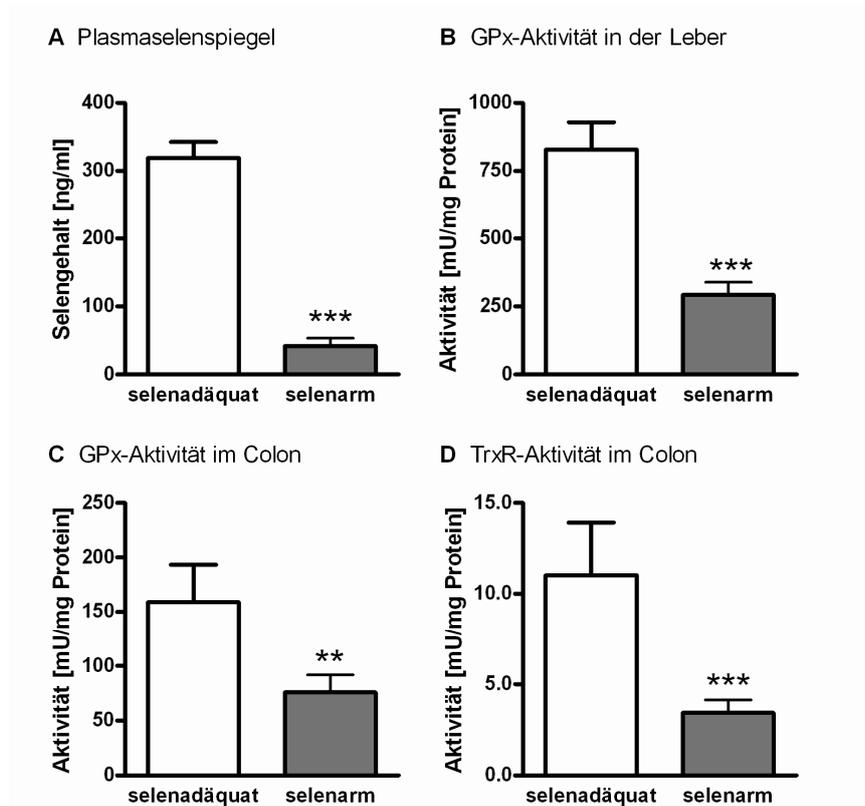
**Abb. 3. Gewichtsentwicklung der Mäuse**

12 Tiere pro Gruppe wurden für sechs Wochen mit einer selenarmen oder selenadäquaten Diät gefüttert. Ihr Gewicht wurde wöchentlich ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \*\*  $p < 0,01$  versus selenarm mittels zweiseitigem ANOVA.

Das selenarme Futter muss mit einem Selengehalt von 0,086 mg/kg als marginal defizient und nicht als extrem selenarm eingestuft werden. Der Vergleich mit dem selenadäquaten Futter, das mit 0,15 mg/kg der RDA für Mäuse entspricht [159], zeigt, dass es sich hier nicht einmal um eine Verdopplung des Selengehalts handelt. Physiologisch scheint dieser Unterschied in der Selenzufuhr aber von großer Bedeutung zu sein, da die Fütterung einen deutlichen Effekt auf den Plasmaselenpiegel hat. Die Intervention durch die selenarme Diät führte zu einer Reduktion des Plasmaselenpiegels auf 13 % im Vergleich zur selenadäquaten Fütterung (Abb. 4 A).

Die deutlichen Unterschiede im Plasmaselenpiegel hatten auch Auswirkungen auf die Aktivität der Glutathionperoxidasen und der Thioredoxinreduktasen. Vor allem die GPx-Aktivität in der Leber, die in Nagern fast ausschließlich aus der Aktivität der GPx1 besteht, war durch den marginalen Selenmangel beeinträchtigt und wurde durch die selendefiziente Diät auf 35 % gesenkt (Abb. 4 B). Des Weiteren wurde die Aktivität der genannten Selenoproteine im

Colon untersucht, um zu zeigen, dass auch in dem Organ, das für die Microarray-Analysen herangezogen wurde, ein Fütterungseffekt zu sehen ist. Die GPx-Aktivität, die im Colon insgesamt deutlich niedriger als in der Leber ausfiel und sich hier aus GPx1- und GPx2-Aktivität zusammensetzt, wurde durch die selenarme Fütterung auf 47 % reduziert (Abb. 4 C), während die TrxR-Aktivität auf 31 % absank (Abb. 4 D).



**Abb. 4. Einfluss der Selenfütterung auf Plasmaselenspiegel, GPx- und TrxR-Aktivitäten**

(A) Der Selengehalt im Plasma wurde fluorimetrisch bestimmt. In Leberlysaten (B) und Colonlysaten (C) wurden die GPx-Aktivitäten mit  $H_2O_2$  als Substrat gemessen. Für die TrxR-Aktivitätsmessung im Colon wurde DTNB als Substrat verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 12 (im Falle der Selenmessung) bzw. 5 Tieren pro Gruppe. \*\*  $p < 0,01$  und \*\*\*  $p < 0,001$  versus selenadäquate Fütterung mittels Student's T-Test.

### 3.1.2 Microarray-Analyse

Insgesamt ergab die Hybridisierung der RNA-Proben aus dem Colon der zwölf selenarmen und zwölf selenadäquaten Tiere mit je einem *Whole Genome Oligo 44K* Microarray 21.008 Transkripte, die zweifach über dem Hintergrund lagen und somit als exprimiert galten. Auf der Basis des FDR-Kriteriums  $< 5\%$  waren davon 952 Gene durch die Intervention mit der selenarmen Diät reguliert (722 herunter und 230 herauf). Die Zugrundelegung eines  $p$ -Wertes  $< 5\%$  ergab hingegen 3.995 regulierte Gene (1.979 herunter und 2.016 herauf). Unter den ersten 20 auf der Liste der signifikant regulierten Gene war Selenoprotein W das

einziges Selenoprotein und stand an zweiter Stelle. Alle 24 Microarrays wurden einer Qualitätskontrolle unterzogen, konnten die vorgegebenen Kriterien erfüllen und so für die Analyse herangezogen werden.

### 3.1.3 Beeinflussung der Selenoproteinexpression auf mRNA-Ebene

Es ist bekannt, dass Selen einen Einfluss auf die Translation von Selenoproteinen hat. Außerdem kann Selen post-transkriptionell die mRNA-Stabilität beeinflussen. Selenoproteine, die schnell auf Schwankungen des zur Verfügung stehenden Selens reagieren, stehen zwar niedrig in der Hierarchie, können aber als mögliche Biomarker für eine suboptimale Selenversorgung herangezogen werden. Von den 24 Genen für Selenoproteine in der Maus wurden 20 mittels qPCR im Colon untersucht und mit den Daten der Microarrayanalyse verglichen. Deiodinase 2 und 3 sowie Selenoprotein N und V waren sowohl in der selenarmen als auch in der selenadäquaten Gruppe nicht exprimiert.

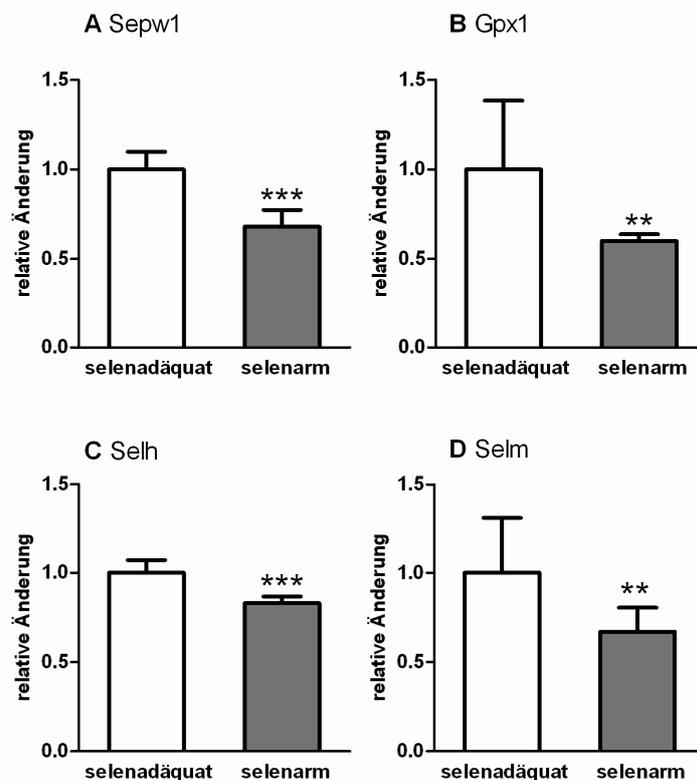
**Tab. 6. Vergleich der Microarray- und qPCR-Daten zur Selenoproteinexpression**

Die Selen-adäquate Fütterungsgruppe wurde auf 1 gesetzt, um die Änderung durch die Intervention Selenmangel darstellen zu können. Die p-Werte < 5 % gelten als signifikant und sind fett gedruckt.

Name	Agilent-ID	Beschreibung	Microarray		qPCR	
			p-Wert	Änderung	p-Wert	Änderung
<b>Sepw1</b>	A_51_P474078	Selenoprotein W	<b>2,9 x 10<sup>-8</sup></b>	0,58	<b>1,9 x 10<sup>-13</sup></b>	0,42
<b>Gpx1</b>	A_52_P684378	Glutathionperoxidase 1	<b>0,0008</b>	0,49	<b>2,6 x 10<sup>-20</sup></b>	0,45
<b>Selh</b> (2700094K13Rik)	A_52_P396774	Selenoprotein H	<b>0,0011</b>	0,68	<b>2,9 x 10<sup>-12</sup></b>	0,32
<b>Selm</b>	A_52_P357133	Selenoprotein M	<b>0,027</b>	0,81	<b>1,9 x 10<sup>-10</sup></b>	0,44
<b>Gpx2</b>	A_51_P486810	Glutathionperoxidase 2	0,065	0,67	0,15	0,89
<b>Gpx3</b>	A_51_P292008	Glutathionperoxidase 3	0,13	0,92	<b>0,0035</b>	0,72
<b>Sep15</b>	A_51_P111143	15 kDa Selenoprotein	0,20	0,89	<b>0,0028</b>	0,85
<b>Sephs2</b>	A_51_P418765	Selenophosphatsynthetase 2	0,21	0,83	0,37	0,91
<b>Selk</b>	A_51_P290170	Selenoprotein K	0,30	1,18	<b>0,027</b>	0,84
<b>Txnrd2</b>	A_52_P394561	Thioredoxinreduktase 2	0,31	0,93	<b>0,013</b>	1,12
<b>Sels</b> (H47)	A_51_P323610	Selenoprotein S (VIMP)	0,32	0,90	<b>0,0005</b>	0,55
<b>Sepp1</b>	A_51_P470328	Selenoprotein P	0,33	0,90	0,75	1,03
<b>Seli</b> (D5Wsu178e)	A_52_P228171	Selenoprotein I	0,45	1,05	0,39	0,93
<b>Dio1</b>	A_51_P403477	Dejodinase 1	0,46	0,92	0,12	0,87
<b>Sepx1</b>	A_51_P393634	Selenoprotein X oder R	0,52	0,95	0,52	1,04
<b>Selo</b> (1300018J18Rik)	A_51_P340947	Selenoprotein O	0,53	0,96	0,30	1,08
<b>Txnrd1</b>	A_51_P320614	Thioredoxinreduktase 1	0,57	0,94	<b>0,0006</b>	0,65
<b>Gpx4</b>	A_51_P462448	Glutathionperoxidase 4	0,63	1,04	0,71	0,98
<b>Txnrd3</b>	A_51_P450365	Thioredoxinreduktase 3	0,74	1,02	<b>3,6 x 10<sup>-6</sup></b>	1,25
<b>Selt</b> (2810407C02Rik)	A_52_P445969	Selenoprotein T	0,98	1,00	<b>0,03</b>	0,87

Basierend auf den Daten der Microarrayanalyse waren Sepw1, Gpx1, Selh und Selm mit einem p-Wert von  $< 5\%$  signifikant im Selenmangel vermindert. Dies konnte mittels qPCR bestätigt werden. Die größte relative Expressionsänderung in der qPCR zeigte Selh mit einer Reduktion im Selenmangel auf 32 %. Zusätzlich wurden mittels qPCR noch folgende Selenoproteine als im Selenmangel herunterreguliert identifiziert: Gpx3, Selk, Sels, Txnrd1, Selt und Sep15. Die Expression von Gpx2, Sephs2, Sepp1, Dio1, Seli, Sepx1, Selo und Gpx4 war nicht durch die hier gewählte Veränderung im Selenstatus beeinflussbar. Die mRNA der Txnrd2 und Txnrd3 war laut qPCR-Analyse im Selenmangel signifikant höher als im selenadäquaten Status (Tab. 6).

Da Schwankungen in der Selenversorgung unterschiedlich starke Auswirkungen auf verschiedene Organe haben, wurde die Expression von Sepw1, Gpx1, Selh und Selm auch in Leukozyten, die aus der Milz isoliert wurden, untersucht (Abb. 5).



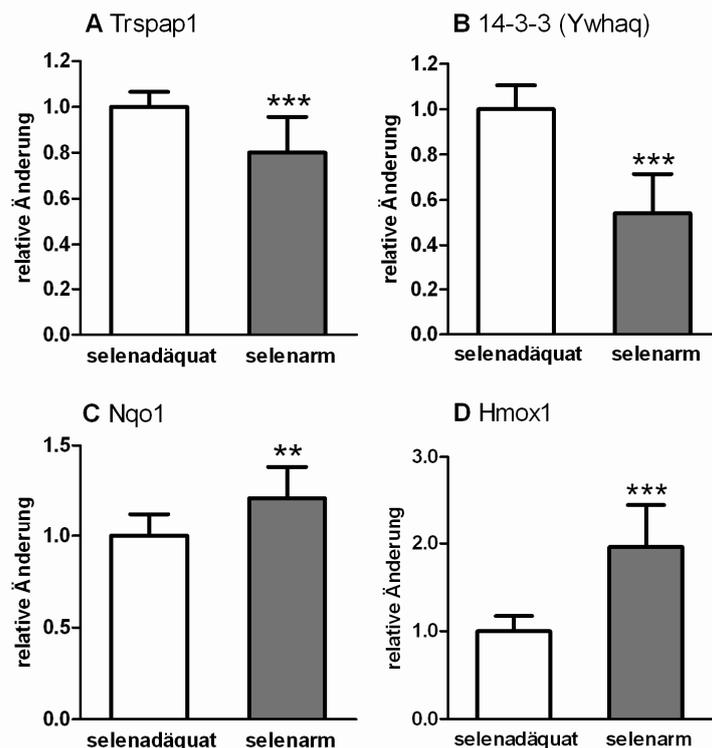
**Abb. 5. Relative mRNA-Expression in Leukozyten von Sepw1, Gpx1, Selh und Selm in Abhängigkeit von Selen**

Die mRNA aus Milz-Leukozyten selenarm und selenadäquat gefütterter Mäuse wurde revers transkribiert und mittels qPCR auf die Expression von (A) Sepw1, (B) Gpx1, (C) Selh und (D) Selm hin analysiert. Die Rohdaten wurden auf einen Normalisierungsfaktor, bestehend aus dem Mittelwert der Referenzgene Hprt und Rpl13a, bezogen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 12 Tieren pro Gruppe. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  versus selenadäquate Fütterung mittels Student's T-Test.

Dies war wichtig, um ihre Eignung als Biomarker für humane Proben zu bestätigen, da bei humanen Studien in der Regel nur Blut- und Plasmaproben zur Verfügung stehen. Insgesamt waren die relativen Änderungen in den Leukozyten kleiner als im Colon. Dennoch reagierten alle vier Selenoproteine mit einer signifikanten Reduktion ihrer Expression auf einen Selenmangel. Sowohl im Skelett- als auch im Herzmuskel, wo Sepw1 zuerst beschrieben wurde, führte die Fütterung der marginal defizienten Diät zu einer Verringerung der Sepw1-Expression um 70 % (Daten nicht gezeigt).

### 3.1.4 Expression von Nicht-Selenoproteinen und Analyse der regulierten Signalwege im Colon

Zunächst wurden die Microarraydaten auf Expressionsänderungen bei Genen untersucht, die mit Selenoproteinen interagieren oder an ihrer Synthese beteiligt sind. Allerdings waren Gene der Selenoproteinsynthese durch Selen nahezu unbeeinflusst. Laut Microarray waren nur Trspap1 (= Secp43) und Eefsec durch Selen signifikant reguliert.



**Abb. 6. Relative mRNA-Expression von Trspap1, Ywhaq, Nqo1 und HO-1 in Abhängigkeit von Selen**

Die mRNA aus dem Colon selenarm und selenadäquat gefütterter Mäuse wurde revers transkribiert und mittels qPCR auf die Expression von (A) Trspap1, (B) Ywhaq, (C) Nqo1 und (D) Hmox1 hin analysiert. Die Rohdaten wurden auf einen Normalisierungsfaktor, bestehend aus dem Mittelwert der Referenzgene Hprt und Rpl13a, bezogen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 12 Tieren pro Gruppe. \*\*\* p < 0,001 versus selenadäquate Fütterung mittels Student's T-Test.

Trspap1 hatte eine durch Selenmangel hervorgerufene relative Änderung von 0,84 und Eef-sec von 1,13. Die Expressionsänderung von Trspap1 konnte mittels qPCR bestätigt werden (Abb. 6 A). Ywhaq, ein Mitglied der 14-3-3-Proteinfamilie, ist ein Bindungspartner für SelW. Die Expression einiger Mitglieder dieser Familie war laut Microarray im Selenmangel signifikant reduziert. Dies konnte für Ywhaq mittels qPCR bestätigt werden (Abb. 6 B). Außerdem wurde die Expression der Nrf2-Zielgene NADPH-Quinonoxidoreduktase 1 (Nqo1) und der Hämoxygenase 1 (Hmox1) untersucht. Es konnte eine signifikante Expressionssteigerung beider Nrf2-Zielgene im Selenmangel beobachtet werden (Abb. 6 C und D).

Um durch Selen regulierte Signalwege zu identifizieren, wurde das Programm GenMAPP herangezogen. Das zugrunde liegende Datenset enthielt 41.441 Oligonukleotide, von denen 28.208 durch Uniprot- bzw. Ensembl-IDs annotiert werden konnten, um sie für das Programm verfügbar zu machen. Daraus ergaben sich wiederum 6.536 Gene, die mit mindestens einem der murinen Signalwege in GenMAPP, basierend auf verschiedenen Datenbanken (COREG, Reactome, Biocarta und Netpath), vernetzt waren. Auf der Basis einer relativen Expressionsänderung mit einem Betrag von  $\geq 1,2$  und einem p-Wert  $\leq 5\%$  wurden 2.294 Gene als reguliert betrachtet. Grundlage für die Berechnung des „Z-Scores“ bildeten diese regulierten Gene (siehe 2.1.3). Der „Z-Score“ bedeutet, dass mehr Gene das Kriterium erfüllen, als per Zufall zu erwarten wäre. Deshalb wurde er herangezogen, um zu bestimmen, ob ein Signalweg signifikant durch Selen beeinflusst war oder nicht.

Unter den ersten 15 Signalwegen waren fünf enthalten, die sich mit Proteinbiosynthese assoziieren ließen (*translation factors*, *mRNA processing/binding*, *regulation of eIF4e-and-p70-S6-Kinase*, *mTOR signalling pathway* und *ribosomal proteins*). Außerdem waren Entzündungssignalwege (TNF $\alpha$ -NF $\kappa$ B, IL-2, IL-3) durch Selen beeinflusst. Der Delta-Notch und der Wnt-Signalweg, der sich nicht unter den ersten 15 Signalwegen befand, aber dennoch signifikant durch Selen beeinflusst war, ließen sich dem Thema Kanzerogenese zuordnen (Tab. 7). Da der Zusammenhang zwischen Selen und Kanzerogenese für diese Arbeit von besonderem Interesse war, wurde der Wnt-Signalweg im Folgenden weiter untersucht.

