

DEUTSCHES INSTITUT FÜR ERNÄHRUNGSFORSCHUNG
POTSDAM-REHBRÜCKE
Abteilung Molekulare Toxikologie - Selen und Colonkrebs

Funktion von Selenoproteinen während der kolorektalen Karzinogenese

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

"doctor rerum naturalium"

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin „Biochemie der Ernährung“

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von Martin Bertz

Potsdam, Oktober 2018

Erstgutachterin: Prof. Dr. Anna Kipp
Zweitgutachterin: Prof. Dr. Tanja Schwerdtle
Drittgutachter: Prof. Dr. Jan Frank
Hauptbetreuer: Prof. Dr. Tilman Grune

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
<https://doi.org/10.25932/publishup-42780>
<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-427808>

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Der Darm und Darmkrebs	1
1.1.1 Aufbau und Homöostase des Darmepithels	1
1.1.2 Die Epidemiologie und Ätiologie von Darmkrebs	1
1.1.3 Molekulare Mechanismen der kolorektalen Karzinogenese.....	3
1.2 Selen & Selenoproteine.....	6
1.2.1 Selen als essenzielles Spurenelement.....	6
1.2.2 Biosynthese und Regulation von Selenoproteinen	7
1.2.3 Die Funktion von Selenoproteinen im Menschen	8
1.3 Selen, Selenoproteine und Krebs.....	9
1.3.1 Glutathionperoxidase 1	10
1.3.2 Glutathionperoxidase 2	11
1.3.3 Selenoprotein H	12
1.4 Zielstellung.....	14
2. Material und Methoden.....	15
2.1 Materialien	15
2.2 Lösungen und Puffer.....	17
2.3 Tierversuche	20
2.3.1 Nacktmausversuch.....	20
2.3.2 Histologische Aufarbeitung der Mausproben.....	20
2.4 Zellkultur	22
2.4.1 Herstellung von shRNA-vermittelten Knockdowns.....	23
2.4.2 Herstellung von Klonen mit überexprimierter oder inaktiver GPX2	24
2.5 Protein-Analytik.....	25
2.5.1 Herstellung von Gesamtzelllysaten mit Homogenisationspuffer	25
2.5.2 Herstellung von Gesamtzelllysaten mit RIPA-Puffer.....	25
2.5.3 Proteinbestimmung nach Bradford	26
2.5.4 SDS-Page und Western Blot.....	26
2.5.5 ALP-Aktivität	28
2.5.6 Gesamt-GPX-Aktivität	28
2.6 RNA-Analytik.....	29
2.6.1 RNA-Isolation.....	29
2.6.2 Reverse Transkription	30
2.6.3 Primerdesign, Herstellung von PCR-Produkten und Standardgeraden.....	30
2.6.4 Real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	31

2.6.5	PCR-Array.....	31
2.7	Immunhistochemische Färbung des Colon Cancer Tissue Arrays.....	33
2.8	NRU-Assay	33
2.9	DHR123-Assay	34
2.10	DNA-Laddering	34
2.11	Zellzyklusanalyse	35
2.12	Soft Agar-Assay	35
2.13	Scratch-Assay.....	36
2.14	Statistische Auswertung	36
3.	Ergebnisse	37
3.1	Charakterisierung der GPX2 in der kolorektalen Karzinogenese	37
3.1.1	Effektivität des GPX1- und GPX2-KDs in Abhängigkeit vom Selenstatus.....	37
3.1.2	PCR-Array und durch GPX1- bzw.GPX2-KD regulierte Gene	38
3.1.3	Zellproliferation & Differenzierungsstatus im GPX1- und GPX2-KD	40
3.1.4	Interaktion des GPX1- und GPX2-KDs mit Komponenten des NFκB-Signalwegs.....	45
3.1.5	Substratspezifität der GPX2 und Untersuchungen zur Apoptose.....	49
3.2	Funktion von Selenoprotein H bei Darmkrebs.....	56
3.2.1	Expression von SELENOH in humanen Adenokarzinomen und in präkanzerösen Läsionen von APC ^{min/+} -Mäusen	56
3.2.2	Effektivität des SELENOH-KDs in Abhängigkeit vom Selenstatus.....	57
3.2.3	Einfluss des SELENOH-KDs auf die Proliferation und Migration von Darmkrebszellen sowie auf die Tumorigenese in der Maus.....	58
3.2.4	Regulation des Zellzyklus im SELENOH-KD	61
3.2.5	Die Rolle von SELENOH in der Zelldifferenzierung	63
4.	Diskussion.....	68
4.1	Die Glutathionperoxiden 1 und 2	68
4.1.1	Keine Beeinflussung weiterer Isoformen durch den GPX1- oder GPX2-KD.....	68
4.1.2	Spezifische Effekte der GPX-KDs auf das zelluläre Wachstumsverhalten.....	69
4.1.3	Mögliche Interaktionen der GPX1 und GPX2 mit dem NFκB-Signalweg.....	72
4.1.4	Rolle der GPX2-Substratspezifität beim Schutz vor Apoptose.....	75
4.2	Selenoprotein H	79
4.2.1	Protumorigene Eigenschaften durch Knockdown von SELENOH.....	80
4.2.2	Dysregulation des Zellzyklus bei Fehlen von SELENOH	81
4.2.3	Potenzielle Funktion von SELENOH während der Zelldifferenzierung.....	83
4.3	Fazit.....	85
4.4	Ausblick	86
5.	Zusammenfassung.....	87
6.	Literaturverzeichnis	89
7.	Danksagung.....	108
8.	Erklärung.....	109