**Tab. 7. Liste der durch Selen beeinflussten Signalwege**Zugrunde liegende Datenbanken: <sup>1</sup>COREG, <sup>2</sup>Reactome, <sup>3</sup>Biocarta, <sup>4</sup>Netpath

MAPP Name	herauf	herunter	Z-Score
Mm_Translation_Factors <sup>1</sup>	86	55	8,63
Mm_mRNA_processing_binding <sup>2</sup>	217	104	8,23
Mm_mTOR-Signaling-Pathway <sup>3</sup>	55	44	8,23
Mm_TNF-alpha-NF-kB <sup>4</sup>	165	88	8,06
Mm_Regulation-of-eIF4e-and-p70-S6-Kinase <sup>3</sup>	56	39	7,95
Mm_Ribosomal_Proteins	6	27	7,15
Mm_Proteasome_Degradation <sup>1</sup>	98	49	7,09
Mm_ADP-Ribosylation-Factor <sup>3</sup>	53	22	7,09
Mm_Gene-Expression <sup>2</sup>	78	58	7,02
Mm_Phosphoinositides-and-their-downstream-targets <sup>3</sup>	51	22	6,47
Mm_IL-2 <sup>4</sup>	68	36	6,36
Mm_IL-3 <sup>4</sup>	80	38	6,26
Mm_Insulin_Signaling <sup>1</sup>	91	34	6,23
Mm_Alpha6-Beta4-Integrin <sup>4</sup>	61	34	6,22
Mm_Delta-Notch <sup>4</sup>	93	23	6,19
Mm_WNT-Signaling-Pathway <sup>3</sup>	73	13	4,37
Mm_Wnt <sup>4</sup>	105	28	4,02

### 3.1.5 Analyse des Wnt-Signalwegs mittels PCR-Array und qPCR im Colon

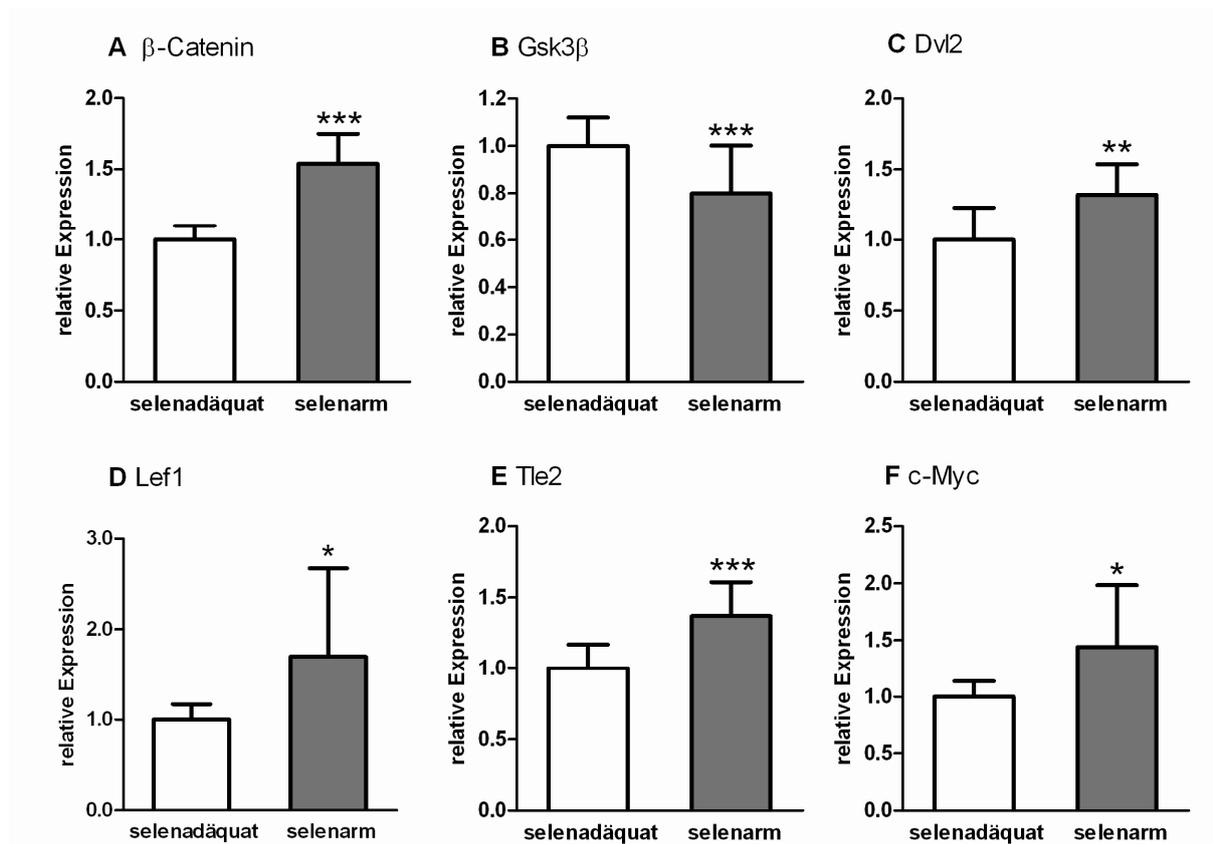
Ein Grund für den etwas niedrigeren Z-Score des Wnt-Signalwegs von 4,37 lag darin, dass viele Gene, die mit diesem Signalweg assoziiert sind, im Colon der Mäuse laut Microarray nicht exprimiert waren. Deshalb wurde ein PCR-Array für den Wnt-Signalweg durchgeführt. Dazu wurden die cDNAs der 12 Tiere einer Fütterungsgruppe zu gleichen Teilen gepoolt. Mit Hilfe des verwendeten PCR-Arrays war es möglich, die Expression von 84 Genen eines Signalwegs gleichzeitig zu untersuchen. Von diesen 84 Genen waren sechs mittels PCR-Array nicht exprimiert, wobei 28 davon laut Microarray nicht auswertbar waren. 37 Gene wurden mittels PCR-Array auf der Basis einer relativen Änderung mit einem Betrag  $\geq 1,2$  als reguliert identifiziert. In Tabelle 8 sind nur die 25 Gene dargestellt, die in der qPCR einen  $C_T$ -Wert  $< 30$  Zyklen aufwiesen, einschließlich Lef1 und Tle2 (Abkürzungen siehe Tab. 8), die trotz niedrigerer Expression weiter berücksichtigt wurden. Die 25 Gene enthalten außerdem Gsk3 $\beta$  und Nr $x$ , da sie inhaltlich von Interesse waren, obwohl ihre relative Änderung im PCR-Array nicht  $> 1,2$  war (Tab. 8).

**Tab. 8. Vergleich zwischen Microarray, PCR-Array und qPCR**

Fettgedruckte Änderungen bedeuten, dass diese Gene signifikant ( $p < 5\%$ ) reguliert waren.

Name	Agilent-ID	Beschreibung	Acc Nummer	Microarray Änderung	PCR Array Änderung	qPCR Änderung
Ctnnb1	A_51_P272046	Catenin (cadherin associated protein), beta 1	NM_007614	0,84	1,28	<b>1,54</b>
Dixdc1	A_51_P468876	DIX domain containing 1	NM_178118	<b>1,21</b>	1,38	
Dvl1	A_52_P234958	Dishevelled, dsh homolog 1 (Drosophila)	NM_010091	1,12	1,32	1,11
Dvl2	A_51_P113106	Dishevelled 2, dsh homolog (Drosophila)	NM_007888	n.d.	1,96	<b>1,32</b>
Ep300	A_52_P411601	E1A binding protein p300	NM_177821	0,98	1,30	
Fbxw11	A_51_P141860	F-box and WD-40 domain protein 11	NM_134015	<b>1,42</b>	1,33	
Fzd1	A_52_P597634	Frizzled homolog 1 (Drosophila)	NM_021457	1,03	1,73	
Fzd3	A_51_P190863	Frizzled homolog 3 (Drosophila)	NM_021458	1,27	1,42	
Fzd8	A_51_P312517	Frizzled homolog 8 (Drosophila)	NM_008058	n.d.	1,45	
Gsk3b	A_52_P641629	Glycogen synthase kinase 3 beta	NM_019827	<b>0,75</b>	1,06	<b>0,80</b>
Lef1	A_51_P420400	Lymphoid enhancer binding factor 1	NM_010703	n.d.	5,74	<b>1,70</b>
Lrp6	A_51_P169401	Low density lipoprotein receptor-related protein 6	NM_008514	n.d.	1,35	1,12
Myc	A_52_P278549	Myelocytomatosis oncogene	NM_010849	1,07	1,20	<b>1,44</b>
Nxn	A_52_P57013	Nucleoredoxin	NM_008750	1,20	1,14	1,09
Pitx2	A_51_P501897	Paired-like homeodomain transcription factor 2	NM_011098	1,31	1,68	
Rhou	A_51_P227392	Ras homolog gene family, member U	NM_133955	1,12	1,36	
Senp2	A_51_P492141	SUMO/sentrin specific peptidase 2	NM_029457	<b>0,87</b>	1,31	
Sfrp2	A_51_P520849	Secreted frizzled-related protein 2	NM_009144	1,10	1,32	
Sfrp4	A_51_P457196	Secreted frizzled-related protein 4	NM_016687	n.d.	0,59	
Tle2	A_51_P175303	Transducin-like enhancer of split 2	NM_019725	<b>1,13</b>	0,30	<b>1,37</b>
Wif1	A_51_P484526	Wnt inhibitory factor 1	NM_011915	1,08	0,76	
Wisp1	A_51_P220343	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	NM_018865	<b>1,21</b>	1,37	
Wnt4	A_51_P130475	Wingless-related MMTV integration site 4	NM_009523	n.d.	0,65	
Wnt5b	A_51_P137991	Wingless-related MMTV integration site 5B	NM_009525	1,02	0,67	
Wnt6	A_52_P415155	Wingless-related MMTV integration site 6	NM_009526	0,91	0,28	

Da die Verwendung von Probenpools für die PCR-Arrays eine statistische Auswertung unmöglich macht, wurde für ausgewählte Gene eine qPCR mit den 12 Einzeltieren durchgeführt. Die  $\beta$ -Catenin-Expression war im Selenmangel signifikant um den Faktor 1,5 erhöht (Abb. 7 A). Für Dvl2 und Lef1 wurden mittels qPCR kleinere Änderungen erzielt als mittels PCR-Array, dennoch waren diese signifikant (Abb. 7 C und D). Die Expression von Gsk3 $\beta$  war im Selenmangel auf 80 % reduziert, was in diesem Fall das Ergebnis des Microarrays bestätigte (Abb. 7 B). Auch die im PCR-Array ermittelte Expression von c-Myc, einem Zielgen des Wnt-Signalwegs, wurde in der qPCR bestätigt (Abb. 7 F). Für Tle2 wurde in der qPCR eine Expressionssteigerung um 30 % im Selenmangel ermittelt, die der Tendenz im Microarray entsprach, der deutlichen Hemmung im PCR-Array aber gegenläufig war (Abb. 7 E). Des Weiteren wurden die im PCR-Array ermittelten Expressionsänderungen für Dvl1, Lrp6 und NrX in der Tendenz durch die qPCR bestätigt, allerdings wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht (Tab. 8).



**Abb. 7. Relative mRNA-Expression von Genen des Wnt-Signalwegs in Abhängigkeit von Selen**

Die mRNA aus dem Colon selenarm und selenadäquat gefütterter Mäuse wurde revers transkribiert und mittels qPCR auf die Expression von (A)  $\beta$ -Catenin, (B) Gsk3 $\beta$ , (C) Dvl2, (D) Lef1, (E) Tle2 und (F) c-Myc hin analysiert. Die Rohdaten wurden auf einen Normalisierungsfaktor, bestehend aus dem Mittelwert der Referenzgene Hprt und Rpl13a, bezogen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 12 Tieren pro Gruppe. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  und \*\*\*  $p < 0,001$  versus selenadäquate Fütterung mittels Student's T-Test.

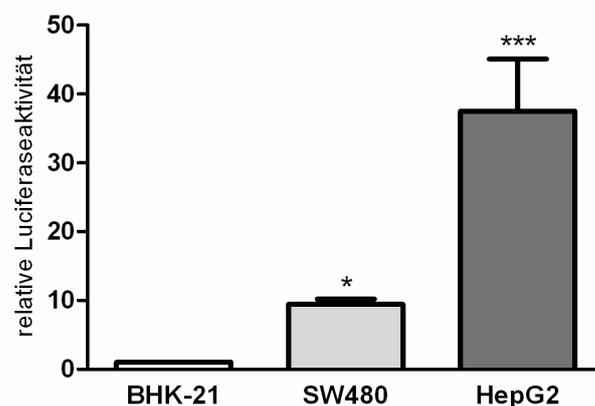
### 3.2 Regulation von GPx2 durch den Wnt-Signalweg

#### 3.2.1 Regulation des GPx2 Promotors durch den Wnt-Signalweg

Grundlage für die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen GPx2 und dem Wnt-Signalweg war eine Arbeit der Gruppe um van de Wetering [147], die mittels Microarray zeigte, dass eine Hemmung des Signalwegs durch dominant negatives TCF (dnTCF) in einer verminderten GPx2-Expression resultiert.

Zunächst wurde die basale GPx2-Promotoraktivität in drei Zelllinien mit unterschiedlich aktivem Wnt-Signalweg mittels Reportergen-Assay untersucht. Hierzu wurde ein Plasmid (pGL3 basic) verwendet, in das 2.111 Basen des GPx2-Promotors vor ein Luciferasegen kloniert wurden (GI-prom 1) [86]. Bei SW480- und HepG2-Zellen handelt es sich um Krebszelllinien,

die in Folge einer Mutation des APC- bzw.  $\beta$ -Catenin-Gens einen konstitutiv aktiven Wnt-Signalweg haben. Bei der Mutation von  $\beta$ -Catenin in HepG2-Zellen handelt es sich um eine Deletion der Aminosäuren 25-140 in Exon 3 und 4, die zum Verlust der Phosphorylierungsstellen führt, die für den geregelten Abbau von  $\beta$ -Catenin notwendig sind [160]. Auch bei der Mutation von APC handelt es sich vermutlich um eine Deletion, die nukleäre Exportsignale umfasst [161]. BHK-21-Zellen hingegen sind keine Krebszellen, sondern immortalisierte Fibroblasten aus der Hamsterniere, in denen der Wnt-Signalweg nicht aktiviert ist. In diesen Zellen hatte der GPx2-Promotor die niedrigste basale Aktivität. Im Vergleich dazu war die Promotoraktivität in SW480-Zellen um den Faktor 9,5 und in HepG2-Zellen um den Faktor 38 gesteigert (Abb. 8). Der paarweise Vergleich zwischen BHK-21-Zellen und jeweils einer der beiden Krebszelllinien war mittels Student's T-Test sowohl für SW480- als auch für HepG2-Zellen signifikant. Dies lieferte den ersten Hinweis, dass GPx2 in Abhängigkeit von der Aktivität des Wnt-Signalwegs reguliert sein könnte.

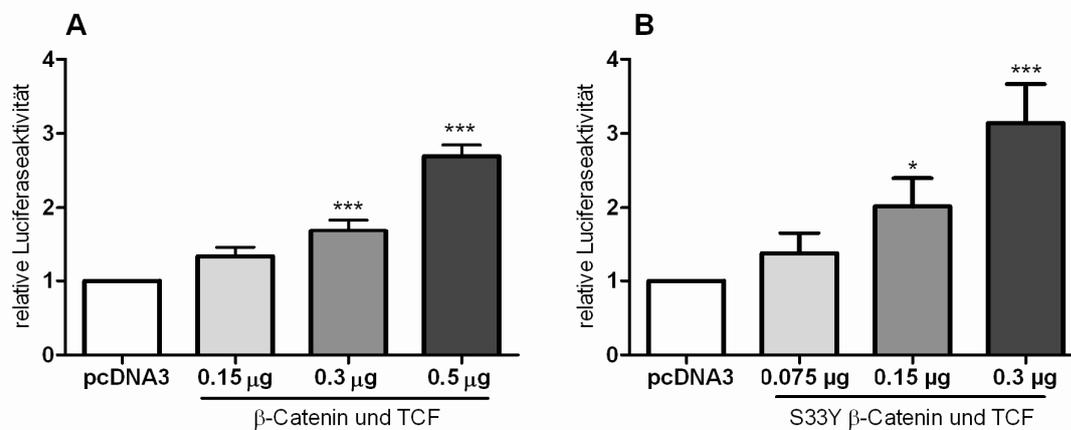


**Abb. 8. Basale GPx2-Promotoraktivität in verschiedenen Zelllinien**

Die Zellen wurden mit 0,15  $\mu$ g GI-prom 1 transfiziert und 48 h nach der Transfektion geerntet. Die relative Luciferaseaktivität in BHK-21-Zellen wurde auf 1 gesetzt und die anderen Zellen daraufbezogen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  versus Kontrolle (BHK-21-Zellen) mittels Student's T-Test.

Um dies weiter zu überprüfen, wurden als Nächstes Kotransfektionsstudien mit Expressionsplasmiden für verschiedene nukleäre Effektoren des Signalwegs durchgeführt. Trotz der deutlichen konstitutiven Aktivität des Wnt-Signalwegs in HepG2-Zellen ließ sich die GPx2-Promotoraktivität durch Kotransfektion mit Wildtyp (WT)  $\beta$ -Catenin und TCF konzentrationsabhängig steigern. Mit der höchsten eingesetzten Konzentration von 0,5  $\mu$ g jedes Expressionsplasmids pro Transfektionsansatz wurde ein Faktor von 2,8 im Vergleich zur Kontrolle mit leerem pcDNA3 erreicht (Abb. 9 A). Für  $\beta$ -Catenin sind verschiedene *hotspots* bekannt, deren Mutation zu einem verminderten Abbau des Proteins führen. Wird z.B. die Aminosäure

Serin an Position 33 durch ein Tyrosin ersetzt, kann keine Serinphosphorylierung mehr stattfinden, die für die anschließende Ubiquitinylierung essentiell ist. Dieses mutierte  $\beta$ -Catenin wird nicht mehr durch  $\beta$ -TrCP, ein Element der Ubiquitin Ligase E3, erkannt [94, 162]. Die Kotransfektion mit diesem mutierten  $\beta$ -Catenin S33Y, das nicht phosphoryliert und abgebaut werden kann, in Kombination mit TCF führte sogar noch zu einer stärkeren Aktivierung bei niedrigeren eingesetzten Plasmidkonzentrationen. Schon 0,3  $\mu\text{g}$  jedes Plasmids ergaben einen Faktor von 3,1 bezogen auf die Kontrolle mit leerem pcDNA3 (Abb. 9 B). Auch in BHK-21- und SW480-Zellen führte eine Kotransfektion des GPx2-Promotors mit  $\beta$ -Catenin und TCF zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Promotoraktivität (Daten nicht gezeigt).



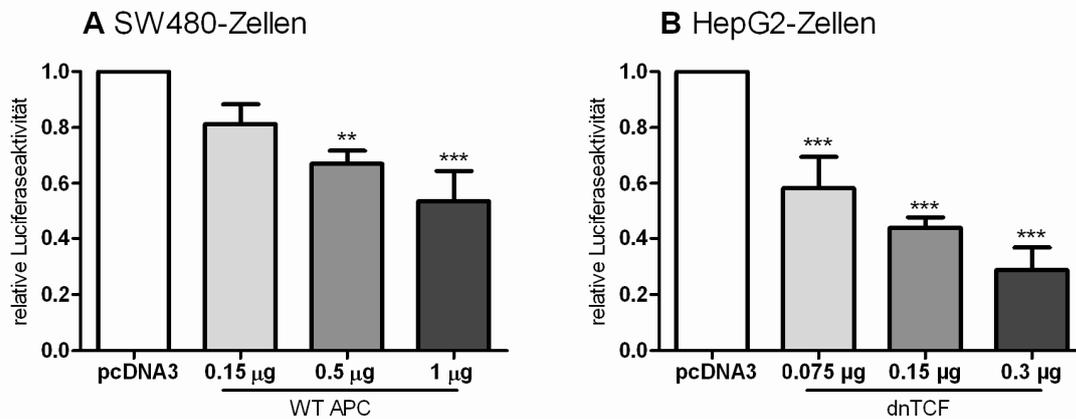
**Abb. 9. Aktivierung des GPx2-Promotors in HepG2-Zellen durch Kotransfektion mit  $\beta$ -Catenin und TCF**

HepG2-Zellen wurden mit 0,15  $\mu\text{g}$  GI-prom 1 und einer steigenden Menge Wildtyp  $\beta$ -Catenin (A) bzw.  $\beta$ -Catenin S33Y (B) und TCF kotransfiziert. Die transfizierte DNA-Menge wurde durch Zugabe des leeren pcDNA3-Vektors konstant gehalten. Die relative Luciferaseaktivität in Kontrollzellen mit pcDNA3 wurde auf 1 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  versus Kontrolle mittels einseitigem ANOVA.

Um nun im Gegenzug eine Hemmung des Wnt-Signalwegs herbeizuführen, wurden zunächst SW480-Zellen herangezogen. Diese besitzen ein mutiertes APC, das nicht in der Lage ist,  $\beta$ -Catenin im Abbaukomplex zu halten, so dass  $\beta$ -Catenin vermehrt in den Kern translozieren kann. Die Transfektion dieser Zellen mit WT APC führte zu einer verringerten  $\beta$ -Catenin-abhängigen Transkription der Zielgene. Auch die GPx2-Promotoraktivität wurde in SW480-Zellen durch Kotransfektion mit WT APC konzentrationsabhängig gehemmt. 1  $\mu\text{g}$  Expressionsplasmid führte dabei zu einer Hemmung um 50 % (Abb. 10 A).

Eine weitere Möglichkeit, den Wnt-Signalweg zu hemmen, besteht in der Verwendung von dominant negativem TCF (dnTCF). Dieses zeichnet sich dadurch aus, dass ihm N-terminal

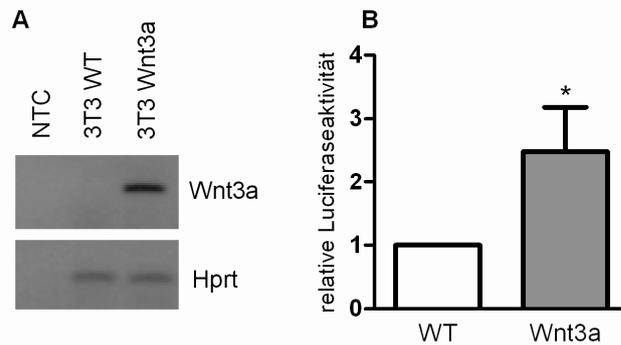
30 Aminosäuren fehlen, die für die Bindung von  $\beta$ -Catenin notwendig sind. Folglich blockiert dnTCF die Bindestelle im Promotor, und es kann zu keiner Aktivierung desselben kommen. In HepG2-Zellen führte die Kotransfektion mit dnTCF zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der GPx2-Promotoraktivität. Bereits die Transfektion mit 0,3  $\mu$ g des Expressionsplasmids resultierte in einer Senkung der Promotoraktivität auf 30 % (Abb. 10 B).