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des Darmepithels im Dün- und Dickdarm.....	2
Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der möglichen Entstehung von CRC	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der ALP-Reaktion.	28
Abbildung 4: Reaktionsschema bei Messung der GPX-Aktivität.	28
Abbildung 5: Die Expression der GPX1, GPX2 und GPX4 im GPX1- und GPX2-KD.....	38
Abbildung 6: Signifikant im GPX1- oder GPX2-KD regulierte Gene und deren Einordnung in Signalwege	39
Abbildung 7: Die zelluläre Proliferation und Differenzierung im GPX1- und GPX2-KD.....	40
Abbildung 8: Expression von mRNA-Markern in HT29-Zellen mit GPX1- und GPX2-KD.	43
Abbildung 9: Expression von mRNA-Markern in HT29-Spheroiden mit GPX1- und GPX2-KD...	44
Abbildung 10: Expression von NFκB-Zielgenen im GPX1- und GPX2-KD.	46
Abbildung 11: Analyse von Komponenten des NFκB-Signalwegs im GPX1- und GPX2-KD.....	47
Abbildung 12: Expression von COX2 im GPX1- und GPX2-KD nach Behandlung mit NAC oder PD98059.	48
Abbildung 13: Suszeptibilität des GPX1- und GPX2-KDs für verschiedene Hydroperoxide.	50
Abbildung 14: Charakterisierung derr HCT116-Zellen mit GPX2-Überexpression.	51
Abbildung 15: GPX-Aktivität in Zellen mit GPX2-Überexpression.	52
Abbildung 16: Messung der Zellviabilität in Zellen mit GPX2-Überexpression.	53
Abbildung 17: Qualitative Erfassung des Zelltods bei überexprimierter GPX2 nach Behandlung mit verschiedenen Hydroperoxiden oder KillerTRAIL.	55
Abbildung 18: Expression von SELENOH in humanen Adenokarzinomen und in präkanzerösen Läsionen von APC ^{min/+} -Mäusen.....	57
Abbildung 19: SELENOH-Expression im SELENOH-KD von zwei Darmkrebszelllinien.....	58
Abbildung 20: Proliferation und Migration des SELENOH-KDs im scratch Assay.	59
Abbildung 21: Verankerungsunabhängiges Wachstum des SELENOH-KDs im Soft Agar.....	60
Abbildung 22: Der SELENOH-KD im Nacktmausversuch.....	61
Abbildung 23: Zellverteilung des SELENOH-KD während der Phasen des Zellzyklus.	62
Abbildung 24: Expression von Zellzyklusmarkern im SELENOH-KD.	63
Abbildung 25: Expression von Differenzierungsmarkern im SELENOH-KD.	65
Abbildung 26: SELENOH-Expression während der Differenzierung von Darmkrebszelllinien....	66
Abbildung 27: Expression von SELENOH im murinen Dün- und Dickdarm.....	67
Abbildung 28: Mögliche GPX1- und GPX2-Funktionen in HT29-Zellen nach IL1β-Stimulation. .	75
Abbildung 29: Mögliches Funktionsmodell für SELENOH in Darmkrebszellen.....	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Materialien	15
Tabelle 2: Hergestellte Lösungen und Puffer	17
Tabelle 3: Entwässerung der Gewebeproben vor Einbettung in Paraffin	21
Tabelle 4: Verarbeitungsschritte der Gewebeproben vor und nach der Färbung	21
Tabelle 5: Zusammensetzung der Komplettmedien für die Zellkultur	23
Tabelle 6: Sequenzen der verwendeten shRNA-Konstrukte	24
Tabelle 7: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel beim Western Blot	26
Tabelle 8: Im Western Blot verwendete Primärantikörper	27
Tabelle 9: Temperatur- und Zeitangaben zum (q)PCR-Programm	30
Tabelle 10: In der qPCR verwendete Primersequenzen	32

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ALP	Alkalische Phosphatase
ANOVA	Varianzanalyse (engl.: <i>analysis of variance</i>)
APC	engl.: <i>adenomatous polyposis coli</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASCL2	engl.: <i>achaete-scute family bHLH transcription factor 2</i>
BIRC3	engl.: <i>baculoviral IAP repeat containing 3</i>
BMP2	engl.: <i>bone morphogenetic protein 2</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CA9	engl.: <i>carbonic anhydrase 9</i>
CCL5	engl.: <i>CC-chemokine Ligand 5</i>
CCS	engl.: <i>colon cancer subtype</i>
CDH3	Cadherin 3
CDKN1A	engl.: <i>cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i>
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
COX	Cyclooxygenase
CRC	Kolorektalkrebs (engl.: <i>colorectal cancer</i>)
CSC	Krebsstammzelle (engl.: <i>cancer stem cell</i>)
CSF1	engl.: <i>colony stimulating factor 1</i>
Cys	Cystein
DAB2	engl.: <i>disabled homolog 2</i>
DHR123	Dihydrorhodamin 123
DIfE	Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke
DKO	Doppel-Knockout
DMEM	engl.: <i>dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEFSEC	Eukaryotischer Elongationsfaktor, Sec-tRNA-spezifisch
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ERK	engl.: <i>extracellular-signal regulated kinase</i>
EIF4a3	Eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4a3
FABP1	engl.: <i>fatty acid binding protein 1</i>
FASR	engl.: <i>first apoptosis signal receptor</i>
FCS	Fötale Kälberserum
GADD45B	engl.: <i>growth arrest and DNA-damage-inducible protein</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

GIT	Gastrointestinaltrakt
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GPX	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H&E	Hämatoxilin & Eosin
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraensäure
HPODE	Hydroperoxyoctadecadiensäure
IκB	engl.: <i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor</i>
IKK	IκB-Kinase
IL1β	Interleukin 1β
JAG1	engl.: <i>jagged 1</i>
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KD	Knockdown
KO	Knockout
LFNG	O-Fucosylpeptide 3-Beta-N-Acetylglucosaminyltransferase (engl.: <i>lunatic fringe</i>)
LGR5	engl.: <i>leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5</i>
LOX	Lipoxygenase
M-MLV	Moloney-Maus-Leukämie-Virus
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MMP7	Matrix Metalloproteinase-7
MSI-H	hochgradige Mikrosatelliteninstabilität
MSRB1	Methionin-R-Sulfoxidreduktase 1
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NEMO	engl.: <i>NFκB essential modifier</i>
NFκB	Nukleärer Faktor-kappa B
NMD	engl.: <i>nonsense-mediated mRNA decay</i>
NOX	NADPH-Oxidase
NP	p-Nitrophenol
NPP	p-Nitrophenyl-Phosphat
OAZ1	Ornithin-Decarboxylase-Antizym 1
PAK	p21-aktivierte Kinase

PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl.: <i>phosphate-buffered saline</i>)
PCNA	engl.: <i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PEDF	engl.: <i>pigment epithelium-derived factor</i>
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PTP1B	Protein Tyrosin Phosphatase 1B
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl.: <i>reactive oxygen species</i>)
RCT	Randomisierte kontrollierte Studie (engl.: <i>randomized controlled trial</i>)
RP	Ribosomales Protein
RPMI	engl.: <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Reverse Transkriptase
SBP2	SECIS-Bindeprotein 2
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Sec	Selenocystein
SECIS	engl.: <i>selenocysteine insertion sequence</i>
SELENOP	Selenoprotein P
SEPHS2	Selenophosphatsynthetase 2
SEPSECS	Sep(O-Phosphoserine)-tRNA:Sec(Selenocysteine)-tRNA-Synthase
SERPINE1	engl.: <i>serpin family E member</i>
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl.: <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SOCS3	engl.: <i>suppressor of cytokine signaling 3</i>
SORBS1	engl.: <i>sorbin and SH3 domain containing 1</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBHP	<i>Tert</i> -Butylhydroperoxid
TBST	Tween-Tris-gepufferte Kochsalzlösung (engl.: <i>tris-buffered saline with Tween20</i>)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNFA	Tumornekrosefaktor Alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRNAU1AP	tRNA-Selenocystein 1-assoziiertes Protein 1
TXNRD	Thioredoxinreduktase
VEGFA	engl.: <i>vascular endothelial growth factor A</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl.: <i>World Health Organisation</i>)
XO	Xanthin-Oxidase
ZEB1	Zinkfinger E-box-bindende Homeobox 1

1. Einleitung

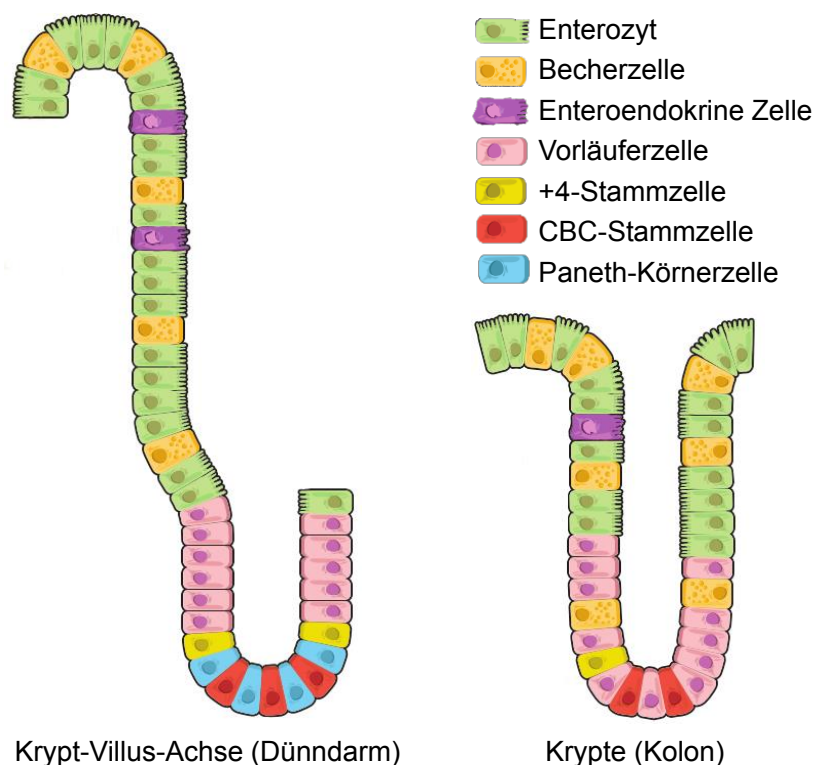
1.1 Der Darm und Darmkrebs

1.1.1 Aufbau und Homöostase des Darmepithels

Charakteristisch für den Dünndarm sind 1 mm lange Zotten (Villi), die sich in das Lumen ausstülpen, und dazwischenliegende Lieberkühn-Krypten, welche sich in die unter dem Epithel gelegene Bindegewebsschicht einsenken. Die im Dünndarm vorzufindenden Zelltypen haben je nach Lage verschiedene Funktionen (Abb. 1). Im unteren Teil der Krypten residieren Paneth-Körnerzellen, die mit Mikroorganismen und mit intestinalen Stammzellen interagieren [1]. Weiterhin gibt es verschiedene Typen pluripotenter Stammzellen, deren Tochterzellen nach asymmetrischer Teilung in Richtung Kryptenspitze wandern. Diese auch als transit-amplifizierend bezeichneten Vorläuferzellen sind stark proliferierend und daher wichtig für die 4-5 Tage dauernde Erneuerung des Darmepithels [2, 3]. Es folgt die Ausdifferenzierung der Vorläuferzellen in unterschiedliche absorptive und sekretorische Zelltypen. Enterozyten machen dabei den Großteil der Epithelzellen der Zotten aus und dienen vorrangig der Nährstoffresorption [4]. Zudem befinden sich in diesem Bereich auch enteroendokrine Zellen, Becherzellen und Tuft-Zellen, die unter anderem Substanzen zur Regulation der Darmmotilität sezernieren [5] und an der Bildung der Schleimschicht [6] sowie an der Interaktion mit dem Immunsystem zur Parasitenabwehr [7] beteiligt sind. All diese Zellen haben gemein, dass sie aufgrund ihrer Differenzierung nicht mehr proliferationsaktiv sind. Außerhalb der Krypte herrscht ein proapoptotisches Milieu und nach einigen Tagen werden die sterbenden Zellen in das Darmlumen abgestoßen [8]. Im Unterschied zum Dünndarm gibt es im Dickdarm keine Villi, sondern nur Krypten. Zudem finden sich in diesem Abschnitt keine Panethzellen, jedoch weisen neuere Untersuchungen auf das Vorkommen Panethzell-ähnlicher Zellen hin [9].

1.1.2 Die Epidemiologie und Ätiologie von Darmkrebs

Epithelzellen sind in 9 von 10 Fällen der Ursprung von malignen Tumoren des Verdauungssystems [4]. Zwar findet sich im Dünndarm mit 75 % der Länge und 90 % der Oberfläche der Großteil des gastrointestinalen Epithels, jedoch treten hier nur 2 % der entsprechenden Tumore auf [10]. Als mögliche Ursache wurde früher die hohe Zellerneuerungsrate gesehen, welche zur Eliminierung von teilweise transformierten Zellen führt, bevor diese ihr volles karzinogenes Potenzial erreichen [11]. Weitere Hypothesen waren die niedrigere Bakterienzahl [12] und der schnelle Transit des Darminhalts [13] im Vergleich zum Dickdarm.



Krypt-Villus-Achse (Dünndarm)

Krypte (Kolon)

Abbildung 1: Aufbau des Darmepithels im Dün- und Dickdarm.

(modifiziert nach [14] - nicht gezeigt sind seltene Zelltypen wie z. B. Tuftzellen)

Neuere Untersuchungen legen nahe, dass die Wahrscheinlichkeit für bestimmte Tumorarten hauptsächlich von der Teilungsrates der Stammzellen des jeweiligen Organs abhängt [15]. So wird beispielsweise angenommen, dass es etwa 150 Mal weniger oft zur Teilung der Stammzellen im Duodenum im Vergleich zum Kolon kommt. Dabei ist die Anzahl der auftretenden Mutationen mit circa 36 pro Lebensjahr zwischen den Stammzellen verschiedener Organe vergleichbar [16]. Ausschlaggebend für das häufigere Auftreten von Tumoren in bestimmten Geweben scheint die Art des entstehenden DNA-Fehlers zu sein. Tumore des Kolons und Rektums (CRC; engl.: *colorectal cancer*) stellen dabei die am dritthäufigsten diagnostizierte Art von Krebs weltweit dar [17]. Laut der Internationalen Agentur für Krebsforschung kommen 55 % der Neuerkrankungen in den weiterentwickelten Ländern vor, wobei Australien und Neuseeland am häufigsten betroffen sind [18]. Unter allen Tumorerkrankungen war CRC 2015 nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO; engl.: *World Health Organization*) mit etwa 774,000 Todesfällen weltweit zudem nach Lungen- und Leberkrebs die häufigste Todesursache [19]. Als Risikofaktor gilt neben dem Geschlecht dabei eine vorhergehende Diagnose von Darmpolypen [20]. Etwa 5-10 % aller CRC-Fälle sind auf vererbare, genetische Erkrankungen, wie der familiären adenomatösen Polyposis oder dem Lynch-Syndrom, zurückzuführen [21]. Mindestens 2 % aller kolorektalen Karzinome treten infolge von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) wie Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn auf [22]. Zigarettenrauch und ein erhöhter Alkoholkonsum sind ebenfalls mit einer erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit assoziiert [23]. Weiterhin wird

der negative Einfluss von Übergewicht [24] und von rotem sowie verarbeitetem Fleisch diskutiert [25]. Mit einem vermindertem CRC-Risiko gehen dagegen vermutlich körperliche Bewegung und der Verzehr von Ballaststoffen einher [26]. Eine protektive Rolle weiterer Nahrungsbestandteile wie z. B. Selen wird ebenfalls für möglich gehalten (siehe 1.3). Den größten Einfluss auf die Entstehung von CRC hat jedoch das Alter. Mehr als 90 % der zwischen 1975 und 2010 diagnostizierten US-Bürger waren älter als 50 Jahre. Zuletzt stieg jedoch die relative Inzidenz in der Gruppe der unter 50-Jährigen. Diese Entwicklung ist wahrscheinlich der gestiegenen Anzahl an Vorsorgeuntersuchungen geschuldet [27]. Ziel des Screenings ist dabei vorrangig, Darmkrebs frühzeitig zu erkennen und entsprechend auch frühzeitig zu behandeln.

1.1.3 Molekulare Mechanismen der kolorektalen Karzinogenese

Mindestens 70 % der CRC-Fälle treten sporadisch aufgrund nicht erblich-bedingter Ursachen auf [28]. Im Allgemeinen wird für die Karzinogenese dabei ein Mehrstufenprozess angenommen. In der Initiationsphase kommt es zunächst in einer Zelle zur Manifestation einer oder mehrerer DNA-Mutationen durch z. B. genotoxische Noxen. Die Promotionsphase ist gekennzeichnet durch reversibles Wachstum der mutierten Zelle. Das anschließende Stadium der Progression resultiert dann in einem invasiv und autonom wachsenden Tumor, dessen Zellen karyotypische Änderungen aufweisen [29].

Laut einer von Hanahan und Weinberg im Jahr 2000 veröffentlichten Übersichtsarbeit weisen Krebszellen sechs grundlegende, im Laufe der Karzinogenese erworbene Eigenschaften auf [30]. Zu diesen gehören eine autonome Proliferation und gleichzeitige Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, das Verhindern von Apoptose, eine nachhaltige Angiogenese, die Invasion ins Gewebe inklusive Metastasierung sowie das unbegrenzte Potenzial zur Zellteilung. Zuletzt wurden auch metabolische Anpassungen durch Umprogrammierung des zellulären Energiestoffwechsels und das Umgehen der Elimination durch das Immunsystem als weitere Kennzeichen von Krebs beschrieben [31].