**Abb. 10. Hemmung der GPx2-Promotoraktivität durch Wildtyp APC bzw. dnTCF**

SW480- (A) bzw. HepG2-Zellen (B) wurden mit 0,15  $\mu$ g GI-prom 1 und einer steigenden Menge APC bzw. dnTCF kotransfiziert. Die transfizierte DNA-Menge wurde durch Zugabe des leeren pcDNA3-Vektors konstant gehalten. Die relative Luciferaseaktivität in Kontrollzellen mit pcDNA3 wurde auf 1 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  versus Kontrolle mittels einseitigem ANOVA.

Der Wnt-Signalweg lässt sich durch seine Liganden, kleine Wnt Glycoproteine, stimulieren, die extrazellulär an ihren Rezeptor binden und damit den Signalweg aktivieren. Um den Einfluss dieser rezeptorvermittelten Aktivierung des Signalwegs auf die GPx2-Promotoraktivität zu überprüfen, wurden murine 3T3-Fibroblastenzellen verwendet, die stabil mit Wnt3a transfiziert wurden (Abb. 11 B). 3T3-Wnt3a-Zellen sezernieren Wnt3a, das autokrin und parakrin an seine Rezeptoren bindet und so den Signalweg stimuliert. Im Vergleich zu WT-Zellen ohne Wnt3a-Stimulation war die GPx2-Promotoraktivität in den Wnt3a-Zellen mehr als verdoppelt (Abb. 11 A).

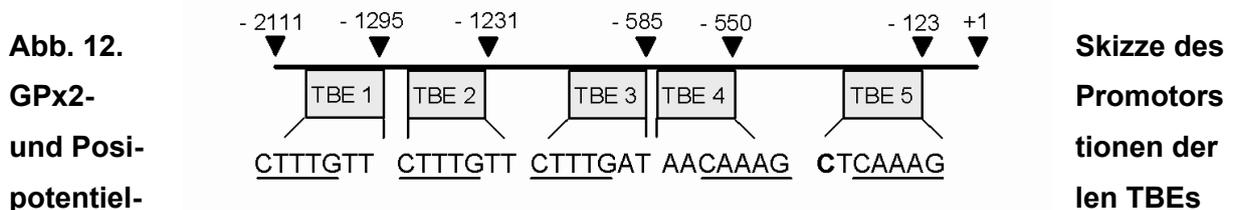


**Abb. 11. Stimulation des GPx2-Promotors in Wnt3a-exprimierenden Zellen**

(A) Vergleich der mRNA-Expression von murinem Wnt3a in WT und Wnt3a-exprimierenden Zellen. Als Referenzgen diente Hprt. Außerdem wurde zur Kontrolle der PCR ein Ansatz ohne cDNA untersucht (NTC). (B) Beide Zelllinien wurden mit 0,15 µg GI-prom 1 transfiziert. Die relative Luciferaseaktivität in WT-Zellen wurde auf 1 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. (B) \* p < 0,05 versus Kontrolle mittels Student's T-Test.

### 3.2.2 Identifizierung und Untersuchung von β-Catenin/TCF responsiven Elementen im GPx2-Promotor

2.000 Basen des humanen GPx2-Promotors wurden auf potentielle Bindestellen für TCF untersucht. Mit Hilfe des MatInspector Programms wurden vier TCF/LEF-Bindeelemente (TBE) identifiziert, die der veröffentlichten Konsensussequenz T/A T/A CAA T/A G entsprechen. Eine fünfte potentielle Bindestelle wurde 5' vom Translationsstart manuell identifiziert. Diese stimmt zwar in der Kernsequenz CAAAG mit der Konsensussequenz überein, enthält allerdings eine Mutation innerhalb der beiden vorgeschalteten Basen (Abb. 12).

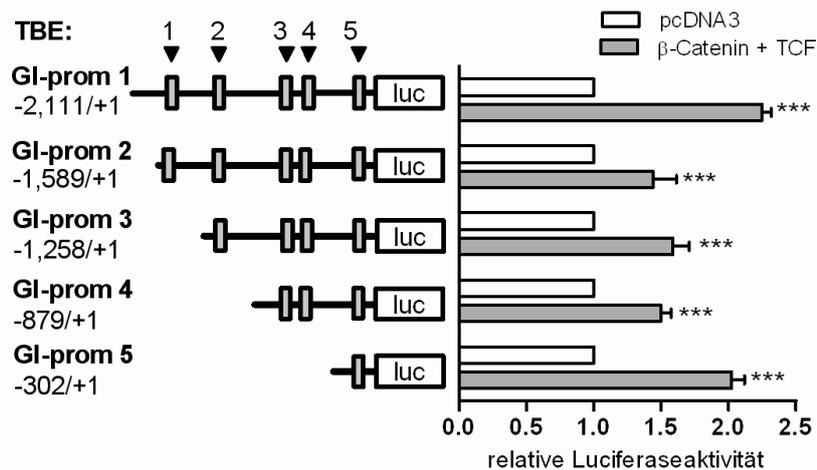


Der humane GPx2-Promotor enthält fünf potentielle TCF/LEF-Bindeelemente. Die Zahlen zeigen deren Positionen ausgehend vom Translationsstart an. Die fett gedruckte Base innerhalb von TBE 5 stellt eine Abweichung zur Konsensussequenz dar.

Auffällig ist, dass sowohl TBE 1 und 2 als auch TBE 3 und 4 sehr nah beieinander liegen. TBE 5 hingegen befindet sich 123 Basen 5' vom Translationsstart und damit nur 10 Basen in 3'-Richtung von der ARE-Sequenz entfernt, die als funktional und für die GPx2-Expression notwendig identifiziert wurde. Im Speziesvergleich zwischen Maus und Mensch ergab sich,

dass sowohl TBE 3 als auch TBE 5 konserviert vorliegen, was für die Bedeutung der Binde-  
stelle spricht.

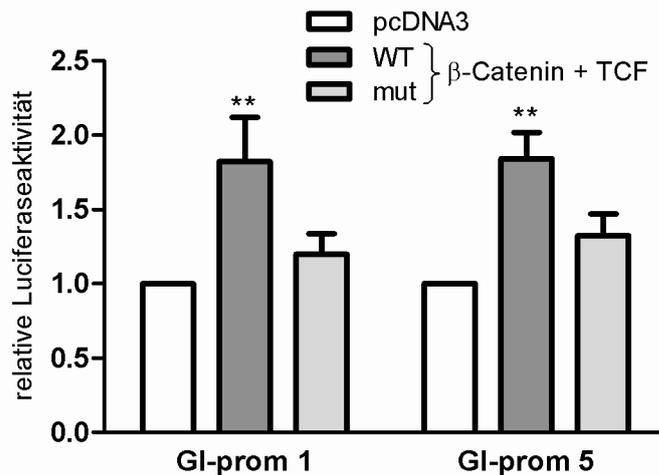
Um die Effizienz der potentiellen  $\beta$ -Catenin/TCF Bindeelemente zu untersuchen, wurden das  
längste Promotorkonstrukt (GI-prom 1) und vier verkürzte Fragmente (GI-prom 2-5) auf ihre  
Aktivierbarkeit durch  $\beta$ -Catenin und TCF hin untersucht. Während die Konstrukte 1 und 2 alle  
fünf potentiellen Bindeelemente umfassten, waren in GI-prom 3 nur noch vier und in GI-prom  
4 drei enthalten. In GI-prom 5 lag nur noch das letzte potentielle TBE 5 in der Nähe des  
Transkriptionsstarts (Abb. 13). Es war kein Konstrukt vorhanden, das eine Trennung zwi-  
schen TBE 3 und 4, die sehr eng beieinander liegen, ermöglicht hätte. Es zeigte sich, dass  
neben dem gesamten Promotor das kürzeste Fragment am besten zu aktivieren war  
(Abb. 13). Da sich in diesem Fragment nur noch eine potentielle  $\beta$ -Catenin/TCF Bindestelle  
(TBE 5) befand, wurde vermutet, dass es sich hierbei um die funktionelle Bindestelle handeln  
müsse.



**Abb. 13. Aktivierbarkeit verschiedener verkürzter Promotorkonstrukte durch  $\beta$ -Catenin und TCF**

HepG2-Zellen wurden mit 0,15  $\mu$ g eines der Promotorkonstrukte sowie mit je 0,15  $\mu$ g  $\beta$ -  
Catenin und TCF kotransfiziert. Die relative Luciferaseaktivität in Kontrollzellen mit pcDNA3  
wurde für jedes der Promotorkonstrukte auf 1 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Stan-  
dardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. \*\*\*  $p < 0,001$  versus Kontrolle mittels  
zweiseitigem ANOVA.

Die Kernsequenz von TBE 5 wurde deshalb im gesamten Promotor und im kürzesten Frag-  
ment von CAAAG zu CACAG mutiert. Die Aktivierbarkeit dieses mutierten GPx2-Promotors  
war im Vergleich zu den unmutierten Fragmenten deutlich herabgesetzt (Abb. 14). Dies be-  
stätigt, dass TBE 5 für die Aktivierbarkeit des GPx2-Promotors durch  $\beta$ -Catenin und TCF  
notwendig ist.



**Abb. 14. Reduzierte Aktivierbarkeit des GPx2-Promotors durch  $\beta$ -Catenin und TCF durch Mutation von TBE 5**

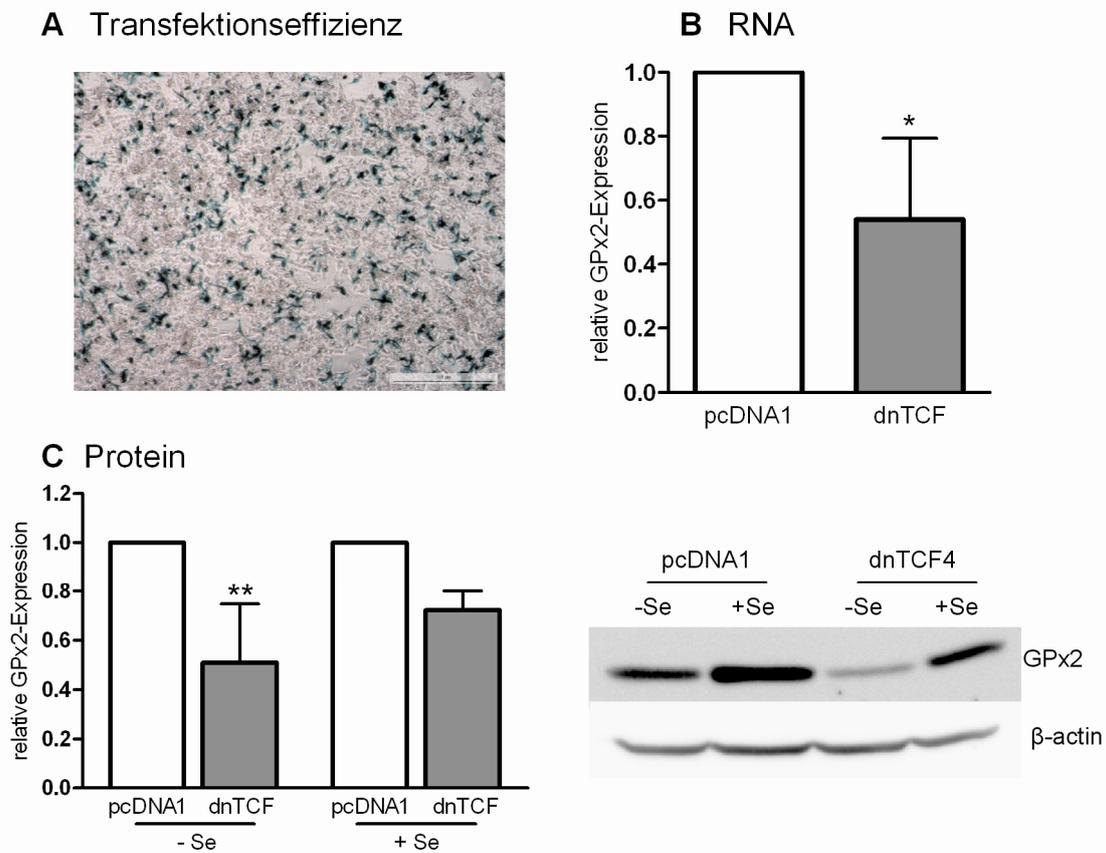
HepG2-Zellen wurden mit 0,15  $\mu$ g des jeweiligen WT bzw. mutierten Promotorkonstrukts sowie mit je 0,15  $\mu$ g  $\beta$ -Catenin und TCF kotransfiziert. Die relative Luciferaseaktivität in Kontrollzellen mit pcDNA3 wurde für jedes der Promotorkonstrukte auf 1 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. \*\*  $p < 0,01$  versus jeweilige Kontrolle mittels zweiseitigem ANOVA.

### 3.2.3 Regulation der endogenen GPx2-Expression durch den Wnt-Signalweg

Zur Untersuchung der endogenen GPx2-Expression in Abhängigkeit von  $\beta$ -Catenin wurden drei verschiedene Ansätze herangezogen. Zunächst wurde der konstitutiv aktivierte Signalweg in Krebszelllinien, in diesem Fall HepG2- und HT-29-Zellen, durch Transfektion von dnTCF bzw. Wildtyp APC gehemmt. Eine weitere Möglichkeit der Einflussnahme auf den Signalweg ist die Aktivierung desselben in murinen 3T3-Fibroblasten mit nahezu inaktivem Wnt-Signalweg.

Die transiente Transfektion von dnTCF in HepG2-Zellen führte, wie bereits gezeigt, zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der GPx2-Promotoraktivität (Abb. 10 B). Die Überprüfung der Transfektionseffizienz in HepG2-Zellen nach dem Lipofektamin-Protokoll ergab, dass etwa 40-50 % der Zellen transfiziert vorlagen (Abb. 15 A), was im Hinblick auf den deutlichen Effekt von dnTCF auf die Promotoraktivität auszureichen schien, um auch die endogene GPx2-Expression zu untersuchen. Bei den folgenden Ergebnissen ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Effekte wahrscheinlich deutlicher wären, wenn alle Zellen mit dnTCF transfiziert wären. Die Untersuchung der transient transfizierten Zellen auf ihre endogene GPx2 mRNA- und Proteinexpression ergab, dass auch hier der hemmende Einfluss von dnTCF auftrat. Auf mRNA-Ebene wurde die GPx2-Expression in selenarmen Zellen auf 50 % reduziert (Abb. 15 B). Um GPx2 auf Proteinebene zu untersuchen, wurden die Zellen für drei Tage ohne und mit 50 nM Natriumselenit kultiviert. Der Effekt durch das transfizierte dnTCF ist in den selenarmen Zellen mit einer signifikanten Reduktion der GPx2-Expression

auf 50 % deutlicher als in den mit Selen versorgten Zellen. Auch hier zeigte sich eine Hemmung durch dnTCF auf etwa 70 %, die allerdings nicht signifikant war (Abb. 15 C).

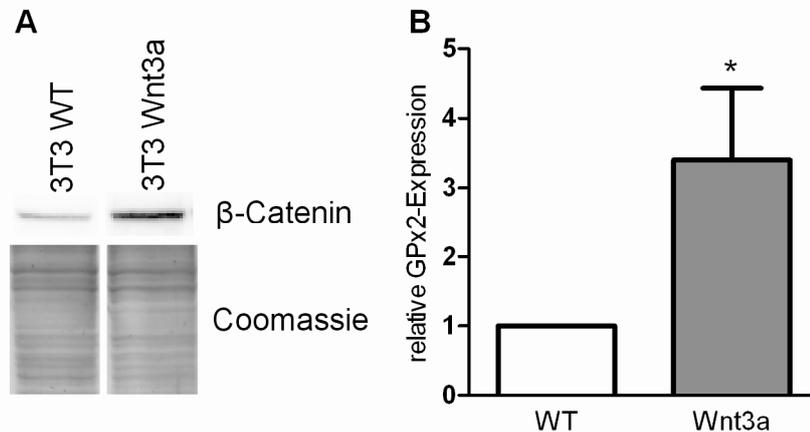


**Abb. 15. Hemmung der endogenen GPx2-Expression auf mRNA und Proteinebene durch Transfektion von dnTCF in HepG2-Zellen**

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden HepG2-Zellen zunächst mit 0,5  $\mu$ g PSV transfiziert und mit X-Gal angefärbt (A). HepG2-Zellen wurden transient mit 0,4  $\mu$ g dnTCF oder leerem pcDNA1 transfiziert und 48h später geerntet. Die GPx2-Expression wurde auf mRNA- (B) und Proteinebene (C) untersucht und in beiden Fällen auf  $\beta$ -Actin normalisiert. Die Behandlung mit Selenit erfolgte für 72 h ab der Aussaat. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot (C, rechts). Der densitometrischen Auswertung liegen drei Experimente zugrunde (C, links). Die Werte für pcDNA1 wurden auf 1 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  versus Kontrolle mittels Student's T-Test (B) bzw. zweiseitigem ANOVA (C).

Ein weiteres Modell, um den Einfluss eines veränderten Wnt-Signalwegs auf die endogene GPx2-Expression zu untersuchen, sind die bereits erwähnten Wnt3a-exprimierenden 3T3-Fibroblasten. Wie schon gezeigt, haben sie eine erhöhte basale GPx2-Promotoraktivität im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (Abb. 11 A). Der Vergleich des nukleären  $\beta$ -Catenin-Levels ergab eine fast viermal so hohe Konzentration in Wnt3a-exprimierenden Zellen (Abb. 16 A). Folglich war auch die endogene GPx2-mRNA-Expression im Vergleich zu Wildtyp-Zellen

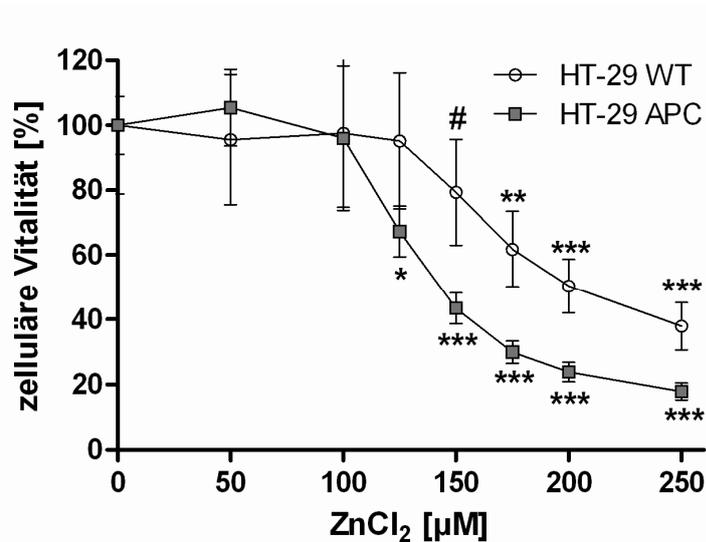
erhöht, in diesem Fall um den Faktor 3,4 (Abb. 16 B). Dies wurde in selenarmen Zellen gemessen. Insgesamt war die GPx2 mRNA-Expression allerdings auf einem sehr niedrigen Niveau. Auf Proteinebene hingegen war GPx2 weder in den Wildtyp- noch in den Wnt3a-exprimierenden 3T3-Zellen nach dreitägiger Selenitgabe detektierbar, weshalb hier auf die Analyse der Proteinebene verzichtet werden musste.



**Abb. 16. Vergleich der nukleären Lokalisation von  $\beta$ -Catenin und der GPx2 mRNA-Expression in Wildtyp und Wnt3a-exprimierenden 3T3-Zellen**

(A) 3T3 WT-Zellen und solche, die Wnt3a stabil überexprimieren, wurden auf ihren  $\beta$ -Catenin-Gehalt im Kern untersucht. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot (oben) mit Coomassie-Gelfärbung (unten). (B) Die GPx2-mRNA-Expression wurde auf  $\beta$ -Actin normalisiert und die Expression in WT-Zellen wurde auf 1 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. \*  $p < 0,05$  versus WT mittels Student's T-Test.