Die physiologische Grundlage der Karzinogenese bildet die 1990 beschriebene Adenom-Karzinom-Sequenz [32, 33]. Hierbei beruht die Bildung von Tumoren auf der Beeinflussung von tumorunterdrückenden und tumorfördernden Genen durch Mutation, Deletion, Promotor-methylierung oder anderweitiger Regulation [34]. Genomanalysen in 11 verschiedenen Fällen von CRC konnten dabei mehrere Dutzend mögliche Kandidatengene aufzeigen. Im Großteil der untersuchten Tumore waren APC (engl.: *adenomatous polyposis coli*), KRAS und TP53, der sogenannte „Wächter des Genoms“ [35], verändert [36]. Das tumorsuppressive APC-Gen unterliegt dabei meist früh einer Mutation, was zur Aktivierung des Wnt-Signalweges und damit der Dysregulation zwischen Proliferation und Differenzierung führt [37]. In der Folge kommt es zu ersten abnormalen Gewebsveränderungen, den sogenannten aberranten Krypten-Foci. Aus diesen bilden sich

aufgrund weiterer Mutationen wie der von KRAS dann Adenome, deren Wachstum und Dysplastizität fortwährend zunimmt. Die Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 kennzeichnet schließlich zumeist den Übergang zum invasiven Karzinom [38]. Neben diesem Schema weisen mindestens 12 % aller sporadischen CRC-Fälle einen Verlust der DNA-Mismatch-Reparaturaktivität auf. Das auch hochgradige Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) genannte Phänomen hat eine Vielzahl von Mutationen zur Folge [34]. Häufig mit MSI-H assoziiert ist dabei der 1999 erstmalig beschriebene, sogenannte CpG Insel Methylator Phänotyp. Hierbei kommt es aufgrund epigenetischer Fehler zur Hypermethylierung und damit Inaktivierung von Genen, die die Tumorigenese, Angiogenese und Metastasierung hemmen [39]. Analog dazu wurde in den letzten Jahren auch vermehrt auf die Bedeutung von DNA-Hypomethylierung in allen Phasen der Karzinogenese hingewiesen [40].

Als eine mögliche Ursache für pathologische DNA-Veränderungen bei CRC kommt oxidativer Stress infrage (Abb. 2). Dieser entsteht, wenn das Ausmaß reaktiver Sauerstoffspezies (ROS; engl.: *reactive oxygen species*) die körpereigenen antioxidativen Schutzsysteme überfordert [41]. ROS entstammen dem Metabolismus von molekularem Sauerstoff und umfassen unter anderem das Hyperoxid-Anion (O_2^-), Hydroperoxide (ROOH) sowie das hochreaktive Hydroxyl-Radikal ($OH\cdot$) [42]. Gebildet werden diese Substanzen z. B. als Nebenprodukt der Zellatmung oder als zelluläre Reaktion auf Fremdstoffe und Bakterien [43]. Sie üben wichtige Funktionen als sekundäre Botenstoffe in redox-sensitiven Signalwegen aus, die unter anderem die Zellproliferation regulieren [44]. Zu den am besten charakterisierten, ROS-bildenden Enzymen gehören die Xanthin-Oxidase (XO), Lip- und Cyclooxygenasen (LOX/COX) sowie die NADPH-Oxidasen (NOX) [45]. Die ambivalente Rolle von ROS in verschiedenen Stadien der Tumorentwicklung ist in einer Vielzahl von Übersichtsarbeiten zusammengefasst [46–48]. Zu den bekanntesten, durch ROS-regulierten Signalwegen gehört der nukleäre Faktor-kappa B (NFκB). Dieser ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktor setzt sich in Säugetieren aus den fünf Proteinen p65 (Rel A), Rel B, c-Rel, p50/p105 (NFκB1) und p52/p100 (NFκB2) zusammen, die je nach Art der Dimerisierung an verschiedenen Stellen der DNA binden können [49]. Im Menschen ist NFκB vorwiegend als Heterodimer, bestehend aus p50 und p65, zu finden [50]. Als einer der Auslöser des klassischen, kanonischen Signalwegs gilt die Bindung von Zytokinen wie Interleukin 1β (IL1β) am entsprechenden Rezeptor. Dieser Vorgang aktiviert eine Kinasekaskade mit anschließender Phosphorylierung der IκB-Kinasen (IKK). Der IKK-Komplex besteht aus der regulatorischen Untereinheit IKKγ (NEMO; engl.: *NFκB essential modifier*) sowie den katalytischen Untereinheiten IKKα und IKKβ und phosphoryliert wiederum IκB (engl.: *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*). Dieses Protein gibt dadurch das vormals gebundene p50/p65-Dimer frei,

welches wiederum in den Zellkern translozieren und nach Bindung an die DNA die Transkription von Zielgenen induzieren kann. I κ B selbst unterliegt dabei einem proteasomalen Abbau [51]. NF κ B kann durch ROS sowohl aktiviert als auch gehemmt werden. So reguliert die ROS-bedingte Oxidation verschiedener Cysteine in den IKK deren Aktivität [52]. Die DNA-Bindung von p50 kann ebenso durch Oxidation verhindert werden, was wiederum Einfluss auf die nachgeschaltete Gentranskription hat [53]. Zudem kann I κ B auch durch alternative, H₂O₂-modulierte Kinasen inaktiviert werden kann [54, 55]. Weiterhin verstärken ROS möglicherweise die Bindung von p65 an die DNA [56, 57]. Zu den im Zuge einer NF κ B-Aktivierung exprimierten Genen gehören Selenoproteine aus der Familie der Thioredoxinreduktasen (TXNRD) sowie die Glutathionperoxidase (GPX) 1. Auch prooxidative Proteine wie die vormals erwähnte XO, die COX2 und verschiedene LOXen sind typische NF κ B-Zielgene [52]. Eine konstitutive NF κ B-Aktivierung ist immunohistochemischen Analysen zufolge in 40 % der untersuchten CRC-Gewebe sowie 66 % der kolorektalen Krebszelllinien zu beobachten [58]. Der Signalweg fördert in diesem Kontext zumeist die Proliferation von Tumorzellen und verhindert außerdem das Einleiten apoptotischer Vorgänge [59].

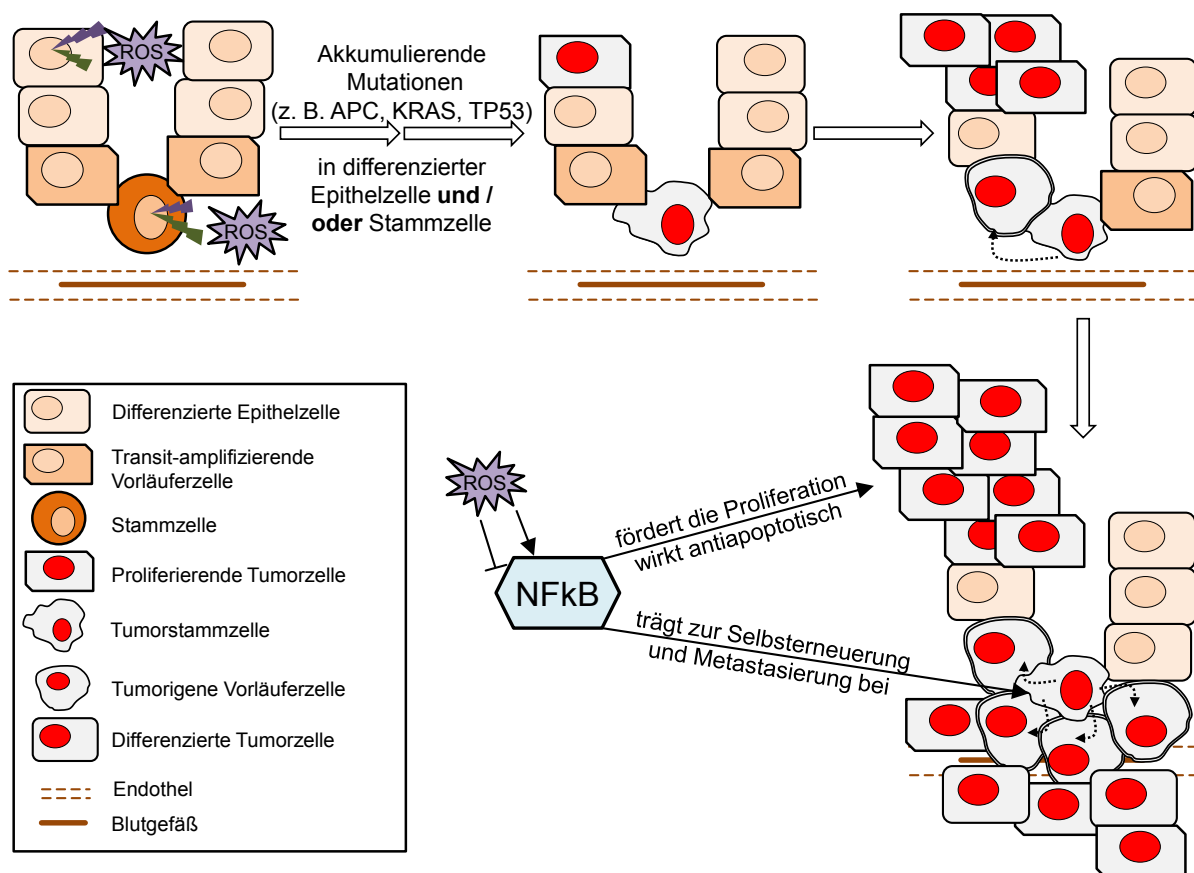


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der möglichen Entstehung von CRC

(modifiziert nach [60] und [61])

1.2 Selen & Selenoproteine

1.2.1 Selen als essenzielles Spurenelement

Selen wurde erstmals 1817 durch den schwedischen Chemiker Jöns Jakob Berzelius beschrieben und in Anlehnung an die griechische Mondgöttin Seléne benannt [62]. Es galt lange Zeit als Auslöser der sogenannten Alkali-Krankheit in Tieren und damit als toxisch [63]. Erst 1957 erkannte man die Essenzialität des Spurenelements [64]. Heutzutage wird vermutet, dass ein Großteil der biologischen Effekte des Selen durch Selenoproteine vermittelt wird. In diese wird es als proteinogene Aminosäure Selenocystein (Sec) kotranslational eingebaut (siehe 1.2.2) [65]. Selen kommt im Erdboden in regional stark variierender Konzentration vor und gelangt über die Aufnahme durch Pflanzen in die tierische Nahrungskette. Die Bioverfügbarkeit wird dabei durch eine Vielzahl verschiedener Faktoren wie dem pH-Wert des Bodens und der Form der vorliegenden Selenverbindung beeinflusst [66]. Die Zufuhrempfehlungen für den Menschen liegen im deutschsprachigen europäischen Raum bei geschätzten 70 µg/Tag für Männer und 60 µg/Tag für Frauen [67]. Bei unzureichender Zufuhr (< 10 µg/Tag) kommt es zu Erkrankungen mit charakteristischen Mangelercheinungen. Als bekannteste Krankheitsbilder kennt man die Keshan-Krankheit, eine Kardiomyopathie, und die Kashin-Beck-Krankheit, eine Osteoarthropathie [66]. Zu den Folgen eines moderaten Selenmangels gehören laut epidemiologischen Studien eine erhöhte Mortalitätsrate, die Schwächung des Immunsystems sowie kognitive Störungen. Zudem wurde ein negativer Einfluss auf den Verlauf einiger Autoimmunerkrankungen und Virusinfektionen postuliert. Die Wirkung von Selen folgt jedoch einer U-Kurve mit insgesamt geringer therapeutischer Breite [68]. Eine akute Intoxikation kann durch wenige Milligramm täglich hervorgerufen werden, während die Symptome einer chronischen Selenose ab 910 µg/Tag auftreten [69]. Deren Folgen sind unter anderem der Verlust der Nägel, Haarausfall und gastrointestinale Störungen [70]. Um Vergiftungserscheinungen zu vermeiden wird daher laut der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit eine obere Aufnahmegrenze von 300 µg Selen pro Tag empfohlen [71].