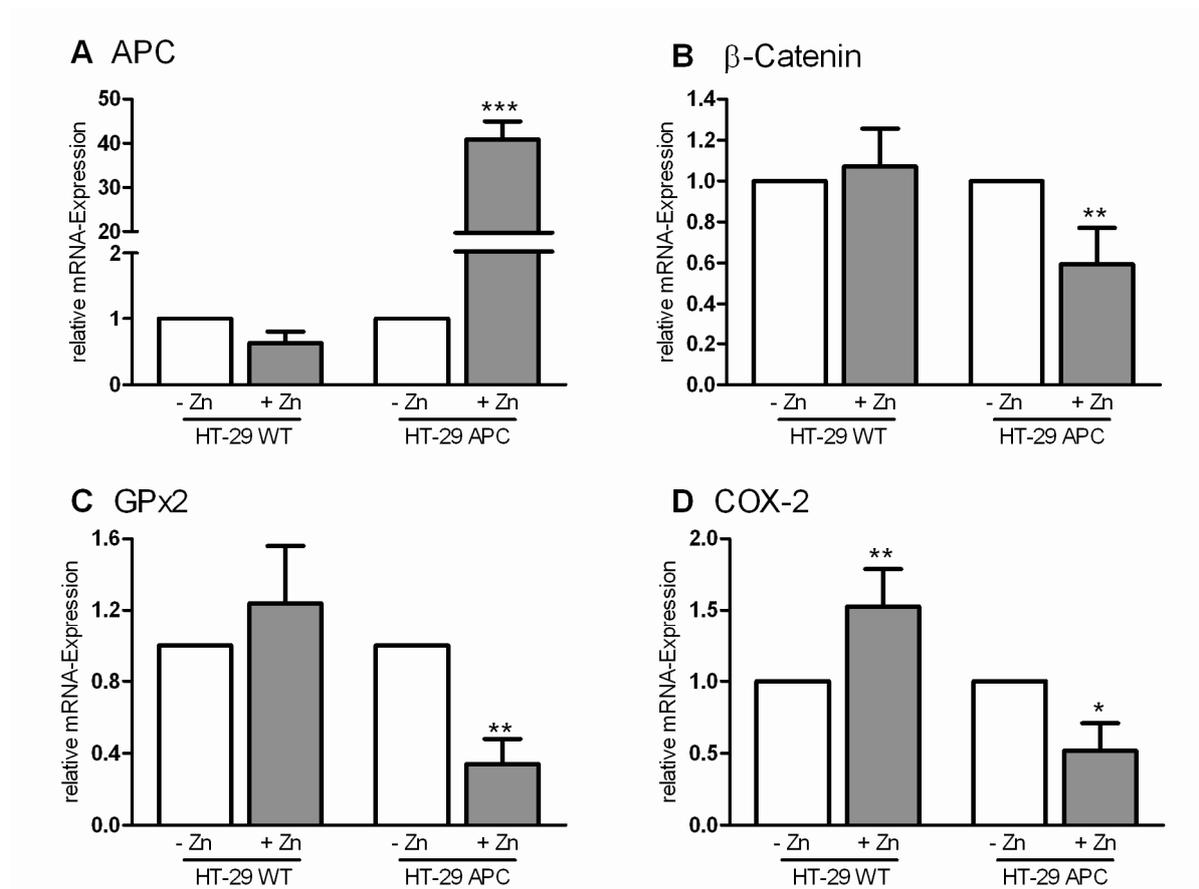
HT-29-Zellen haben, ebenso wie SW480-Zellen, ein mutiertes APC, was in einem konstitutiv aktiven Wnt-Signalweg resultiert. HT-29 APC Zellen wurden mit Wildtyp-APC transfiziert, das unter der Kontrolle eines Zink-abhängigen Promotors steht [163]. Der MTT-Test zeigte, dass es ab einer 24-stündigen Stimulation von Wildtyp HT-29-Zellen mit  $175 \mu\text{M ZnCl}_2$  zu einem signifikanten Abfall der Vitalität kam, weshalb Konzentrationen bis  $150 \mu\text{M}$  als nicht zytotoxisch eingestuft wurden. In HT-29 APC Zellen sank die Vitalität der Zellen allerdings bereits ab einer Konzentration von  $< 125 \mu\text{M ZnCl}_2$ , was auf die Induktion von APC zurückzuführen ist, da dieser Effekt in den Wildtyp-Zellen nicht auftrat. Bei einer Konzentration von  $150 \mu\text{M ZnCl}_2$  war der Unterschied zwischen den beiden Zelllinien signifikant und damit der Effekt auf die APC-Induktion vermutlich am stärksten (Abb. 17). Deshalb wurden beide Zelllinien für mRNA-Experimente 8 h und für Protein-Experimente 24 h mit  $150 \mu\text{M ZnCl}_2$  stimuliert.



**Abb. 17. MTT-Test in HT-29 Wildtyp und HT-29 APC Zellen**

HT-29 Wildtyp und HT-29 APC Zellen wurden für 24 h mit steigenden Konzentrationen an ZnCl<sub>2</sub> stimuliert, und anschließend wurde die zelluläre Vitalität mittels MTT-Test bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 versus unstimulierte Zellen und # p < 0,05 versus HT-29 APC Zellen mittels zweiseitigem ANOVA.

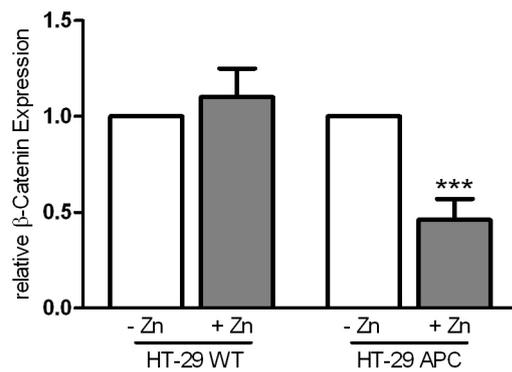
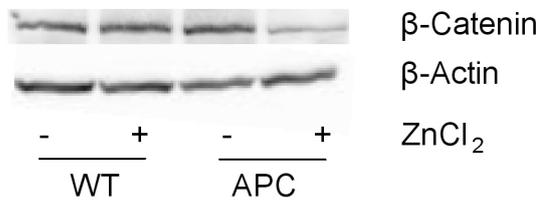
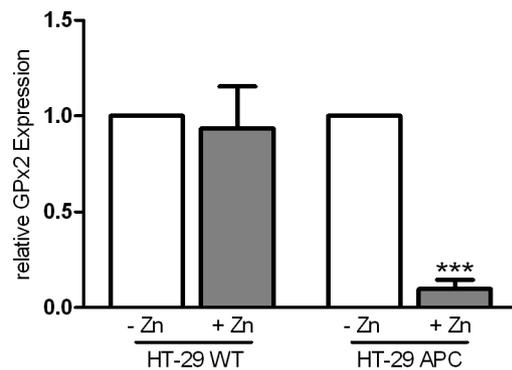
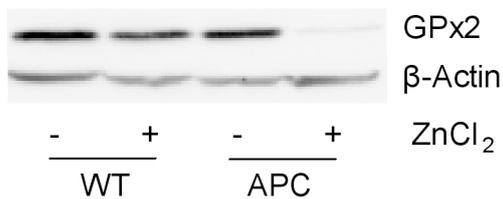
Dies führte in HT-29 APC Zellen auf mRNA-Ebene zu einer 40-fachen Steigerung der Wildtyp APC-Expression (Abb. 18 A), während die β-Catenin mRNA-Expression um 40 % reduziert wurde (Abb. 18 B). Gleichzeitig wurde die GPx2 mRNA-Expression um 66 % gesenkt (Abb. 18 C). Auch die Expression der COX-2, bei der es sich um ein bekanntes β-Catenin Zielgen handelt, wurde auf mRNA-Ebene um 48 % reduziert (Abb. 18 D). In HT-29 Wildtyp Zellen hingegen hatte die Stimulation mit ZnCl<sub>2</sub> keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von APC, β-Catenin oder GPx2. Nur die COX-2-Expression wurde durch ZnCl<sub>2</sub> in Wildtyp HT-29-Zellen signifikant um den Faktor 1,5 gesteigert. Um die mRNA- und Proteinexpression besser vergleichen zu können, wurden die Zellen bei beiden Versuchsansätzen zunächst ohne Selen ausgesät. Erst während der Stimulation mit ZnCl<sub>2</sub>, die für die RNA-Expression 8 h und für die Proteinexpression 24 h betrug, wurde den Zellen auch Selenit (50 nM) zur Verfügung gestellt.



**Abb. 18. mRNA-Expression von APC, β-Catenin, GPx2 und COX-2 in HT-29 Wildtyp und APC Zellen**

HT-29 Wildtyp und HT-29 APC Zellen wurden für 8 h mit 150  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  stimuliert, um anschließend mRNA extrahieren und mittels qPCR untersuchen zu können. Die mRNA-Expression von APC (A), β-Catenin (B), GPx2 (C) und COX-2 (D) wurde auf β-Actin normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  versus unstimulierte Kontrollen (-Zn) mittels zweiseitigem ANOVA.

Auch auf Proteinebene resultierte eine 24-stündige Stimulation mit 150  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  in einer Abnahme des zellulären β-Catenin-Levels, wobei die Reduktion um 54 % sogar noch etwas deutlicher als auf mRNA-Ebene war (Abb. 19 A). Es zeigte sich, dass HT-29 Wildtyp-Zellen und HT-29 APC Zellen mit Erhöhung des Selengehalts vermehrt GPx2 Protein synthetisieren konnten, was in HT-29 APC Zellen, die mit Zink behandelt wurden, nicht möglich war. In diesen Zellen lag die GPx2-Expression nur bei 9 % im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 19 B).

**A**  $\beta$ -Catenin Expression**B** GPx2 Expression**Abb. 19. Protein-Expression von  $\beta$ -Catenin und GPx2 in HT-29 Wildtyp und APC Zellen**

HT-29 Wildtyp und HT-29 APC Zellen wurden für 24 h mit 150  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> stimuliert, um die Expression von  $\beta$ -Catenin (A) und GPx2 (B) auf Proteinebene untersuchen zu können. Alle Zellen wurden ohne Selen ausgesät und die Selengabe (50 nM) erfolgte in allen Ansätzen parallel zur ZnCl<sub>2</sub>-Stimulation. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot (links). Für die densitometrische Auswertung wurde auf  $\beta$ -Actin normalisiert und anschließend der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten gebildet. \*\*\*  $p < 0,001$  versus unstimulierte Kontrolle mittels zweiseitigem ANOVA.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Genexpressionsanalyse im Colon

In den letzten Jahren hat sich die Auffassung durchgesetzt, dass bestimmte Nahrungsinhaltsstoffe einen Einfluss auf die Expression von Genen haben können. Dies konnte z.B. für Retinsäure, die mit Hilfe eines Dimers aus Retinsäurerezeptor (RAR) und Retinoid-X-Rezeptor (RXR) an ihr responsives Element bindet [164], oder für Fettsäuren, die nukleäre Rezeptoren der PPAR-Familie (*peroxisome proliferator activated receptor*) aktivieren [165], gezeigt werden. Über den Einfluss des Spurenelements Selen ist diesbezüglich noch wenig bekannt, insbesondere was die Beeinflussung von Nicht-Selenoproteinen betrifft. Da in der Clark-Studie gezeigt werden konnte, dass eine Selensupplementation das Colonkrebsrisiko senken kann, wurde dieser Darmabschnitt für Genexpressionsanalysen ausgewählt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst, den Einfluss eines marginalen Selenmangels auf die globale Genexpression im Colon zu untersuchen. Im Gegensatz zu vielen anderen Fütterungsstudien war die Schwankung des Selengehalts klein und lag in dem Bereich zwischen der für Mäuse empfohlenen Dosis (selenadäquat) und der Hälfte dessen (selenarm). Als Selenquelle diente Selenomethionin, neben Selenocystein die häufigste in der Nahrung vorkommende Selenverbindung. Der marginal defizienten Versorgung entspricht die Selenzufuhr vieler Europäer, was möglicherweise mit einem erhöhten Risiko für Erkrankungen wie Darmkrebs einhergeht [13]. Nach einer sechswöchigen Fütterungsperiode sank durch diese Intervention der Plasmaselenspiegel der Tiere auf 13 % (Abb. 4 A) und die GPx-Aktivität in der Leber auf 35 % (Abb. 4 B). Die Halbierung der selenadäquaten Zufuhr führte also zu einem deutlichen Verlust an verfügbarem Selen, der Auswirkungen auf bekannte Selenoproteine hatte. Da diese Schwankungen durch die übliche Varianz der Ernährungsgewohnheiten auftreten können, ist der gewählte Versuchsansatz dazu geeignet, einen Biomarker für eine adäquate Selenversorgung zu finden.

#### 4.1.1 Biomarker für den Selenstatus

Der Selenstatus des Körpers wird in der Regel im Blut bestimmt, wobei auch die Messung in Haaren oder Fussnägeln möglich ist. Der Selengehalt im Vollblut ist dem im Plasma vorzuziehen, weil durch den Einbau in die Blutzellen ein längerer Zeitraum abgebildet werden kann, während der Gehalt im Plasma kurzfristigen Schwankungen unterliegt [166]. Der tatsächliche Selenstatus ist allerdings nicht einfach der Selengehalt, sondern das für den Einbau in aktive Selenoproteine zur Verfügung stehende Selen. Ein optimaler Biomarker zur Erfassung einer zu niedrigen Selenzufuhr wäre also ein Selenoprotein, das besonders empfindlich auf eine suboptimale Selenversorgung reagiert und das in zur Verfügung stehendem biologischem Material (z.B. Leukozyten, Plasma) ausreichend vorliegt. Selen beeinflusst

lusst die Selenoproteinexpression nicht nur auf translationaler Ebene, sondern auch durch Modifikationen der mRNA-Stabilität. Die Untersuchung der mRNA-Expression von Selenoproteinen ist deshalb geeignet, um Rückschlüsse auf deren Hierarchie zu ziehen. Die Selenoproteine SelW, GPx1, SelM und SelH reagierten sowohl im Microarray als auch in der qPCR signifikant auf eine Halbierung der Selenzufuhr (Tab. 6), weshalb sie in der Hierarchie der Selenoproteine niedrig einzustufen sind. Für GPx1, dessen niedriger Rang in der Hierarchie der Glutathionperoxidasen bekannt ist, war dieser Effekt zu erwarten [68]. In Ratten konnte gezeigt werden, dass die SelW-Expression im Muskel erst ab einer Konzentration von 1 mg/kg Futter ein Plateau erreicht [167]. Im Colon von Ratten war SelW im Selenmangel (8 µg/kg Futter) kaum mehr detektierbar, was darauf hindeutet, dass SelW stark auf Schwankungen im Selengehalt reagiert [168]. Auch die dieser Arbeit zugrunde liegende Änderung der Selenzufuhr ergab, dass SelW sehr sensitiv auf einen Selenmangel reagiert, obwohl das hier verwendete selenarme Futter zehnmal mehr Selen als das bei Pagmantidis *et al.* enthielt. Allerdings kann der angegebene Selengehalt des selenarmen Futters bei Pagmantidis *et al.* auch durch Limitierung der Sensitivität der Messmethode unterschätzt worden sein. Die signifikante Reduktion der SelM- und SelH-Expression hingegen ist für das Colon bisher nicht beschrieben. In der Leber und in der Niere selenarm gefütterter Ratten reagierten SelW, GPx1, SelH und GPx3 besonders sensitiv auf den Selenstatus [169]. Alle vier Proteine erreichten etwa bei 0,1 mg Se/kg Futter ein Expressionsplateau.

SelW, SelH und SelM haben gemeinsam, dass sie zur Familie der Redoxine gehören und ebenso wie GPx1 an der Redoxregulation beteiligt sind [19, 20]. SelW, das im Cytosol vorliegt, ist ein Bindungspartner für 14-3-3 Proteine [19, 170], dessen Isoform Ywhaq ebenfalls im Selenmangel reduziert exprimiert wurde (Abb. 6 B). Die genaue Funktion der 14-3-3 Proteine, die an einer Vielzahl von zellulären Vorgängen beteiligt sind, ist noch ungeklärt. Vermutlich dienen sie als multifunktionale, allosterische Zangen, in denen gebundene Proteine so fixiert werden, dass reaktive Bereiche angreifbar werden [171]. Analysen mittels NMR-Spektroskopie ergaben, dass SelW die Redoxregulation von 14-3-3 Proteinen vermittelt, in dem es die inaktive, oxidierte Form von 14-3-3 reduziert [170]. SelH ist im Kern lokalisiert [39], wo es als DNA-Bindeprotein die Expression von Redox-sensitiven Genen reguliert [38]. SelM ist als Thiol-Disulfidisomerase im endoplasmatischen Retikulum für die Ausbildung von Disulfidbrücken innerhalb der dort gefalteten Proteine zuständig [20]. Allein die verminderte Expression dieser vier Selenoproteine im Selenmangel hat also vielfältige Auswirkungen auf essentielle, zelluläre Vorgänge.

Außer den vier genannten Selenoproteinen reagierten noch Gpx3, Selk, Sels, Txnrd1, Selt und Sep15 in der qPCR signifikant mit Expressionsverlust auf die Senkung der Selenzufuhr (Tab. 6). Carlson *et al.* konnten zeigen, dass so genannte Stress-responsive Selenoproteine

auf Protein- und mRNA-Ebene stärker auf einen Selenmangel reagieren, was durch die reduzierte Methylierung von U34 in der tRNA<sup>[Ser]/Sec</sup> vermittelt wird [66]. Die Sensitivität gegenüber einem Selenmangel konnte für die in der Leber bzw. Niere identifizierten Stress-responsiven Selenoproteine GPx1, GPx3, SelT und SelW in dieser Arbeit bestätigt werden. Ihre Expression und möglicherweise auch die von SelH und SelM scheinen also auch im Colon durch eine tRNA<sup>[Ser]/Sec</sup> mit Um34 vermittelt zu werden. GPx2, GPx4, Sepp1 und Sep15, deren Expression nur teilweise von Um34 abhängt, waren auch in dieser Studie von einem moderaten Selenmangel wenig beeinflusst. Die Thioredoxinreduktasen, die als *house-keeping* Selenoproteine gelten, waren laut Microarray vom Selenstatus unbeeinflusst, in der qPCR war allerdings TrxR1 im Selenmangel niedriger exprimiert (Tab. 6). Die Genexpression von Proteinen der Selenoproteinsynthese war insgesamt durch die Selenfütterung unbeeinflusst. Nur Trspap1, auch Secp43 genannt, war im Selenmangel reduziert exprimiert (Abb. 6 A). Dieses Protein ist unter anderem an der Regulation der Methylierung der tRNA<sup>[ser/sec]</sup> beteiligt. Ein siRNA-vermittelter *knockdown* von Secp43 in NIH-3T3-Zellen ergab, dass ohne Secp43 weniger Um34 gebildet wird [172]. Dieser *in vitro* untersuchte Mechanismus könnte also auch *in vivo* der verminderten Expression Stress-responsiver Selenoproteine im Selenmangel zugrunde liegen.

Da die Expression von SelW, SelH, SelM und GPx1 sehr sensitiv auf kleine Schwankungen in der Selenzufuhr reagiert, können diese Selenoproteine als Biomarker zur Überprüfung des Selenstatus eingesetzt werden. Insbesondere SelH und SelM, deren Funktionen noch weitestgehend ungeklärt sind, sollten vermehrt berücksichtigt werden. Die Expressionsänderung der vier genannten Selenoproteine war nicht nur im Colon, sondern auch in Leukozyten zu sehen (Abb. 5), was ihren Einsatz als humane Biomarker in Blut- und Plasmaproben ermöglicht. Microarray-Analysen in humanen Leukozyten ergaben allerdings, dass eine 6-wöchige Supplementation mit 100 µg Natriumselenit keinen Einfluss auf die Expression der genannten Selenoproteine hatte, obwohl die Supplementation zu einer Steigerung des Plasmaselenengehalts um 19 % führte. Laut Microarray wurden hier die Selenoproteine SelK und Sep15 durch Selensupplementation um 11 % verstärkt exprimiert [173]. Der Unterschied der beiden Studien besteht allerdings darin, dass in der vorliegenden Arbeit der Einfluss eines marginalen Selenmangels im Vergleich zu einer adäquaten Versorgung untersucht wurde, während Pagmantides *et al.* eine Supplementation auf Basis einer adäquaten Versorgung analysierten. Eine weitere Studie zur Erfassung des Selenstatus erwachsener Briten nach Selenrepletion mittels Fruchtsaft (0,7 µg Se/Tag bzw. < 0,1 µg Se/Tag) ergab, dass weder Schwankungen der klassischen Biomarker Plasmaselenenspiegel und GPx3-Aktivität noch Veränderungen der mRNA-Expression der Selenoproteine GPx1, SelH, SelW, Sepp1, GPx3 und GPx4 im Vollblut zu messen waren [169]. Bei einer Plasmaselenkonzentration von

1,13 ± 0,16 µmol/l hatten die untersuchten Selenoproteine scheinbar bereits ein Plateau erreicht. Dies bestätigt, dass die Expression von SelW, SelH, SelM und GPx1 als Biomarker für einen marginal defizienten Selenmangel geeignet ist, der dem im Tiermodell erzeugten entspricht. Dies ist wichtig, um eine beginnende Unterversorgung zu erfassen.

### 4.1.2 Analyse krebsrelevanter Signalwege

Die Signalweganalyse diente der Identifizierung von Signalwegen, die durch den Selenstatus beeinflusst werden und die gleichzeitig eine Rolle im Krebsgeschehen spielen. Die Grundlage für dieses Interesse waren Ergebnisse aus epidemiologischen Erhebungen und einer klinischen Interventionsstudie, die darauf hindeuten, dass Selen antikanzerogen wirkt. Allerdings entsprach die Intervention bei Clark *et al.* einer Selen-Supplementation. Deshalb war es von Interesse, zu untersuchen, ob auch schon der Unterschied zwischen einem marginal defizienten und einem selenadäquaten Status zu Veränderungen innerhalb von Signalwegen führt, die Erkenntnisse über mögliche molekulare Mechanismen, die die antikanzerogenen Effekte von Selen vermitteln könnten, erbringen.