Der Selenstatus wird durch die Messung verschiedener Biomarker bestimmt. Hierbei wird, im Gegensatz zur Schätzung der Aufnahmemenge des Spurenelements durch Ernährungsfragebögen, der tatsächliche Selengehalt in verschiedenen Geweben festgestellt. Während der Selengehalt in Blut und Plasma eher eine aktuelle Bestandsaufnahme ermöglicht, spiegeln Haare und Nägel den Selenstatus der letzten 6-12 Monate wider. Faktoren wie der Einfluss verschiedener Selenpezies oder auch Schwermetalle auf die Speicherung, Bioverfügbarkeit und Ausscheidung des Elements limitieren diese Anwendung jedoch [72]. Aus den genannten Gründen wird der Selenstatus daher inzwischen vorrangig durch die Messung der Menge und Aktivität von Selenoproteinen wie den GPXen und Selenoprotein P (SELENOP) bestimmt [73]. Dieser Ansatz ermöglicht zudem Aussagen über

den Pool des spezifisch in Proteine eingebauten Selen, wogegen die Messung des Gesamtselengehalts auch unspezifisch eingebautes Selenomethionin erfasst. Selenoproteine können jedoch neben der Selenversorgung auch durch (oxidative) Stresssignale reguliert werden, was zu fälschlichen Meßergebnissen beitragen kann [74].

1.2.2 Biosynthese und Regulation von Selenoproteinen

Im Vergleich zur normalen Proteinbiosynthese treten bei der Synthese von Selenoproteinen mehrere Besonderheiten auf. Zum einen wird Sec durch das Basentriplett UGA kodiert, das normalerweise als Stoppcodon gelesen wird [75]. Den Einbau der Aminosäure gewährleistet dabei eine „selenocysteine insertion sequence“ (SECIS), die in Eukaryoten und Archaeen in der 3'-untranslatierten Region der Selenoprotein-mRNA liegt und eine charakteristische Haarnadelstruktur bildet [76]. Obwohl sich die bisher bekannten SECIS-Elemente in bestimmten Eigenschaften ähneln, sind sie letztlich für jede Selenoprotein-mRNA einzigartig [77, 78]. Weiterhin findet die Biosynthese von Sec direkt an der tRNA statt. Dazu wird zunächst Monoselenophosphat mithilfe der Selenophosphatsynthetase 2 (SEPHS2) aus Selenid synthetisiert. Anschließend wird Selen nach Abspaltung eines Pyrophosphats durch die Sep(O-Phosphoserine)-tRNA:Sec(Selenocysteine)-tRNA-Synthase (SEPSECS) auf eine Phosphoseryl-tRNA^{Ser/Sec} übertragen [79]. Im Anschluss interagiert die SECIS mit dem SECIS-Bindeprotein 2 (SBP2), das wiederum an die Ribosomen bindet [80]. SBP2 rekrutiert zudem den Sec-tRNA-spezifischen eukaryotischen Elongationsfaktor (EEFSEC) [81]. EEFSEC ist in der Lage, die Sec-tRNA^{[Ser]Sec} auf die ribosomale Bindestelle A zu transferieren [82, 83]. Ein weiterer Bestandteil des Synthesekomplexes ist mit dem ribosomalen Protein (RP) L30 ein Teil der großen Ribosomen-Untereinheit selbst. RPL30 wird eine Rolle in der Freisetzung von SBP2 von der SECIS nachgesagt, was einen Transfer von Sec von der tRNA in die wachsende Polypeptidkette ermöglicht [84].

Ein entscheidender Faktor bei der Selenoproteinsynthese ist die Verfügbarkeit von Selen. Kommt es zu einem Mangel, werden bestimmte Gewebe wie das Gehirn und die Testes bevorzugt mit Selen versorgt [85]. Weiterhin wird die Selenoproteinexpression innerhalb der Zellen bei Selenmangel durch verschiedene posttranskriptionelle Mechanismen reguliert. Zum einen kommt die tRNA^{[Ser]Sec} in zwei Isoformen vor, die sich in der Methylierung von Uridin an Position 34 unterscheiden. Bei ausreichender Selenversorgung wird 5-Methoxycarbonylmethyl-Uridin zumeist methyliert (mcm⁵Um) und sorgt so für die Synthese sogenannter stress-responsiver Selenoproteinen. Im Mangel dagegen gewährleistet die unmethylierte mcm⁵U-Form die Translation essenzieller Housekeeping-Selenoproteine [86–88]. Zudem ist die Menge einiger Selenoprotein-mRNAs im Selenmangel empfindlicher für den Abbau durch den *Nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) [89]. Hierbei spielt die unterschiedliche Affinität von SBP2 für verschiedene SECIS-Elemente eine Rolle [90]. Durch

die Regulation der UGA-Rekodierungseffizienz wird die Empfindlichkeit mancher Selenoprotein-mRNAs gegenüber dem NMD ebenfalls beeinflusst [91].

Mit dem eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 4a3 (EIF4a3), Nucleolin und dem tRNA-Selenocystein 1-assoziiertem Protein 1 (TRNAU1AP) wurden drei Proteine identifiziert, die zwar nicht essenziell für die Selenoproteinsynthese sind, aber trotzdem die Translationseffizienz beeinflussen können. EIF4a3 wird bei Selenmangel verstärkt exprimiert und konkurriert mit SBP2 um die Bindestelle des SECIS-Elements stress-responsiver Selenoproteine. Dies kann zu deren Translationsarrest führen und begünstigt wiederum die Synthese der Housekeeping-Selenoproteine [92]. Nucleolin steigert auf noch nicht abschließend geklärte Art ebenfalls die Translation hoch in der Hierarchie stehender Selenoproteine [93]. TRNAU1AP dagegen bindet an die tRNA^{[Ser]Sec} [94] und beeinflusst deren Methylierungsstatus und damit die Expression bestimmter Selenoproteine [95].