Von den signifikant durch Selen regulierten Signalwegen ließ sich neben dem mTOR- und Delta-Notch- vor allem der Wnt-Signalweg dem Krebsgeschehen zuordnen. Obwohl viele Gene des Wnt-Signalwegs laut Microarray nicht detektierbar waren, war der Signalweg dennoch mit einem Z-Score von 4,37 signifikant durch Selen reguliert (Tab. 7). Die Tendenz der Aktivierung des Wnt-Signalwegs im Selenmangel wurde durch die Analyse von 84 Genen des Wnt-Signalwegs mit Hilfe eines PCR-Arrays unterstützt (Tab. 8). Da hier gepoolte Proben zum Einsatz kamen, wurden ausgewählte Gene in den 12 einzelnen Tieren einer Fütterungsgruppe mittels qPCR erneut untersucht. Die qPCR-Analyse ergab, dass die mRNA-Expression von Gsk3β, die den Signalweg hemmt, im Selenmangel reduziert war, während β-Catenin, Lef1, Tle2, c-Myc und Dvl2 stärker exprimiert wurden (Abb. 7).

In Säugern existieren drei Mitglieder der Dishevelled-Familie, Dvl1, 2 und 3, die eine hohe Homologie aufweisen. In verschiedenen Zelllinien konnte gezeigt werden, dass der Dvl-Pool der Zelle zu etwa 95 % aus Dvl2 besteht, während Dvl1 und 3 zusammen die restlichen 5 % ausmachen [174]. Im murinen Colon waren allerdings alle drei Isoformen relativ gleichmäßig exprimiert (Microarraydaten). Die drei Isoformen bilden einen heterotrimeren Komplex, der für die Vermittlung von Wnt-Signalen notwendig ist, wobei die Regulation vermutlich vorrangig über Dvl1 und Dvl3 erfolgt [174]. Mittels qPCR wurde neben Dvl2 auch Dvl1 untersucht, dessen Expression im Selenmangel ebenfalls tendenziell gesteigert war, allerdings war dies nicht signifikant (Tab. 8).

Bei GSK3β handelt es sich um eine multifunktionale Serin/Threonin-Kinase, unter deren Kontrolle mehr als 40 verschiedene Proteine stehen, die an einer Vielzahl von Prozessen

beteiligt sind [175]. Neben  $\beta$ -Catenin werden z.B. auch die Transkriptionsfaktorsysteme p53, AP-1, NF- $\kappa$ B und Nrf2 durch GSK3 $\beta$  reguliert. Eine Hemmung der GSK3 $\beta$  resultiert z.B. in der nukleären Akkumulation von Nrf2 und vermehrter Transkription des Zielgens NADPH-Quinonoxidoreduktase (NQO1) [176]. Auch in den hier untersuchten Mäusen wurden im Selenmangel die Nrf2-Zielgene NQO1 und Hämoxxygenase 1 (HO-1) stärker exprimiert (Abb. 6 C und D). Dies passt mit Ergebnissen vorangegangener Studien mit selendefizienten Tieren zusammen, die ebenfalls zeigen, dass Selenmangel zur kompensatorischen Induktion antioxidativer und fremdstoff-metabolisierender Enzyme beiträgt [177]. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 wurde bisher auf einen erhöhten oxidativen Stress durch den Verlust bestimmter Selenoproteine zurückgeführt [178]. Die Modifikation der GSK3 $\beta$ -Expression stellt einen weiteren möglichen Regulationsmechanismus dar. GSK3 $\beta$  verbindet außerdem den Wnt-Signalweg mit dem mTOR-Signalweg, der vor allem das Zellwachstum reguliert. Die Bildung eines TSC-Komplexes (*tuberous sclerosis tumor-suppressor*) wird durch eine aktivierte GSK3 $\beta$  vermittelt und hemmt den Signalweg. Im Selenmangel wäre also unter physiologischen Bedingungen neben dem Wnt-Signalweg auch der mTOR-Signalweg aktiver, was insgesamt in einer gesteigerten Proliferation und einem gesteigerten Zellwachstum resultieren würde. Ob GSK3 $\beta$  als Tumorsuppressor oder Tumorpromotor fungiert, wird entscheidend vom umgebenden Gewebe bestimmt. In colorektalen Adenokarzinomen wird GSK3 $\beta$  verstärkt exprimiert und gilt hier als Tumorpromotor [179], der für das Tumorstadium benötigt wird. Der Knockout von GSK3 $\beta$  ergab, dass dieser Effekt nicht über  $\beta$ -Catenin, dessen nukleäre Translokation unverändert blieb, sondern über NF $\kappa$ B vermittelt wird [179, 180].

TLE2, das als Mitglied der TLE/Groucho-Familie in Abwesenheit von  $\beta$ -Catenin als Korepressor von TCF fungiert, wurde ebenfalls im Selenmangel verstärkt exprimiert. Im Kontext einer Aktivierung des Wnt-Signalwegs im Selenmangel wäre hier eine verminderte Expression zu erwarten gewesen. Allerdings beeinflussen Mitglieder der TLE/Groucho-Familie nicht nur den Wnt-Signalweg, sondern unter anderem auch den delta-Notch-Signalweg und bilden so ein Netzwerk von Signalwegen, das während der embryonalen Entwicklung von Bedeutung ist [181]. TLE-Proteine scheinen außerdem an der Tumorigenese beteiligt zu sein. So führt z.B. die Überexpression von TLE1 zur Entstehung von Adenokarzinomen in der Lunge [182]. Auch in Karzinomen des Colons werden Mitglieder der TLE/Groucho-Familie verstärkt exprimiert [183]. Diese veränderte Expression führt aber weniger zu einer Hemmung des Wnt-Signalwegs als vielmehr zu einer Deregulation des delta-Notch-Signalwegs, was zur Entartung der Zellen beiträgt [181, 184]. Außerdem kann TLE auch mit c-Myc interagieren und so das Bindungsprofil des Transkriptionsfaktors modulieren [185].

Die gesteigerte Expression von c-Myc, einem Zielgen des Wnt-Signalwegs [109], ist ein Hinweis dafür, dass nicht nur die mRNA-Expression der genannten Gene durch Selen verändert wird, sondern Selenmangel tatsächlich zu einer gesteigerten Aktivität des Wnt-Signalwegs führt. Die Expressionssteigerung von c-Myc wiederum, das ebenfalls ein Transkriptionsfaktor ist, hat Auswirkungen auf eine Reihe weiterer Zielgene. Auch Lef1 wurde als  $\beta$ -Catenin Zielgen identifiziert [186, 187], ebenso wie Dvl2 [188]. Außerdem scheint  $\beta$ -Catenin selbst über eine Rückkopplungsschleife verstärkt exprimiert zu werden. In Desmoid-Tumoren konnte gezeigt werden, dass aktivierende Mutationen des Wnt-Signalwegs mit erhöhter mRNA-Expression von  $\beta$ -Catenin einhergehen [189]. Auch in dem in dieser Arbeit verwendeten Modell der HT-29-Zellen mit einem durch Zink induzierbaren Wildtyp-APC führte die Hemmung des Wnt-Signalwegs durch Zink-Gabe zu reduzierter  $\beta$ -Catenin-mRNA-Expression (Abb. 18).

Die vorgestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass im marginal defizienten Selenmangel unter physiologischen Bedingungen der Wnt-Signalweg aktiver ist als bei selenadäquater Versorgung. Kommt es zur Tumorentstehung, so kann möglicherweise im Selenmangel die sich anschließende Promotion des Tumors schneller vorangetrieben werden, weil die mRNA insbesondere für  $\beta$ -Catenin, c-Myc und TLE2, die alle verstärkt während der Tumorentwicklung exprimiert werden, schon vermehrt vorliegt. Selenmangel resultiert also möglicherweise in einem Wachstumsvorteil für die Tumorzellen. Dies passt mit der Tatsache zusammen, dass Selen die Zellproliferation hemmt, indem es zu Zellzyklusarrest und Apoptose führt [138, 139, 141].

Im vorliegenden Tierversuch diente Selenomethionin als Selenquelle, da diese Selenverbindungen vorrangig in Torulahefe zu finden ist [8]. Selenomethionin kann entweder anstelle von Methionin unspezifisch in Proteine eingebaut oder dem Selenpool zur Verfügung gestellt werden. Es ist unklar, ob der in dieser Arbeit untersuchte Effekt auf die Expression von Nicht-Selenoproteinen durch Metabolite des Selenomethionins oder durch neu synthetisierte Selenoproteine hervorgerufen wird. Ein potentieller Kandidat unter den Selenoproteinen ist SelH, ein DNA-Bindeprotein, das die Expression von Redox-sensitiven Genen reguliert. Im Selenmangel werden außerdem vor allem die Selenoproteine weniger exprimiert, die an Redoxreaktionen beteiligt sind. Dadurch ist das Redoxgleichgewicht in der Zelle verändert [177, 190], was nicht nur ein Transkriptionsfaktorsystem betrifft, sondern mehrere redox-sensitive Transkriptionsfaktoren wie Nrf2 und NF $\kappa$ B [191]. Ein möglicher Angriffspunkt für die Redoxregulation des Wnt-Signalwegs stellt Nukleoredoxin dar. Die Expression von Nukleoredoxin ist durch Selen zwar nicht verändert (Tab. 8), allerdings kann es posttranslational an Thiol-Gruppen exponierter Cysteine modifiziert werden. Dvl, das dann aus der Bindung mit Nrx entlassen wird, kann GSK3 $\beta$  hemmen und so zur Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin führen.

## 4.2 Regulation der GPx2 durch den Wnt-Signalweg

Die Beeinflussung des Wnt-Signalwegs durch den Selenstatus hat weitreichende Konsequenzen, da dieser für die Regulation von Genen zuständig ist, die Proliferationsvorgänge steuern. Der Einfluss von Selen auf die Regulation von  $\beta$ -Catenin-Zielgenen konnte exemplarisch für c-Myc gezeigt werden, das im Selenmangel vermehrt exprimiert wurde. Die meisten Zielgene des Wnt-Signalwegs haben gemeinsam, dass sie über eine oder mehrere funktionelle TCF-Bindestellen in ihrem Promotor verfügen. Die Analyse des Promotors des Selenoproteins GPx2 ergab das Vorhandensein fünf potentieller TCF-Bindestellen. Bisher wurden bei keinem anderen Selenoprotein TCF-Bindestellen identifiziert. Außerdem scheint GPx2 notwendig zu sein, um die Proliferation in undifferenzierten Stammzellen des Darms aufrechtzuerhalten. Für die spezifische Architektur des Darms ist vor allem der Wnt-Signalweg verantwortlich, indem er im aktiven Zustand für die Proliferation der undifferenzierten Zellen sorgt und im inaktiven Zustand ihre Differenzierung ermöglicht. Der Wnt-Signalweg ist also im Kryptengrund, wo sich die Stammzellen befinden, am aktivsten und seine Aktivität nimmt mit dem Grad der Ausdifferenzierung der Epithelzellen in Richtung Villuspitze ab. Dies korreliert direkt mit dem Expressionsmuster der GPx2. Außerdem ist ein konstitutiv aktiver Wnt-Signalweg charakteristisch für viele entartete Zellen, in denen häufig auch vermehrt GPx2 exprimiert wird. Van de Wetering *et al.* identifizierten GPx2 in einer Krebszelllinie mittels Microarrayanalyse als eines der durch Hemmung des Wnt-Signalwegs regulierten Gene [147]. Ziel dieser Arbeit war es nun, diesen möglichen Zusammenhang genauer zu untersuchen.

Zunächst wurde die basale Promotoraktivität des humanen GPx2-Promotors in drei verschiedenen Zelllinien mit unterschiedlich aktivem Wnt-Signalweg untersucht. Der Vergleich ergab, dass die basale Aktivität des GPx2-Promotors mit der Aktivität des Wnt-Signalwegs korrelierte (Abb. 8). Die folgenden Kotransfektionsstudien mit Expressionsplasmiden für Wildtyp  $\beta$ -Catenin (Abb. 9 A) und mutiertes  $\beta$ -Catenin (S33YCat) (Abb. 9 B), die mit TCF4 kombiniert wurden, APC (Abb. 10 A) und dnTCF4 (Abb. 10 B) dienten der Modifizierung der Aktivität des Wnt-Signalwegs und der Untersuchung ihrer Effekte auf die GPx2-Promotoraktivität. Die verwendeten Expressionsplasmide und ihr Einsatz in verschiedenen Zelllinien sind etablierte Instrumente zur Untersuchung möglicher  $\beta$ -Catenin-Zielgene [120, 192]. Die Promotoranalysen wurden in verschiedenen Zelllinien durchgeführt, was für ihre Validität spricht. Außerdem konnte auch der murine GPx2-Promotor durch Kotransfektion mit  $\beta$ -Catenin und TCF aktiviert werden (Daten nicht gezeigt). In 3T3-Zellen, murinen immortalisierten Fibroblasten, konnte der GPx2-Promotor durch stabile Transfektion eines Expressionsplasmids für Wnt3a aktiviert werden (Abb. 11). Gebildetes Wnt3a wird von der Zelle ins Medium sezerniert und kann auto- bzw. parakrin an seine Rezeptoren binden, was den Wnt-

Signalweg aktiviert. Es ist bekannt, dass die Stimulation mit Wnt3a das Reporter-genplasmid Topflash aktiviert, das drei Kopien des TCF-Bindeelements enthält [193]. Außerdem induziert Wnt3a die Protein-Expression von  $\beta$ -Catenin und CyclinD1, einem weiteren bekannten  $\beta$ -Catenin-Zielgen [105]. Insgesamt konnte also mit verschiedenen Ansätzen und mehreren Zelllinien gezeigt werden, dass der GPx2-Promotor durch den Wnt-Signalweg reguliert wird. Studien mit verkürzten Promotorkonstrukten (Abb. 13) und die Punktmutation eines potentiellen TCF-Bindeelements (Abb. 14) ergaben, dass es sich bei TBE 5 um ein funktionelles responsives Element handelt, das für die Aktivierbarkeit des Promotors durch  $\beta$ -Catenin und TCF zuständig ist.

Ob dies auch für die endogene GPx2-Expression relevant ist, wurde mit Hilfe der folgenden Versuchsansätze untersucht. Zunächst erfolgte die Hemmung des aktiven Signalwegs in HepG2-Zellen durch transiente Transfektion mit dnTCF4. Dies ergab eine reduzierte Expression der GPx2 auf mRNA- und Proteinebene, die auf Proteinebene im Selenmangel deutlicher ausgeprägt war (Abb. 15). Dieser Ansatz wurde unter anderem auch zur Identifizierung von iNOS als  $\beta$ -Catenin-Zielgen herangezogen [194]. Stabil transfizierte HT-29-Zellen mit Wildtyp-APC unter der Kontrolle eines Zink-induzierbaren Promotors [163] wurden zur Identifizierung von folgenden  $\beta$ -Catenin-Zielgenen eingesetzt: c-Myc [109], ITF-2 [195], PPAR $\delta$  [196], Gastrin [197], HDAC2 [198], Axin2 [199] und COX-2 [106, 107]. Da GPx2 auf Proteinebene nur bei vorhandenem Selen vermehrt synthetisiert werden kann und einmal gebildetes Protein sehr stabil ist, wurden die Zellen zunächst ohne Selen ausgesät. Parallel zur Stimulation mit ZnCl<sub>2</sub> erfolgte die Selengabe, die nur in Zellen mit aktivem Wnt-Signalweg zu einer erhöhten GPx2-Expression führte (Abb. 19). Die Effekte konnten auf mRNA-Ebene bestätigt werden (Abb. 18). Außerdem führte die Induktion von Wildtyp-APC zu einer Abnahme der  $\beta$ -Cateninexpression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene (Abb. 18 und 19). Dies wurde in keiner der angegebenen Arbeiten gezeigt und deutet darauf hin, dass  $\beta$ -Catenin möglicherweise über einen Rückkopplungsmechanismus induziert wird. Drittens konnte durch Aktivierung des Signalwegs in 3T3-Zellen durch Wnt3a die endogene GPx2-Expression auf mRNA-Ebene induziert werden (Abb. 16). Die vermehrte Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern als Reaktion auf den Wnt3a-Stimulus konnte in humanen mesenchymalen Stammzellen bereits gezeigt werden [200], diese trat aber auch in 3T3-Zellen auf. Verschiedene Ansätze in verschiedenen Zelllinien ergaben also einstimmig, dass auch die endogene GPx2-Expression durch den Wnt-Signalweg reguliert wird. GPx2 ist deshalb der Reihe der  $\beta$ -Catenin-Zielgene hinzuzufügen.

Die Frage der transkriptionellen Regulation von Selenoproteinen ist in den meisten Fällen nur unzureichend beantwortet. Da die Mitglieder der Familie der Glutathionperoxidasen deutliche Unterschiede in ihrer Funktion und Lokalisation aufweisen [68, 201], ist auch von einer

unterschiedlichen transkriptionellen Regulation auszugehen. Zur Regulation der GPx2 ist bereits einiges bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass GPx2 potentielle Retinsäure-responsive Elemente besitzt und durch all-*trans*-Retinsäure induziert werden kann [84, 85]. Ob die responsiven Elemente für diese Induktion notwendig sind, wurde allerdings nicht untersucht. Die Regulation der GPx2 durch das Nrf2-Keap-System, das protektive Enzyme aktiviert, wurde hingegen ausführlicher untersucht. GPx2 wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch den Nrf2-Aktivator Sulforaphan induziert. Die Bindung von Nrf2 an eines der potentiellen responsiven Elemente (ARE) im GPx2-Promotor konnte gezeigt werden [86]. Da es sich bei Nrf2 um einen ubiquitären Transkriptionsfaktor handelt, lässt sich mit diesem die gewebespezifische Expression von GPx2 nicht erklären. Außerdem wird GPx2 durch  $\Delta$ Np63 aktiviert, einen Transkriptionsfaktor, der für undifferenzierte Zellen charakteristisch ist und in vielen Krebszellen verstärkt exprimiert wird [87]. Dieser zuletzt genannte Regulationsmechanismus kann einen Erklärungsansatz für die spezifische Expression der GPx2 in der proliferativen Zone des Darms und in entarteten Zellen liefern. Inwieweit sich die genannten Transkriptionsfaktorsysteme und die Regulation der GPx2 durch den Wnt-Signalweg gegenseitig beeinflussen, bleibt näher zu untersuchen.

### 4.2.1 Konsequenzen der GPx2-Regulation durch $\beta$ -Catenin im gesunden Gewebe

Welche Konsequenzen ergeben sich nun aus dieser Regulation? Unter physiologischen Bedingungen ist der Wnt-Signalweg zunächst unverzichtbar für die kontinuierliche Erneuerung und Aufrechterhaltung des intestinalen Epithels [202]. Wird der Signalweg herunterreguliert, führt dies zu vermehrter zellulärer Differenzierung der Epithelzellen. In undifferenzierten Ca-Co-2-Zellen wurde durch die Hemmung des Wnt-Signalwegs die Promotoraktivität der alkalischen Phosphatase und des intestinalen Fettsäure-bindenden Proteins erhöht, die beide etablierte Marker für die zelluläre Differenzierung darstellen [203]. Die einzige Ausnahme sind die Panethzellen, die einen aktiven Wnt-Signalweg für ihre Differenzierung benötigen. Kleine Schwankungen im  $\beta$ -Catenin-Gehalt, die kaum einen Einfluss auf die Kryptenarchitektur haben, ergeben bereits deutliche Störungen der Panethzellendifferenzierung [204]. Wie die Differenzierung der Panethzellen genau reguliert wird, ist bisher noch unklar, allerdings könnte auch hier die vermehrt exprimierte GPx2 eine Rolle spielen. Ebenso wie in differenzierten Epithelzellen resultiert auch in colorektalen Krebszelllinien die Hemmung des Wnt-Signalwegs z.B. durch dnTCF im G1-Zellzyklus-Arrest, der durch verminderte Expression von an der Proliferation beteiligten Genen herbeigeführt wird. Eines dieser Gene ist GPx2 [147]. Der Knockout von TCF4 zeigt, dass die Hemmung des Wnt-Signalwegs im Colon zum Verlust des Stammzellkompartiments durch vorzeitige Differenzierung der Kryptenzellen führt, was bereits zwei Wochen nach der Geburt letal ist [120]. Ein Knockout von GPx2 führt zu einem ähnlichen Phänotyp, der mit verkürzten Villi im Dünndarm und veränderter Lokali-

sation der undifferenzierten Zellen einhergeht [205]. Dieser Phänotyp ist allerdings weniger stark ausgeprägt und im Gegensatz zum TCF4-Knockout nicht letal. Welches allerdings der zugrunde liegende Mechanismus für die Beeinflussung der Proliferation durch GPx2 ist, bleibt näher zu untersuchen. Eine Möglichkeit ist die Hemmung der Apoptose durch die Reduktion des zellulären Hydroperoxidlevels. MCF-7-Zellen, die GPx2 überexprimieren, zeigen eine reduzierte Sensitivität gegenüber durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierte Apoptose [87]. Erhöhte Apoptoseraten wurden außerdem im Kryptengrund des Ileums von GPx1/GPx2-Knockout-Mäusen gemessen [82]. Die Hemmung von Apoptose konnte auch für andere Glutathionperoxidasen wie GPx1 und GPx4 gezeigt werden [206-208]. Im gesunden Intestinaltrakt scheint GPx2 an der gerichteten Proliferation und somit an der Erhaltung des intestinalen Epithels beteiligt zu sein. Ihre abnehmende Expression in Richtung Villusspitze begünstigt möglicherweise einen erhöhten zellulären Hydroperoxidgehalt, der zu gerichteter Apoptose führt. Dies und die Beantwortung der Frage, inwieweit GPx2 an der Differenzierung der Panethzellen beteiligt ist, benötigt weitere Untersuchungen.

### **4.2.2 Konsequenzen der GPx2-Regulation durch $\beta$ -Catenin in entarteten Zellen**

Die Entartung einer Zelle geht im Intestinaltrakt in über 80 % der Fälle mit einer Mutation des APC-Gens einher. Diese oder andere Mutationen von Proteinen des Wnt-Signalwegs führen zu dessen konstitutiver Aktivierung und damit zu einer unkontrollierten Proliferation. Die Regulation von GPx2 durch  $\beta$ -Catenin erklärt, weshalb GPx2 in vielen Tumoren verstärkt exprimiert wird. Da GPx2 Teil des in einer entarteten Zelle durch  $\beta$ -Catenin aktivierten Expressionsprofils ist, muss es als prokanzerogenes Enzym eingestuft werden. Bisher wurde GPx2 aufgrund folgender Fakten als antikanzerogen klassifiziert: (I) Zunächst entwickeln GPx1/GPx2-Knockout-Mäuse intestinale Tumore, die durch chronische Ileocolitis hervorgerufen werden [82]. Dieser Phänotyp kann durch ein intaktes GPx2-Allel deutlich verbessert werden. Außerdem sind GPx2-Knockout-Mäuse anfälliger gegenüber durch UV-Licht induzierten Hautkrebs als Wildtyp-Tiere [209]. (II) Die Regulation der GPx2 durch Nrf2, das vorrangig protektive Enzyme induziert, deutet in dieselbe Richtung. Die Verbindung zwischen Nrf2-regulierten Enzymen und antikanzerogenen Effekten beruht auf Untersuchungen in Nrf2-Knockout-Mäusen, die nach Behandlung mit Benzo[a]pyren eine höhere Tumorzinzidenz im Magen aufwiesen als Wildtyp-Tiere [210]. (III) In HT-29-Zellen, in denen die GPx2-Expression mittels siRNA herunterreguliert wurde, wird vermehrt COX-2 exprimiert, was dafür spricht, dass GPx2 in dieser Krebszelllinie die COX-2-Expression unterdrückt. Als Mechanismus wird die Reduktion des Hydroperoxidlevels in bestimmten Kompartimenten durch GPx2 postuliert, die für die Aktivierung der COX-2 notwendig ist [211, 212]. Dies führt zur Unterbrechung der autokrinen Schleife, in der das aus PGH<sub>2</sub> synthetisierte PGE<sub>2</sub> die Expression der COX-2 induziert [213]. Auch GPx4 kann so die COX-2-Aktivität hemmen [214]. Das

prokanzerogene Prostaglandin E<sub>2</sub> kann wie unter 1.2 beschrieben unabhängig von einem Wnt-Signal die Aktivierung des Wnt-Signalwegs herbeiführen [112]. Die Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Produktion durch GPx2 würde dem in Form eines negativen Rückkopplungsmechanismus entgegenwirken. COX-2 ist in 85 % der colorektalen Tumore exprimiert [215], was hauptsächlich auf seine Regulation durch  $\beta$ -Catenin zurückzuführen ist [106, 107]. Deshalb ist in Tumorzellen häufig auch die PGE<sub>2</sub>-Produktion erhöht [216]. Es ist bekannt, dass eine chronische Entzündung die Entstehung von Krebs begünstigen kann [136]. Eine medikamentöse Hemmung der COX-2-Aktivität ist mit einer verminderten Tumorzinzidenz verbunden, was sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen gezeigt werden konnte [217]. Eine erhöhte COX-2-Expression und die damit verbundene PGE<sub>2</sub>-Produktion kann die Transformation umliegender Epithelzellen herbeiführen [218]. Eine Hemmung der COX-2 durch GPx2 *in vivo* würde die chronische Entzündung und die sich anschließenden prokanzerogenen Effekte mindern. (IV) Die weitere Charakterisierung der GPx2-*knockdown*-Zellen ergab, dass die Aktivierung der COX-2 ihr Migrations- und Invasionsvermögen erhöhte, was bereits für andere COX-2 überexprimierende Krebszelllinien gezeigt werden konnte [219]. Daraus wird geschlossen, dass GPx2 durch Hemmung der COX-2 die zelluläre Migration und Invasion hemmen kann [211]. Da alle Glutathionperoxidasen prinzipiell die Aktivität der COX-2 hemmen können, haben sie folglich auch antimetastatisches Potential. Für GPx4 konnte dies mit Hilfe von GPx4-überexprimierenden L929-Zellen gezeigt werden, die in Nacktmäusen weniger Lungenmetastasen entwickeln als Wildtyp-Zellen [220]. Die Supplementation mit Selen, die in der Regel mit Veränderungen der GPx1-Expression einhergeht, reduzierte durch Melanomzellen hervorgerufene Lungenmetastasen in Mäusen [221] und die Invasivität von HT1080-Zellen [143].

Neben der Regulation der GPx2-Expression durch  $\beta$ -Catenin gibt es aber auch noch weitere Hinweise, die für eine prokanzerogene Funktion der GPx2 sprechen: (I) Die antiapoptotische Aktivität der GPx2, die im gesunden Darm für die gerichtete Entwicklung des Epithels unerlässlich ist, bietet einer Krebszelle möglicherweise einen Wachstumsvorteil. (II) Außerdem zeigen GPx2-*knockdown*-Zellen weniger verankerungsunabhängiges Wachstum im Soft-Agar und produzieren kleinere Tumore nach Injektion in Nacktmäuse [211]. Das proliferationsfördernde Potential der GPx2 in Wildtyp-Zellen kann also durch die erhöhte COX-2-Expression in den GPx2-*knockdown*-Zellen nicht vollständig kompensiert werden. Vergleichbare Ergebnisse liegen auch zum Selenoprotein Thioredoxinreduktase 1 vor. Wie GPx2 wird TrxR1 in vielen Tumoren überexprimiert [222] und ihr *knockdown* resultiert ebenfalls in reduziertem Wachstum im Soft-Agar und in Nacktmäusen [223]. Für beide Selenoproteine scheint zu gelten, dass sie nicht eindeutig als pro- oder antikanzerogen einzustufen sind. In der Initiationsphase der Tumorentstehung kann GPx2 die Zelle vor oxidativen Schädigungen

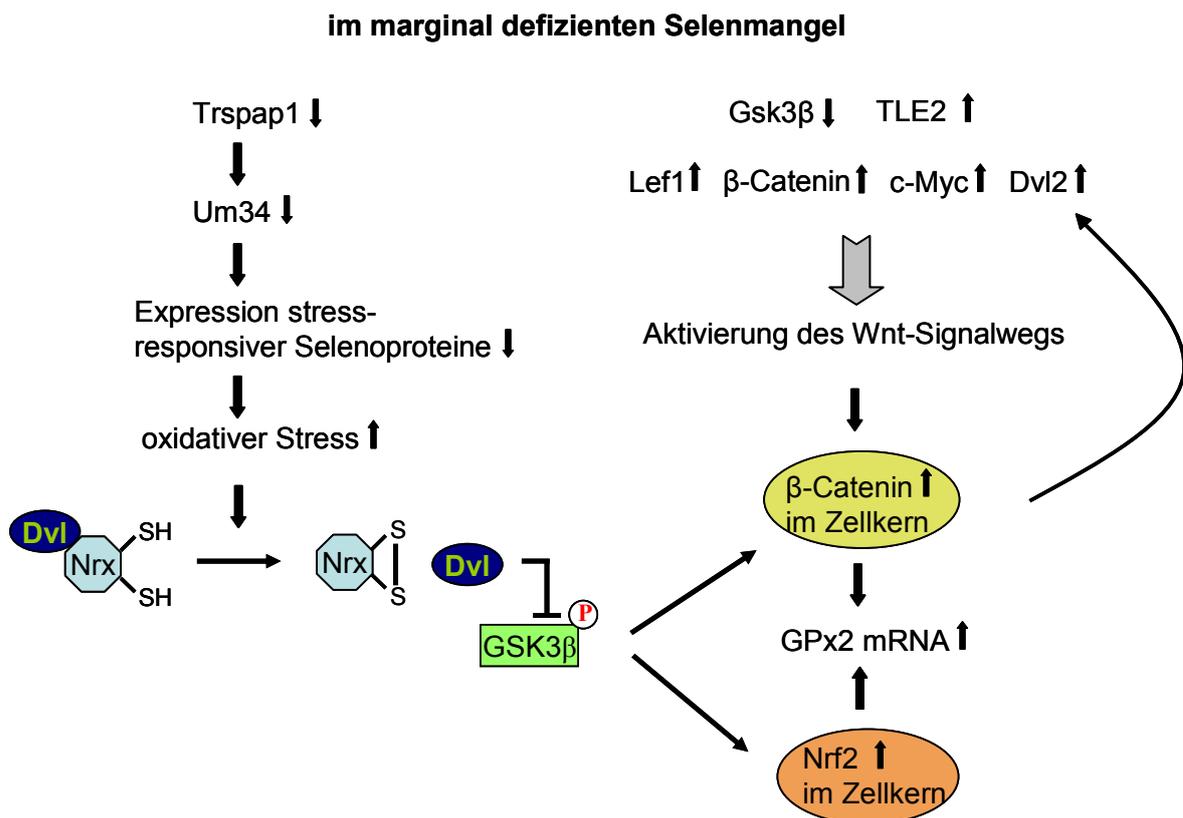
schützen und durch Hemmung der COX-2 die Produktion des proinflammatorischen Cytokins PGE<sub>2</sub> reduzieren. In transformierten Zellen kann GPx2 durch Hemmung der Invasion und Migration, die beide Teil der Metastasierung sind, protektiv wirken. Ist der Tumor allerdings schon entstanden, so wirkt GPx2 als Überlebensfaktor, in dem es die Proliferation fördert und möglicherweise die Apoptose der Krebszellen unterbindet [211]. Florian *et al.* konnten zeigen, dass die Expression von GPx2 vor allem in frühen Adenomen erhöht ist. Im weiteren Verlauf der Tumorentwicklung nimmt die GPx2-Expression wieder ab [75], was dafür spricht, dass GPx2 in verschiedenen Tumorstadien unterschiedliche Aufgaben hat. Schon 1986 wurde für den Einfluss von Selen auf die Kanzerogenese ein ähnlicher Verlauf postuliert. So konnten verschiedene Selenverbindungen die Tumorentstehung hemmen, während ihr Einfluss auf bereits existierende Tumore gering oder sogar wachstumsfördernd war [224].

### 4.3 Selen und Wnt-Signalweg

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Mikronährstoff Selen und der Wnt-Signalweg an mehreren Stellen miteinander interagieren. Dies gilt auch für andere Mikronährstoffe. So reduziert z.B. Retinol in humanen Krebszelllinien den cytosolischen  $\beta$ -Catenin-Gehalt, indem es den Abbau von  $\beta$ -Catenin über das Proteasom erhöht. Folglich wird die Expression der  $\beta$ -Catenin-Zielgene CyclinD1 und c-Myc durch Retinol reduziert [225]. Auch Vitamin D in Form von 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxy-VitaminD (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) kann den Wnt-Signalweg hemmen, in dem es E-Cadherin induziert und die Translokation von  $\beta$ -Catenin aus dem Zellkern an die Membran durch Bindung an den Vitamin-D-Rezeptor herbeiführt [226]. Außerdem kann 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> Dickkopf1 [227] und Dickkopf4 [228] induzieren. Dickkopfproteine sind extrazelluläre Wnt-Inhibitoren, die die Bildung des Rezeptorkomplexes an der Plasmamembran durch Bindung an LRP hemmen [116]. Ein kombinierter marginaler Mangel an Folat, Vitamin B2, B6 und B12 führt zu einer Aktivierung des Wnt-Signalwegs im Colon von Mäusen, was ihre Anfälligkeit gegenüber einer neoplastischen Transformation erhöht. In der Gruppe mit kombiniertem Mangel kommt es am häufigsten zu Strangbrüchen im APC-Gen, was in einer verminderten Expression von APC resultiert. Dadurch wird wiederum die Expression von  $\beta$ -Catenin und CyclinD1 induziert, was mit einer Hemmung der Apoptoserate einhergeht [229].

Selen hingegen kann über einen bisher ungeklärten Mechanismus die mRNA-Expression von Komponenten des Wnt-Signalwegs so beeinflussen, dass es im Selenmangel zu dessen Aktivierung kommen kann. Dass es tatsächlich zu einer Aktivierung kommt, wird aufgrund der verstärkten Expression des Zielgens c-Myc vermutet. Microarrayanalysen in mit Selenomethionin behandelten HCT116-Zellen, einer humanen kolorektalen Krebszelllinie, ergaben ebenfalls eine erhöhte c-Myc-Expression im Selenmangel [230]. Auch Narayanan *et al.* untersuchten den Einfluss von Selen auf die Expression von an der Kanzerogenese beteiligten

Genen in CaCo2-Zellen mit Hilfe der synthetischen Organoselenverbindung 1,4-Phenylen-Bismethylen-Selenocyanat (p-XSC). Diese Verbindung ist weniger toxisch als andere Selenverbindungen und kann deshalb in höheren Konzentrationen eingesetzt werden. Eine Stimulation mit 5  $\mu\text{M}$  p-XSC für 48 h führte zu einer Senkung der  $\beta$ -Catenin- und CyclinD1-Expression [231]. In einem durch DMBA (7,12-Dimethylbenz[a] Anthrazen) induzierten Rattenbrustkrebsmodell wirkten p-XSC und das entsprechende Glutathionkonjugat antikanzerogen. Genexpressionsanalysen identifizierten auch hier c-Myc als im Selenmangel induziertes Gen [232]. Ein möglicher Erklärungsansatz für die Aktivierung des Wnt-Signalwegs in den in dieser Arbeit untersuchten Mäusen ist die Veränderung des zellulären Redoxstatus durch verminderte Expression stress-responsiver Selenoproteine im Selenmangel, die vorrangig an Redoxreaktionen beteiligt sind. Durch Oxidation von Thiolgruppen von z.B. Nukleoredoxin kann so unabhängig von einem Wnt-Signal über Dishevelled der Signalweg aktiviert werden (Abb. 20). Ob weitere Proteine des Signalwegs auf ähnliche Weise beeinflusst werden können, bleibt zu klären.



**Abb. 20. Modell zum Zusammenhang zwischen Selen, der GPx2-Expression und dem Wnt-Signalweg**

Eindeutig wurde mit GPx2 das erste Selenoprotein als Zielgen des Wnt-Signalwegs identifiziert. Um die GPx2-Proteinexpression zu gewährleisten, müssen allerdings sowohl ein intakter Wnt-Signalweg als auch genügend Selen zur Verfügung stehen. Da der Wnt-Signalweg

im Selenmangel aktiver ist, würde dies in einer Erhöhung der GPx2-Transkription resultieren. Dies muss sich allerdings, bedingt durch den komplexen Mechanismus der Selenoprotein-synthese, nicht unbedingt auf Ebene der Translation widerspiegeln. Wie bereits unter 1.1.3 beschrieben, ist der Einbau von Selenocystein ein kotranslationaler Prozess, der das Vorhandensein der mit Selenocystein beladenen tRNA<sup>[ser]/sec</sup> erfordert, was maßgeblich von der Verfügbarkeit des Selens abhängt. Da GPx2 zur Gruppe der *housekeeping*-Selenoproteine gehört, kann sie trotz limitierter Selenversorgung, die bei den Tieren der marginal defizienten Fütterungsgruppe herrschte, exprimiert werden. Außerdem wird im Selenmangel die mRNA von Selenoproteinen entsprechend ihrer hierarchischen Stellung abgebaut. Da GPx2 hoch in der Hierarchie der Selenoproteine steht, was mit einer sehr stabilen mRNA einhergeht [26, 233], macht eine Erhöhung der mRNA-Expression im Selenmangel durchaus Sinn. Da die Hemmung der GSK3 $\beta$  nicht nur zu einer Aktivierung von  $\beta$ -Catenin, sondern auch von Nrf2 führt, kommt es hier vermutlich zu einer additiven Beeinflussung der GPx2 mRNA-Expression. Die Aktivierung des GPx2-Promotors durch Kotransfektion mit  $\beta$ -Catenin und TCF und gleichzeitige Stimulation mit Sulforaphan, einem Nrf2-Aktivator, konnte dies bestätigen (Daten nicht gezeigt). Bei verfügbarem Selen kann dann sofort die Translation der GPx2 gestartet werden. Möglicherweise führt GPx2 dann im selenadäquaten Zustand zu einer negativen Rückkopplungsschleife, die durch Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Produktion und Beeinflussung des Redoxgleichgewichts die Aktivität des Wnt-Signalwegs herunterreguliert. Die Frage, ob die verstärkte Expression der GPx2 einer prä-malignen Entartung zuträglich ist oder ihr entgegen wirkt, bleibt allerdings weiter offen.

#### 4.4 Ausblick

Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse bieten eine Vielzahl von Möglichkeiten für weiterführende Experimente. Zunächst ergab die Untersuchung der Selenoproteinexpression während eines marginalen Selenmangels, dass neben GPx1 vor allem die Selenoproteine W, M und H vermindert exprimiert wurden. Die weitere Analyse ihrer genauen Funktionen ist von großer Bedeutung, um die Konsequenzen einer marginal defizienten Selenversorgung, wie sie in weiten Teilen der europäischen Bevölkerung vorliegt, besser zu kennen. Während über den Einfluss von Selen auf die Expression von Selenoproteinen schon relativ viel bekannt ist, gibt es noch keine mechanistischen Studien zur Regulation von Nicht-Selenoproteinen durch Selen. Unbestritten ist, dass Selen einen Einfluss auf die Expression vieler Nicht-Selenoproteine hat. Ob dieser Effekt direkt z.B. über ein Selenoprotein, das als Transkriptionsfaktor fungiert (z.B. SelH), oder indirekt z.B. durch Redoxregulation von Transkriptionsfaktorsystemen geschieht, bleibt zu untersuchen. Dies gilt insbesondere für die Regulation des Wnt-Signalwegs. Hier bietet die Redoxregulation des Nukleoredoxins einen vielversprechenden Ansatzpunkt.

Bezüglich der Untersuchung der GPx2 als Zielgen des Wnt-Signalwegs wäre der nächste Schritt, den in dieser Arbeit aufgeklärten Zusammenhang auch *in vivo* zu zeigen. Ein geeignetes Modell dafür wären z.B. Mäuse mit einem induzierbaren Knockout des  $\beta$ -Catenin-Gens im Gastrointestinaltrakt oder einer  $\beta$ -Catenin-Überexpression. Die Regulation der GPx2 durch den Wnt-Signalweg liefert einen Erklärungsansatz für die spezifische Expression dieses Selenoproteins in den proliferierenden Zellen des Kryptengrunds und in differenzierten Panethzellen. An beiden Prozessen sind unterschiedliche Wnt-Liganden und Rezeptoren der Frizzled-Familie beteiligt. Hier wäre es von Interesse genauer zu klären, welches Wnt-Signal für die Expression der GPx2 verantwortlich ist. Nicht zuletzt gilt es, die Frage zu beantworten, welche Rolle GPx2 während der Kanzerogenese spielt. Zur Aufklärung dessen wäre die Charakterisierung eines GPx2-Knockouts in Kombination mit einem induzierbaren Darmkrebsmodell oder mit einer APC<sup>min</sup>-Maus geeignet. Der Zusammenhang zwischen GPx2 und COX-2, der in einem Zellkulturmodell gefunden wurde, könnte in den genannten Modellen ebenfalls näher untersucht werden, da sowohl GPx2 als auch COX-2 in Tumorzellen vermehrt exprimiert werden. Die mögliche Beeinflussung von Entzündungsvorgängen durch GPx2 sollte bei der Wahl des Darmkrebsmodells berücksichtigt werden und spricht für ein durch Entzündung verstärktes Modell.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Das seit 1957 als essentiell klassifizierte Spurenelement Selen vermittelt seine Funktion hauptsächlich durch seinen Einbau in Selenoproteine in Form der 21. proteinogenen Aminosäure Selenocystein. Insgesamt wurden 25 humane Gene für Selenoproteine identifiziert, deren genaue Funktion häufig noch nicht bekannt ist. Selen ist das einzige Mitglied aus der Gruppe der Mikronährstoffe, für das nach wie vor eine antikanzerogene Funktion vor allem in Bezug auf Darmkrebs postuliert wird. Die Grundlage dafür liefert eine Interventionsstudie, bei der 1.312 Probanden für 4,5 Jahre mit 200 µg Selen/Tag supplementiert wurden [132]. Dies resultierte in einer Senkung der Gesamtkrebsmortalität um 50 %. Die Fragen einer optimalen Selenzufuhr, die nicht nur den Bedarf deckt, sondern auch die Entfaltung der antikanzerogenen Wirkung von Selen gewährleistet und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind noch ungeklärt. Zudem liegt die Selenzufuhr bei einem Großteil der europäischen Bevölkerung unter den Empfehlungen. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit vier Wochen alte Mäuse für sechs Wochen marginal defizient (0,086 mg/kg Futter) bzw. selenadäquat (0,15 mg/kg Futter) gefüttert. Dieser geringe Unterschied im Selengehalt resultierte in einer Senkung des Plasmaselenspiegels der selenarmen Tiere auf 13 % und der GPx-Aktivität in der Leber auf 35 %. Zunächst wurde der Einfluss von Selen auf die globale Genexpression im murinen Colon mittels Microarray untersucht. Von den im Colon exprimierten Selenoproteinen reagierte die mRNA von SelW, SelH, GPx1 und SelM im Selenmangel besonders deutlich mit Expressionsverlust. Da diese Selenoproteine nicht nur im Colon, sondern auch in Leukozyten reguliert waren, sind sie auch als humane Biomarker für die in dieser Studie gewählte Schwankung des Selengehalts geeignet. Des Weiteren wurde auf Basis der Microarraydaten eine Signalweganalyse durchgeführt, die der Identifizierung krebsrelevanter Signalwege diente, um mögliche molekularbiologische Erklärungsansätze für die Rolle von Selen im Krebsgeschehen zu finden. Es zeigte sich, dass die mRNA von Schlüsselenzymen des Wnt-Signalwegs wie  $\beta$ -Catenin, Gsk3 $\beta$ , Dvl2, Tle2, Lef1 und c-Myc auf Schwankungen des Selengehalts reagiert. Vor allem die Induktion von c-Myc, einem Zielgen des Wnt-Signalwegs, deutet darauf hin, dass dieser im Selenmangel tatsächlich aktiver ist als bei selenadäquater Versorgung.

Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für die postulierte präventive Funktion von Selen gegenüber Darmkrebs ist die gastrointestinale Glutathionperoxidase (GPx2), die physiologisch in den proliferierenden Zellen des Kryptengrunds exprimiert wird. Die Regulation dieses Enzyms durch den Wnt-Signalweg, der ebenfalls in proliferierenden Zellen aktiv ist, konnte mittels Reportergenanalyse und endogen auf mRNA- und Proteinebene in Zellkultur gezeigt werden. Die Aktivierung verkürzter Promotorkonstrukte und die Mutation eines potentiellen Bindeelements identifizierten den für die Bindung von TCF und  $\beta$ -Catenin verant-

wortlichen Bereich. Als Zielgen des Wnt-Signalwegs scheint GPx2 zu den an Proliferationsprozessen beteiligten Genen zu gehören, was unter physiologischen Bedingungen die Aufrechterhaltung des intestinalen Epithels gewährleistet. Bei der Entstehung intestinaler Tumore, die in der Initiationsphase zu über 90 % mit einer konstitutiven Aktivierung des Wnt-Signalwegs einhergeht, wirkt GPx2 möglicherweise prokanzerogen. Die genaue Funktion von GPx2 während der Kanzerogenese bleibt weiter zu untersuchen.

### 6 LITERATUR

1. Schwarz, K. and C. Foltz, *Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration*. J. Am. Chem. Soc., 1957. **79**: p. 3292-3293.
2. Andreesen, J.R. and L.G. Ljungdahl, *Formate dehydrogenase of Clostridium thermoaceticum: incorporation of selenium-75, and the effects of selenite, molybdate, and tungstate on the enzyme*. J. Bacteriol., 1973. **116**(2): p. 867-73.
3. Flohé, L., W.A. Günzler, and H.H. Schock, *Glutathione peroxidase: a selenoenzyme*. FEBS Lett., 1973. **32**(1): p. 132-4.
4. Rotruck, J.T., et al., *Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase*. Science, 1973. **179**(73): p. 588-90.
5. Hatfield, D.L. and V.N. Gladyshev, *How selenium has altered our understanding of the genetic code*. Mol. Cell. Biol., 2002. **22**(11): p. 3565-76.
6. Jacob, C., et al., *Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2003. **42**(39): p. 4742-58.
7. Wessjohann, L.A., et al., *Selenium in chemistry and biochemistry in comparison to sulfur*. Biol. Chem., 2007. **388**(10): p. 997-1006.
8. Rayman, M.P., *The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up?* Br. J. Nutr., 2004. **92**(4): p. 557-73.
9. DGE, *Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr*. Umschau/Braus, Frankfurt, Deutschland, 2000.
10. Levander, O.A. and M.A. Beck, *Interacting nutritional and infectious etiologies of Keshan disease. Insights from coxsackie virus B-induced myocarditis in mice deficient in selenium or vitamin E*. Biol. Trace Elem. Res., 1997. **56**(1): p. 5-21.
11. Beck, M.A., *Antioxidants and viral infections: host immune response and viral pathogenicity*. J. Am. Coll. Nutr., 2001. **20**(5 Suppl): p. 384S-388S; discussion 396S-397S.
12. Ekmekcioglu, C., *Spurenelemente auf dem Weg ins 21. Jahrhundert – zunehmende Bedeutung von Eisen, Kupfer, Selen und Zink*. J Ernährungsmed, 2000. **2**: p. 18-23.
13. Rayman, M.P., *The importance of selenium to human health*. Lancet, 2000. **356**(9225): p. 233-41.
14. Thomson, C.D., et al., *Long-term supplementation with selenate and selenomethionine: selenium and glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) in blood components of New Zealand women*. Br. J. Nutr., 1993. **69**(2): p. 577-88.
15. Xia, Y., et al., *Effectiveness of selenium supplements in a low-selenium area of China*. Am. J. Clin. Nutr., 2005. **81**(4): p. 829-34.
16. Driscoll, D.M. and P.R. Copeland, *Mechanism and regulation of selenoprotein synthesis*. Annu. Rev. Nutr., 2003. **23**: p. 17-40.
17. Kryukov, G.V., et al., *Characterization of mammalian selenoproteomes*. Science, 2003. **300**(5624): p. 1439-43.

18. Behne, D., et al., *Studies on the distribution and characteristics of new mammalian selenium-containing proteins*. Analyst, 1995. **120**: p. 823-825.
19. Dikiy, A., et al., *SelT, SelW, SelH, and Rdx12: genomics and molecular insights into the functions of selenoproteins of a novel thioredoxin-like family*. Biochemistry, 2007. **46**(23): p. 6871-82.
20. Ferguson, A.D., et al., *NMR structures of the selenoproteins Sep15 and SelM reveal redox activity of a new thioredoxin-like family*. J. Biol. Chem., 2006. **281**(6): p. 3536-43.
21. Bosl, M.R., et al., *Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (Trsp)*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1997. **94**(11): p. 5531-4.
22. Yant, L.J., et al., *The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults*. Free Radic. Biol. Med., 2003. **34**(4): p. 496-502.
23. Conrad, M., et al., *Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function*. Mol. Cell. Biol., 2004. **24**(21): p. 9414-23.
24. Papp, L.V., et al., *From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health*. Antioxid. Redox Signal., 2007. **9**(7): p. 775-806.
25. Chu, F.F., J.H. Doroshov, and R.S. Esworthy, *Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI*. J. Biol. Chem., 1993. **268**(4): p. 2571-6.
26. Wingler, K., et al., *mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins*. Eur. J. Biochem., 1999. **259**(1-2): p. 149-57.
27. Takahashi, K., et al., *Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme*. Arch. Biochem. Biophys., 1987. **256**(2): p. 677-86.
28. Yamamoto, Y. and K. Takahashi, *Glutathione peroxidase isolated from plasma reduces phospholipid hydroperoxides*. Arch. Biochem. Biophys., 1993. **305**(2): p. 541-5.
29. Ursini, F., M. Maiorino, and C. Gregolin, *The selenoenzyme phospholipid hydroperoxidase glutathione peroxidase*. Biochim. Biophys. Acta., 1985. **839**(1): p. 62-70.
30. Brigelius-Flohé, R., et al., *Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence*. J. Biol. Chem., 1994. **269**(10): p. 7342-8.
31. Vaishnav, R.A., et al., *Cellular and molecular characterization of oxidative stress in olfactory epithelium of Harlequin mutant mouse*. J. Neurosci. Res., 2008. **86**(1): p. 165-82.
32. Gladyshev, V.N., K.T. Jeang, and T.C. Stadtman, *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, 1996. **93**(12): p. 6146-51.

33. Lee, S.R., et al., *Molecular cloning and characterization of a mitochondrial selenocysteine-containing thioredoxin reductase from rat liver*. J. Biol. Chem., 1999. **274**(8): p. 4722-34.
34. Sun, Q.A., et al., *Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases*. J. Biol. Chem., 1999. **274**(35): p. 24522-30.
35. Behne, D., et al., *Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1990. **173**(3): p. 1143-9.
36. Davey, J.C., et al., *Cloning of a cDNA for the type II iodothyronine deiodinase*. J. Biol. Chem., 1995. **270**(45): p. 26786-9.
37. Croteau, W., et al., *Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase*. J. Biol. Chem., 1995. **270**(28): p. 16569-75.
38. Panee, J., et al., *Selenoprotein H is a redox-sensing high mobility group family DNA-binding protein that up-regulates genes involved in glutathione synthesis and phase II detoxification*. J. Biol. Chem., 2007. **282**(33): p. 23759-65.
39. Novoselov, S.V., et al., *Selenoprotein H is a nucleolar thioredoxin-like protein with a unique expression pattern*. J. Biol. Chem., 2007. **282**(16): p. 11960-8.
40. Horibata, Y. and Y. Hirabayashi, *Identification and characterization of human ethanolaminephosphotransferase1*. J. Lipid Res., 2007. **48**(3): p. 503-8.
41. Lu, C., et al., *Identification and characterization of selenoprotein K: an antioxidant in cardiomyocytes*. FEBS Lett., 2006. **580**(22): p. 5189-97.
42. Korotkov, K.V., et al., *Mammalian selenoprotein in which selenocysteine (Sec) incorporation is supported by a new form of Sec insertion sequence element*. Mol. Cell. Biol., 2002. **22**(5): p. 1402-11.
43. Hwang, D.Y., et al., *Differentially expressed genes in transgenic mice carrying human mutant presenilin-2 (N141I): correlation of selenoprotein M with Alzheimer's disease*. Neurochem. Res., 2005. **30**(8): p. 1009-19.
44. Petit, N., et al., *Selenoprotein N: an endoplasmic reticulum glycoprotein with an early developmental expression pattern*. Hum. Mol. Genet., 2003. **12**(9): p. 1045-53.
45. Pappas, A.C., et al., *Selenoproteins and maternal nutrition*. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol., 2008. **151**(4): p. 361-72.
46. Burk, R.F. and K.E. Hill, *Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis*. Annu. Rev. Nutr., 2005. **25**: p. 215-35.
47. Grumolato, L., et al., *Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and neuroendocrine secretion*. Faseb J., 2008. **22**(6): p. 1756-68.
48. Vendeland, S.C., et al., *Purification and properties of selenoprotein W from rat muscle*. J. Biol. Chem., 1993. **268**(23): p. 17103-7.
49. Kryukov, G.V., et al., *Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2002. **99**(7): p. 4245-50.

50. Kumaraswamy, E., et al., *Structure-expression relationships of the 15-kDa selenoprotein gene. Possible role of the protein in cancer etiology.* J. Biol. Chem., 2000. **275**(45): p. 35540-7.
51. Xu, X.M., et al., *Selenophosphate synthetase 2 is essential for selenoprotein biosynthesis.* Biochem. J., 2007. **404**(1): p. 115-20.
52. Nirenberg, M., et al., *RNA codewords and protein synthesis, VII. On the general nature of the RNA code.* Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1965. **53**(5): p. 1161-8.
53. Chambers, I., et al., *The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA.* Embo J., 1986. **5**(6): p. 1221-7.
54. Böck, A., et al., *Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code.* Trends Biochem. Sci., 1991. **16**(12): p. 463-7.
55. Yuan, J., et al., *RNA-dependent conversion of phosphoserine forms selenocysteine in eukaryotes and archaea.* Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2006. **103**(50): p. 18923-7.
56. Small-Howard, A., et al., *Supramolecular complexes mediate selenocysteine incorporation in vivo.* Mol. Cell. Biol., 2006. **26**(6): p. 2337-46.
57. Chavatte, L., B.A. Brown, and D.M. Driscoll, *Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes.* Nat. Struct. Mol. Biol., 2005. **12**(5): p. 408-16.
58. Copeland, P.R., V.A. Stepanik, and D.M. Driscoll, *Insight into mammalian selenocysteine insertion: domain structure and ribosome binding properties of Sec insertion sequence binding protein 2.* Mol. Cell. Biol., 2001. **21**(5): p. 1491-8.
59. Sun, X., P.M. Moriarty, and L.E. Maquat, *Nonsense-mediated decay of glutathione peroxidase 1 mRNA in the cytoplasm depends on intron position.* Embo J., 2000. **19**(17): p. 4734-44.
60. Weiss Sachdev, S. and R.A. Sunde, *Selenium regulation of transcript abundance and translational efficiency of glutathione peroxidase-1 and -4 in rat liver.* Biochem. J., 2001. **357**(Pt 3): p. 851-8.
61. Bermanno, G., J.R. Arthur, and J.E. Hesketh, *Selective control of cytosolic glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase mRNA stability by selenium supply.* FEBS Lett., 1996. **387**(2-3): p. 157-60.
62. Low, S.C., et al., *SECIS-SBP2 interactions dictate selenocysteine incorporation efficiency and selenoprotein hierarchy.* Embo J., 2000. **19**(24): p. 6882-90.
63. de Jesus, L.A., et al., *Nuclear assembly of UGA decoding complexes on selenoprotein mRNAs: a mechanism for eluding nonsense-mediated decay?* Mol. Cell. Biol., 2006. **26**(5): p. 1795-805.
64. Hatfield, D., et al., *Selenium induces changes in the selenocysteine tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> population in mammalian cells.* Nucleic Acids Res., 1991. **19**(4): p. 939-43.
65. Kim, L.K., et al., *Methylation of the ribosyl moiety at position 34 of selenocysteine tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> is governed by both primary and tertiary structure.* Rna, 2000. **6**(9): p. 1306-15.

66. Carlson, B.A., et al., *Selective rescue of selenoprotein expression in mice lacking a highly specialized methyl group in selenocysteine tRNA*. J. Biol. Chem., 2005. **280**(7): p. 5542-8.
67. Carlson, B.A., et al., *Selective restoration of the selenoprotein population in a mouse hepatocyte selenoproteinless background with different mutant selenocysteine tRNAs lacking Um34*. J. Biol. Chem., 2007. **282**(45): p. 32591-602.
68. Brigelius-Flohe, R., *Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases*. Free Radic. Biol. Med., 1999. **27**(9-10): p. 951-65.
69. Allan, C.B., G.M. Lacourciere, and T.C. Stadtman, *Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium*. Annu. Rev. Nutr., 1999. **19**: p. 1-16.
70. Bermano, G., et al., *Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats*. Biochem. J., 1995. **311** ( Pt 2): p. 425-30.
71. Papp, L.V., et al., *The redox state of SECIS binding protein 2 controls its localization and selenocysteine incorporation function*. Mol. Cell. Biol., 2006. **26**(13): p. 4895-910.
72. Brigelius-Flohé, R., et al., *Selenium: An Antioxidant? In: Handbook of Antioxidants, 2nd Edition*. E.Cadenas and L.Parker, eds. (New York, Basel, Marcel Dekker), 2001: p. pp. 633-664.
73. Epp, O., R. Ladenstein, and A. Wendel, *The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution*. Eur. J. Biochem., 1983. **133**(1): p. 51-69.
74. Wingler, K., et al., *Gastrointestinal glutathione peroxidase prevents transport of lipid hydroperoxides in CaCo-2 cells*. Gastroenterology, 2000. **119**(2): p. 420-30.
75. Florian, S., et al., *Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue*. Free Radic. Res., 2001. **35**(6): p. 655-63.
76. Serewko, M.M., et al., *Alterations in gene expression and activity during squamous cell carcinoma development*. Cancer Res., 2002. **62**(13): p. 3759-65.
77. Mörk, H., et al., *Glutathione peroxidase isoforms as part of the local antioxidative defense system in normal and Barrett's esophagus*. Int. J. Cancer, 2003. **105**(3): p. 300-4.
78. Lin, Y.M., et al., *Molecular diagnosis of colorectal tumors by expression profiles of 50 genes expressed differentially in adenomas and carcinomas*. Oncogene, 2002. **21**(26): p. 4120-8.
79. Mörk, H., et al., *Inverse mRNA expression of the selenocysteine-containing proteins GI-GPx and SeP in colorectal adenomas compared with adjacent normal mucosa*. Nutr. Cancer, 2000. **37**(1): p. 108-16.
80. Esworthy, R.S., et al., *Low glutathione peroxidase activity in Gpx1 knockout mice protects jejunum crypts from gamma-irradiation damage*. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 2000. **279**(2): p. G426-36.
81. Esworthy, R.S., et al., *Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis*. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 2001. **281**(3): p. G848-55.

82. Chu, F.F., et al., *Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes*. *Cancer Res.*, 2004. **64**(3): p. 962-8.
83. Esworthy, R.S., et al., *Epithelium-specific glutathione peroxidase, Gpx2, is involved in the prevention of intestinal inflammation in selenium-deficient mice*. *J. Nutr.*, 2005. **135**(4): p. 740-5.
84. Chu, F.F., et al., *Retinoic acid induces Gpx2 gene expression in MCF-7 human breast cancer cells*. *J. Nutr.*, 1999. **129**(10): p. 1846-54.
85. Morbitzer, M. and T. Herget, *Expression of gastrointestinal glutathione peroxidase is inversely correlated to the presence of hepatitis C virus subgenomic RNA in human liver cells*. *J. Biol. Chem.*, 2005. **280**(10): p. 8831-41.
86. Banning, A., et al., *The GI-GPx gene is a target for Nrf2*. *Mol. Cell. Biol.*, 2005. **25**(12): p. 4914-23.
87. Yan, W. and X. Chen, *GPX2, a direct target of p63, inhibits oxidative stress-induced apoptosis in a p53-dependent manner*. *J. Biol. Chem.*, 2006. **281**(12): p. 7856-62.
88. Wodarz, A. and R. Nusse, *Mechanisms of Wnt signaling in development*. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 1998. **14**: p. 59-88.
89. Smalley, M.J. and T.C. Dale, *Wnt signalling in mammalian development and cancer*. *Cancer Metastasis Rev.*, 1999. **18**(2): p. 215-30.
90. Reya, T. and H. Clevers, *Wnt signalling in stem cells and cancer*. *Nature*, 2005. **434**(7035): p. 843-50.
91. Cadigan, K.M. and R. Nusse, *Wnt signaling: a common theme in animal development*. *Genes Dev.*, 1997. **11**(24): p. 3286-305.
92. Miller, J.R., *The Wnts*. *Genome Biol.*, 2002. **3**(1): p. REVIEWS3001.
93. McCrea, P.D., C.W. Turck, and B. Gumbiner, *A homolog of the armadillo protein in Drosophila (plakoglobin) associated with E-cadherin*. *Science*, 1991. **254**(5036): p. 1359-61.
94. Liu, C., et al., *Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism*. *Cell*, 2002. **108**(6): p. 837-47.
95. Hart, M., et al., *The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell*. *Curr. Biol.*, 1999. **9**(4): p. 207-10.
96. Cavallo, R.A., et al., *Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signaling activity*. *Nature*, 1998. **395**(6702): p. 604-8.
97. Kikuchi, A., S. Kishida, and H. Yamamoto, *Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications*. *Exp. Mol. Med.*, 2006. **38**(1): p. 1-10.
98. Bhanot, P., et al., *A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor*. *Nature*, 1996. **382**(6588): p. 225-30.
99. Pinson, K.I., et al., *An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice*. *Nature*, 2000. **407**(6803): p. 535-8.

100. Wong, H.C., et al., *Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled*. Mol. Cell, 2003. **12**(5): p. 1251-60.
101. Rubinfeld, B., et al., *Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly*. Science, 1996. **272**(5264): p. 1023-6.
102. Waterman, M.L., *Lymphoid enhancer factor/T cell factor expression in colorectal cancer*. Cancer Metastasis Rev., 2004. **23**(1-2): p. 41-52.
103. Kramps, T., et al., *Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex*. Cell, 2002. **109**(1): p. 47-60.
104. Zhang, X., J.P. Gaspard, and D.C. Chung, *Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia*. Cancer Res., 2001. **61**(16): p. 6050-4.
105. Tetsu, O. and F. McCormick, *Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells*. Nature, 1999. **398**(6726): p. 422-6.
106. Hsi, L.C., J. Angerman-Stewart, and T.E. Eling, *Introduction of full-length APC modulates cyclooxygenase-2 expression in HT-29 human colorectal carcinoma cells at the translational level*. Carcinogenesis, 1999. **20**(11): p. 2045-9.
107. Araki, Y., et al., *Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and ras pathways*. Cancer Res., 2003. **63**(3): p. 728-34.
108. Mann, B., et al., *Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1999. **96**(4): p. 1603-8.
109. He, T.C., et al., *Identification of c-MYC as a target of the APC pathway*. Science, 1998. **281**(5382): p. 1509-12.
110. Dang, C.V., et al., *The c-Myc target gene network*. Semin. Cancer Biol., 2006. **16**(4): p. 253-64.
111. Sansom, O.J., et al., *Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine*. Nature, 2007. **446**(7136): p. 676-9.
112. Castellone, M.D., et al., *Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis*. Science, 2005. **310**(5753): p. 1504-10.
113. Funato, Y., et al., *The thioredoxin-related redox-regulating protein nucleoredoxin inhibits Wnt-beta-catenin signalling through dishevelled*. Nat. Cell Biol., 2006. **8**(5): p. 501-8.
114. Leyns, L., et al., *Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer*. Cell, 1997. **88**(6): p. 747-56.
115. Bafico, A., et al., *Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling*. J. Biol. Chem., 1999. **274**(23): p. 16180-7.

116. Bafico, A., et al., *Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow*. Nat. Cell Biol., 2001. **3**(7): p. 683-6.
117. Potten, C.S. and M. Löffler, *Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt*. Development, 1990. **110**(4): p. 1001-20.
118. Crosnier, C., D. Stamatakis, and J. Lewis, *Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control*. Nat. Rev. Genet., 2006. **7**(5): p. 349-59.
119. Stappenbeck, T.S., et al., *Notes from some crypt watchers: regulation of renewal in the mouse intestinal epithelium*. Curr. Opin. Cell. Biol., 1998. **10**(6): p. 702-9.
120. Korinek, V., et al., *Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4*. Nat. Genet., 1998. **19**(4): p. 379-83.
121. Gregorieff, A., et al., *Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine*. Gastroenterology, 2005. **129**(2): p. 626-38.
122. Battle, E., et al., *Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB*. Cell, 2002. **111**(2): p. 251-63.
123. van Es, J.H., et al., *Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts*. Nat. Cell Biol., 2005. **7**(4): p. 381-6.
124. Kuhnert, F., et al., *Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2004. **101**(1): p. 266-71.
125. Sansom, O.J., et al., *Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration*. Genes Dev., 2004. **18**(12): p. 1385-90.
126. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2008*. CA Cancer J. Clin., 2008. **58**(2): p. 71-96.
127. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
128. Goss, K.H. and J. Groden, *Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor*. J. Clin. Oncol., 2000. **18**(9): p. 1967-79.
129. Schneikert, J. and J. Behrens, *The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development*. Gut, 2007. **56**(3): p. 417-25.
130. Shamberger, R.J. and D.V. Frost, *Possible protective effect of selenium against human cancer*. Can. Med. Assoc. J., 1969. **100**(14): p. 682.
131. Schrauzer, G.N., D.A. White, and C.J. Schneider, *Cancer mortality correlation studies--III: statistical associations with dietary selenium intakes*. Bioinorg. Chem., 1977. **7**(1): p. 23-31.
132. Clark, L.C., et al., *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, 1996. **276**(24): p. 1957-63.
133. Ip, C., *Lessons from basic research in selenium and cancer prevention*. J. Nutr., 1998. **128**(11): p. 1845-54.

134. Baines, A.T., et al., *The effects of dietary selenomethionine on polyamines and azoxymethane-induced aberrant crypts*. *Cancer Lett.*, 2000. **160**(2): p. 193-8.
135. WCRF, *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*. Washington, DC: AICR, 2007.
136. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 860-7.
137. Gromadzinska, J., et al., *Selenium and cancer: biomarkers of selenium status and molecular action of selenium supplements*. *Eur. J. Nutr.*, 2008. **47 Suppl 2**: p. 29-50.
138. Zeng, H., *Selenite and selenomethionine promote HL-60 cell cycle progression*. *J. Nutr.*, 2002. **132**(4): p. 674-9.
139. Jiang, C., et al., *Selenite-induced p53 Ser-15 phosphorylation and caspase-mediated apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells*. *Mol. Cancer Ther.*, 2004. **3**(7): p. 877-84.
140. El-Bayoumy, K. and R. Sinha, *Molecular chemoprevention by selenium: a genomic approach*. *Mutat. Res.*, 2005. **591**(1-2): p. 224-36.
141. Hesketh, J., *Nutrigenomics and selenium: gene expression patterns, physiological targets, and genetics*. *Annu. Rev. Nutr.*, 2008. **28**: p. 157-77.
142. Rao, L., B. Puschner, and T.A. Prolla, *Gene expression profiling of low selenium status in the mouse intestine: transcriptional activation of genes linked to DNA damage, cell cycle control and oxidative stress*. *J. Nutr.*, 2001. **131**(12): p. 3175-81.
143. Yoon, S.O., M.M. Kim, and A.S. Chung, *Inhibitory effect of selenite on invasion of HT1080 tumor cells*. *J. Biol. Chem.*, 2001. **276**(23): p. 20085-92.
144. Jiang, C., H. Ganther, and J. Lu, *Monomethyl selenium--specific inhibition of MMP-2 and VEGF expression: implications for angiogenic switch regulation*. *Mol. Carcinog.*, 2000. **29**(4): p. 236-50.
145. Seo, Y.R., M.R. Kelley, and M.L. Smith, *Selenomethionine regulation of p53 by a ref1-dependent redox mechanism*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2002. **99**(22): p. 14548-53.
146. Zeng, H., E.O. Uthus, and G.F. Combs, Jr., *Mechanistic aspects of the interaction between selenium and arsenic*. *J. Inorg. Biochem.*, 2005. **99**(6): p. 1269-74.
147. van de Wetering, M., et al., *The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells*. *Cell*, 2002. **111**(2): p. 241-50.
148. van Schothorst, E.M., et al., *Assessment of reducing RNA input for Agilent oligo microarrays*. *Anal. Biochem.*, 2007. **363**(2): p. 315-7.
149. *R: Regulatory Compliance and Validation Issues A Guidance Document for the Use of R in Regulated Clinical Trial Environments*. August 17, 2008.
150. Dahlquist, K.D., et al., *GenMAPP, a new tool for viewing and analyzing microarray data on biological pathways*. *Nat. Genet.*, 2002. **31**(1): p. 19-20.

151. Doniger, S.W., et al., *MAPPFinder: using Gene Ontology and GenMAPP to create a global gene-expression profile from microarray data*. *Genome Biol.*, 2003. **4**(1): p. R7.
152. Marshall, O.J., *PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR*. *Bioinformatics*, 2004. **20**(15): p. 2471-2.
153. Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. *Genome Biol.*, 2002. **3**(7): p. RESEARCH0034.
154. Quandt, K., et al., *MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data*. *Nucleic Acids Res.*, 1995. **23**(23): p. 4878-84.
155. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal. Biochem.*, 1976. **72**: p. 248-54.
156. Gromer, S. and J.H. Gross, *Methylseleninate is a substrate rather than an inhibitor of mammalian thioredoxin reductase. Implications for the antitumor effects of selenium*. *J. Biol. Chem.*, 2002. **277**(12): p. 9701-6.
157. Sheehan, T.M. and M. Gao, *Simplified fluorometric assay of total selenium in plasma and urine*. *Clin. Chem.*, 1990. **36**(12): p. 2124-6.
158. Schomburg, L., et al., *Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues*. *Biochem. J.*, 2003. **370**(Pt 2): p. 397-402.
159. NRC, *National Research Council, Nutrient requirements of laboratory animals*. 4th ed. Washington, DC: National Academy Press, 1995.
160. de La Coste, A., et al., *Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1998. **95**(15): p. 8847-51.
161. Rosin-Arbesfeld, R., et al., *Nuclear export of the APC tumour suppressor controls beta-catenin function in transcription*. *Embo J.*, 2003. **22**(5): p. 1101-13.
162. Kitagawa, M., et al., *An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin*. *Embo J.*, 1999. **18**(9): p. 2401-10.
163. Morin, P.J., B. Vogelstein, and K.W. Kinzler, *Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1996. **93**(15): p. 7950-4.
164. Balmer, J.E. and R. Blomhoff, *Gene expression regulation by retinoic acid*. *J. Lipid Res.*, 2002. **43**(11): p. 1773-808.
165. Gearing, K.L., et al., *Fatty acid activation of the peroxisome proliferator activated receptor, a member of the nuclear receptor gene superfamily*. *J. Nutr.*, 1994. **124**(8 Suppl): p. 1284S-1288S.
166. Thomson, C.D., *Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review*. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2004. **58**(3): p. 391-402.
167. Yeh, J.Y., et al., *Dietary selenium increases selenoprotein W levels in rat tissues*. *J. Nutr.*, 1997. **127**(11): p. 2165-72.

168. Pagmantidis, V., et al., *Effects of Se-depletion on glutathione peroxidase and selenoprotein W gene expression in the colon*. FEBS Lett., 2005. **579**(3): p. 792-6.
169. Sunde, R.A., et al., *Longitudinal selenium status in healthy British adults: assessment using biochemical and molecular biomarkers*. Br. J. Nutr., 2008. **99 Suppl 3**: p. S37-47.
170. Aachmann, F.L., et al., *Solution structure of selenoprotein W and NMR analysis of its interaction with 14-3-3 proteins*. J. Biol. Chem., 2007. **282**(51): p. 37036-44.
171. Mackintosh, C., *Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes*. Biochem. J., 2004. **381**(Pt 2): p. 329-42.
172. Xu, X.M., et al., *Evidence for direct roles of two additional factors, SECp43 and soluble liver antigen, in the selenoprotein synthesis machinery*. J. Biol. Chem., 2005. **280**(50): p. 41568-75.
173. Pagmantidis, V., et al., *Supplementation of healthy volunteers with nutritionally relevant amounts of selenium increases the expression of lymphocyte protein biosynthesis genes*. Am. J. Clin. Nutr., 2008. **87**(1): p. 181-9.
174. Lee, Y.N., Y. Gao, and H.Y. Wang, *Differential mediation of the Wnt canonical pathway by mammalian Dishevelleds-1, -2, and -3*. Cell Signal., 2008. **20**(2): p. 443-52.
175. Luo, J., *Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) in tumorigenesis and cancer chemotherapy*. Cancer Lett., 2008.
176. Jain, A.K. and A.K. Jaiswal, *GSK-3beta acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2*. J. Biol. Chem., 2007. **282**(22): p. 16502-10.
177. Burk, R.F., et al., *Selenium deficiency activates mouse liver Nrf2-ARE but vitamin E deficiency does not*. Free Radic. Biol. Med., 2008. **44**(8): p. 1617-23.
178. Suzuki, T., et al., *Deletion of the Selenocysteine tRNA Gene in Macrophages and Liver Results in Compensatory Gene Induction of Cytoprotective Enzymes by Nrf2*. J. Biol. Chem., 2008. **283**(4): p. 2021-30.
179. Shakoori, A., et al., *Deregulated GSK3beta activity in colorectal cancer: its association with tumor cell survival and proliferation*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2005. **334**(4): p. 1365-73.
180. Hoeflich, K.P., et al., *Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation*. Nature, 2000. **406**(6791): p. 86-90.
181. Buscarlet, M. and S. Stifani, *The 'Marx' of Groucho on development and disease*. Trends Cell. Biol., 2007. **17**(7): p. 353-61.
182. Allen, T., et al., *Grg1 acts as a lung-specific oncogene in a transgenic mouse model*. Cancer Res., 2006. **66**(3): p. 1294-301.
183. Liu, Y., et al., *Epithelial expression and chromosomal location of human TLE genes: implications for notch signaling and neoplasia*. Genomics, 1996. **31**(1): p. 58-64.
184. Cinnamon, E. and Z. Paroush, *Context-dependent regulation of Groucho/TLE-mediated repression*. Curr. Opin. Genet. Dev., 2008.

185. Orian, A., et al., *A Myc-Groucho complex integrates EGF and Notch signaling to regulate neural development*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2007. **104**(40): p. 15771-6.
186. Hovanes, K., et al., *Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer*. Nat. Genet., 2001. **28**(1): p. 53-7.
187. Filali, M., et al., *Wnt-3A/beta-catenin signaling induces transcription from the LEF-1 promoter*. J. Biol. Chem., 2002. **277**(36): p. 33398-410.
188. Yochum, G.S., et al., *Serial analysis of chromatin occupancy identifies beta-catenin target genes in colorectal carcinoma cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2007. **104**(9): p. 3324-9.
189. Saito, T., et al., *Possible association between higher beta-catenin mRNA expression and mutated beta-catenin in sporadic desmoid tumors: real-time semiquantitative assay by TaqMan polymerase chain reaction*. Lab. Invest., 2002. **82**(1): p. 97-103.
190. Prabhu, K.S., et al., *Selenium deficiency increases the expression of inducible nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages: role of nuclear factor-kappaB in up-regulation*. Biochem. J., 2002. **366**(Pt 1): p. 203-9.
191. Surh, Y.J., et al., *Redox-sensitive transcription factors as prime targets for chemoprevention with anti-inflammatory and antioxidative phytochemicals*. J. Nutr., 2005. **135**(12 Suppl): p. 2993S-3001S.
192. Morin, P.J., et al., *Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC*. Science, 1997. **275**(5307): p. 1787-90.
193. Yun, M.S., et al., *Both ERK and Wnt/beta-catenin pathways are involved in Wnt3a-induced proliferation*. J. Cell Sci., 2005. **118**(Pt 2): p. 313-22.
194. Du, Q., et al., *Regulation of human nitric oxide synthase 2 expression by Wnt beta-catenin signaling*. Cancer Res., 2006. **66**(14): p. 7024-31.
195. Kolligs, F.T., et al., *ITF-2, a downstream target of the Wnt/TCF pathway, is activated in human cancers with beta-catenin defects and promotes neoplastic transformation*. Cancer Cell, 2002. **1**(2): p. 145-55.
196. He, T.C., et al., *PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. Cell, 1999. **99**(3): p. 335-45.
197. Koh, T.J., et al., *Gastrin is a target of the beta-catenin/TCF-4 growth-signaling pathway in a model of intestinal polyposis*. J. Clin. Invest., 2000. **106**(4): p. 533-9.
198. Zhu, P., et al., *Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis*. Cancer Cell, 2004. **5**(5): p. 455-63.
199. Leung, J.Y., et al., *Activation of AXIN2 expression by beta-catenin-T cell factor. A feedback repressor pathway regulating Wnt signaling*. J. Biol. Chem., 2002. **277**(24): p. 21657-65.
200. Neth, P., et al., *Wnt signaling regulates the invasion capacity of human mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 2006. **24**(8): p. 1892-903.

201. Ursini, F., et al., *Diversity of glutathione peroxidases*. Methods Enzymol., 1995. **252**: p. 38-53.
202. van Es, J.H., N. Barker, and H. Clevers, *You Wnt some, you lose some: oncogenes in the Wnt signaling pathway*. Curr. Opin. Genet. Dev., 2003. **13**(1): p. 28-33.
203. Mariadason, J.M., et al., *Down-regulation of beta-catenin TCF signaling is linked to colonic epithelial cell differentiation*. Cancer Res., 2001. **61**(8): p. 3465-71.
204. Andreu, P., et al., *A genetic study of the role of the Wnt/beta-catenin signalling in Paneth cell differentiation*. Dev. Biol., 2008.
205. Chu, F.F., R.S. Esworthy, and J.H. Doroshov, *Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer*. Free Radic. Biol. Med., 2004. **36**(12): p. 1481-95.
206. Nomura, K., et al., *Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway*. J. Biol. Chem., 1999. **274**(41): p. 29294-302.
207. Nakagawa, Y., *Role of mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) as an antiapoptotic factor*. Biol. Pharm. Bull., 2004. **27**(7): p. 956-60.
208. Kayanoki, Y., et al., *The protective role of glutathione peroxidase in apoptosis induced by reactive oxygen species*. J. Biochem., 1996. **119**(4): p. 817-22.
209. Walshe, J., et al., *Inactivation of glutathione peroxidase activity contributes to UV-induced squamous cell carcinoma formation*. Cancer Res., 2007. **67**(10): p. 4751-8.
210. Ramos-Gomez, M., et al., *Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2001. **98**(6): p. 3410-5.
211. Banning, A., et al., *GPx2 counteracts PGE2 production by dampening COX-2 and mPGES-1 expression in human colon cancer cells*. Antioxid. Redox Signal., 2008. **10**(9): p. 1491-500.
212. Kulmacz, R.J., *Regulation of cyclooxygenase catalysis by hydroperoxides*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2005. **338**(1): p. 25-33.
213. Rösch, S., et al., *Prostaglandin E2 induces cyclooxygenase-2 expression in human non-pigmented ciliary epithelial cells through activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2005. **338**(2): p. 1171-8.
214. Imai, H., et al., *Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2003. **305**(2): p. 278-86.
215. Eberhart, C.E., et al., *Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas*. Gastroenterology, 1994. **107**(4): p. 1183-8.
216. Rigas, B., I.S. Goldman, and L. Levine, *Altered eicosanoid levels in human colon cancer*. J. Lab. Clin. Med., 1993. **122**(5): p. 518-23.

217. Gupta, R.A. and R.N. Dubois, *Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2*. Nat. Rev. Cancer, 2001. **1**(1): p. 11-21.
218. Brown, J.R. and R.N. DuBois, *COX-2: a molecular target for colorectal cancer prevention*. J. Clin. Oncol., 2005. **23**(12): p. 2840-55.
219. Tsujii, M., S. Kawano, and R.N. DuBois, *Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1997. **94**(7): p. 3336-40.
220. Heirman, I., et al., *Blocking tumor cell eicosanoid synthesis by GPx 4 impedes tumor growth and malignancy*. Free Radic. Biol. Med., 2006. **40**(2): p. 285-94.
221. Li, D., et al., *Dietary supplementation with high-selenium soy protein reduces pulmonary metastasis of melanoma cells in mice*. J. Nutr., 2004. **134**(6): p. 1536-40.
222. Urig, S. and K. Becker, *On the potential of thioredoxin reductase inhibitors for cancer therapy*. Semin. Cancer Biol., 2006. **16**(6): p. 452-65.
223. Yoo, M.H., et al., *Thioredoxin reductase 1 deficiency reverses tumor phenotype and tumorigenicity of lung carcinoma cells*. J. Biol. Chem., 2006. **281**(19): p. 13005-8.
224. Medina, D., *Mechanisms of selenium inhibition of tumorigenesis*. Adv. Exp. Med. Biol., 1986. **206**: p. 465-72.
225. Dillard, A.C. and M.A. Lane, *Retinol decreases beta-catenin protein levels in retinoic acid-resistant colon cancer cell lines*. Mol. Carcinog., 2007. **46**(4): p. 315-29.
226. Pálmer, H.G., et al., *Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling*. J. Cell Biol., 2001. **154**(2): p. 369-87.
227. Aguilera, O., et al., *The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is induced by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 associated to the differentiation of human colon cancer cells*. Carcinogenesis, 2007. **28**(9): p. 1877-84.
228. Pendas-Franco, N., et al., *DICKKOPF-4 is induced by TCF/beta-catenin and upregulated in human colon cancer, promotes tumour cell invasion and angiogenesis and is repressed by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3)*. Oncogene, 2008.
229. Liu, Z., et al., *Mild depletion of dietary folate combined with other B vitamins alters multiple components of the Wnt pathway in mouse colon*. J. Nutr., 2007. **137**(12): p. 2701-8.
230. Goulet, A.C., et al., *Profiling of selenomethionine responsive genes in colon cancer by microarray analysis*. Cancer Biol. Ther., 2007. **6**(4): p. 494-503.
231. Narayanan, B.A., et al., *Effects of a combination of docosahexaenoic acid and 1,4-phenylene bis(methylene) selenocyanate on cyclooxygenase 2, inducible nitric oxide synthase and beta-catenin pathways in colon cancer cells*. Carcinogenesis, 2004. **25**(12): p. 2443-9.
232. El-Bayoumy, K., et al., *Elucidation of molecular targets of mammary cancer chemoprevention in the rat by organoselenium compounds using cDNA microarray*. Carcinogenesis, 2003. **24**(9): p. 1505-14.

233. Müller, C., K. Winkler, and R. Brigelius-Flohé, *3'UTRs of glutathione peroxidases differentially affect selenium-dependent mRNA stability and selenocysteine incorporation efficiency*. Biol. Chem., 2003. **384**(1): p. 11-8.

## 7 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Regina Brigelius-Flohé, die es mir ermöglichte, diese Doktorarbeit am Deutschen Institut für Ernährungsforschung in der Abteilung Biochemie der Mikronährstoffe zu schreiben. Zu diesem Zweck stellte sie mir ein sehr interessantes Thema zur Verfügung, das ich mit viel Freude bearbeitet habe. Vielen Dank für die wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung.

Allen Gutachtern danke ich für ihre Bereitschaft zur Übernahme der Gutachtertätigkeit.

Ich danke allen derzeitigen und ehemaligen Kollegen der Abteilung Biochemie der Mikronährstoffe für die motivierte Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft, die dazu beitragen, dass die Arbeit letztlich immer Freude bereitet. Einige Personen sind hierbei besonders hervorzuheben:

Ich danke Frau Dr. Antje Banning für die engagierte Betreuung meiner Arbeit, für viele Ideen und fruchtbare Diskussionen vor allem in den vielen kleinen praktischen Fragen des Forscheralltags und nicht zuletzt für das kritische Korrekturlesen meiner Arbeit. Ebenso herzlich möchte ich mich bei Stefanie Deubel bedanken, der welt-besten technischen Assistentin, denn ihr Ideenreichtum, die vielen Anregungen und aufmunternden Worte waren für das Entstehen dieser Arbeit von entscheidender Bedeutung. Auch Jörg-Uwe Bittner und Elvira Krohn danke ich für die Unterstützung bei experimentellen Arbeiten.

Weiterhin bedanke ich mich bei meinen Diplomandinnen Christiane Ehrig und Eva Göken, deren Ergebnisse auch in diese Arbeit eingeflossen sind. Auch allen anderen Diplomanden und Doktoranden, die ein Stück des Weges gemeinsam mit mir gegangen sind, sei an dieser Stelle herzlich gedankt, allen voran Sandra Nell, Maria Löwinger und Susanne Krehl, Dirk Kluth, Nadine Jurrmann, Sophie Thalmann, Anja Bossecker, Andrea Hohl, Ramona Bahtz, Juliane Hrdina und Sara Schumann.

Für das Korrekturlesen meiner Arbeit bedanke ich mich außerdem bei Frau Dr. Stephanie Schmitmeier, Herrn Dr. Michael Haack und Ulrike Niendorf.

Sascha Moßner, meiner Mutter und meinen Geschwistern danke ich dafür, dass sie immer für mich da sind, mich unterstützen und stolz auf mich sind.

Potsdam, im Dezember 2008

Anna Kipp