Auch bekannt ist, dass Cystein (Cys) bei Selenmangel Sec in zumindest einigen Selenoproteinen ersetzen kann [96]. Es wird vermutet, dass EEFSEC alternativ auch die Cys-tRNA^{[Ser]Sec} bindet. Diese tRNA wird bei Fehlen einer Selenquelle zur Bildung von Selenophosphat mithilfe von Thiophosphat durch die SEPHS2 synthetisiert.

Abgesehen von der Selenverfügbarkeit wird die Synthese der Selenoproteine auch von bestimmten (patho)physiologischen Stoffwechsellagen reguliert. Während der Akutphasereaktion kommt es beispielsweise zur Verringerung des systemischen Selenspiegels und von SELENOP im Serum von Mäusen infolge einer unterdrückten hepatischen Expression des Selenoproteinsyntheseapparats [97]. Auch oxidativer Stress kann zur vermehrten Synthese von Selenoproteinen führen, die an der Redoxhomöostase beteiligt sind [98]. Es wird vermutet, dass die dafür notwendige erhöhte UGA-Rekodierungseffizienz zustande kommt, indem SBP2, EEFSEC und RPL30 vom Zytoplasma in den Zellkern relokalisieren und dort akkumulieren [99]. Neuere Befunden relativieren allerdings die mögliche Beteiligung von nukleärem EEFSEC an der Regulation der Selenoproteinsynthese [100].

1.2.3 Die Funktion von Selenoproteinen im Menschen

Im humanen Genom finden sich 25 Gene, die für Selenoproteine kodieren. Zu den Selenoproteinen mit bekannter Funktion gehören die Dejodasen (DIO) 1-3, die GPXen 1-4 und 6, die TXNRD 1-3 sowie die Methionin-R-Sulfoxidreduktase 1 (MSRB1) und SEPHS2. Für die Selenoproteine SELENOF, SELENOH, SELENOI, SELENOK, SELENOM, SELENON, SELENOO, SELENOP, SELENOS, SELENOT, SELENOV und SELENOW konnte bisher nur teilweise beschrieben werden, welche Rolle sie im Organismus spielen. Eine Mehrzahl der bisher funktionell charakterisierten Selenoproteine dient als Oxidoreduktasen [101]. So katalysieren die GPXen z. B. die Glutathion (GSH)-abhängige Reduktion von Wasserstoffperoxid und weiteren organischen Peroxiden zu Wasser bzw. den

entsprechenden Alkoholen [102]. Das im katalytischen Zentrum der Enzyme eingebaute Selen liegt dabei zunächst als Selenolat vor, wird zu seleniger Säure oxidiert und dann mithilfe von zwei GSH-Molekülen wieder reduziert. Sec trägt generell zur wichtigen Rolle von Selenoproteinen in der Redox-Homöostase bei, da beispielsweise die Selenolgruppe bei physiologischem pH-Wert einen niedrigeren pKa-Wert als z. B. eine Thiolgruppe aufweist [103]. Von Sec ist weiterhin bekannt, Reaktionen mit Ein- oder Zwei-Elektronentransfer effizienter zu katalysieren als Cys, welches häufig im aktiven Zentrum von Nicht-Selenoproteinen zu finden ist [104]. Auch die höhere Nukleophilie von Selen verglichen mit Schwefel ist ursächlich für die hohe Redox-Reaktivität Sec-haltiger Proteine [105]. Die essenzielle Bedeutung einiger Selenoproteine wie der TXNRD1 für die DNA-Synthese oder der GPX4 als antioxidatives Enzym ist durch die embryonale Letalität muriner Knockouts (KO) der entsprechenden Selenoproteine belegt [106, 107]. Weiterhin sind Selenoproteine beispielsweise auch am Metabolismus von Schilddrüsenhormonen und an der Spermienreifung beteiligt [62].

1.3 Selen, Selenoproteine und Krebs

Betrachtet man die Vielzahl an Untersuchungen, so geht von Selen entweder eine krebopräventive, eine krebstherapeutische oder sogar eine karzinogene Wirkung aus [108]. In mehr als 2/3 von über 100 ausgewerteten Tierstudien konnten die antikarzinogenen Eigenschaften einer supranutritiven Selenzufuhr bestätigt werden [109]. Auch bei kultivierten Tumorzellen wirkte das Element wachstumshemmend und proapoptotisch [110]. Erste epidemiologische Untersuchungen im Menschen zeigten protektive Effekte von Selen auf die Entstehung verschiedener Arten von Krebs, darunter auch CRC (zusammengefasst in [68]). Aufgrund der nicht eindeutigen Ergebnisse diverser Folgestudien stufte der „World Cancer Research Fund“ 2007 die antikarzinogene Wirkung selenhaltiger Nahrungsmittel für Prostatakrebs als wahrscheinlich, für Kolorektal-, Lungen- und Magenkrebs als „limited-suggestive“, also mit begrenzter Beweislage, aber möglich, ein [111]. Die kürzlich erschienene dritte Ausgabe des Reports weist dagegen nur noch auf den nicht eindeutig bewiesenen, aber möglichen Zusammenhang zwischen niedrigen Plasmaselenwerten und dem erhöhten Risiko an Prostatakrebs zu erkranken, hin [112]. Einfluss auf diese Entscheidung hatte möglicherweise eine 2014 erschiene Cochrane-Auswertung mit insgesamt 1,1 Mio Teilnehmern aus acht randomisiert kontrollierten Studien (RCT; engl.: *randomized controlled trial*) und 55 prospektiven Beobachtungsstudien [113]. Zwar zeigte sich in den Beobachtungsstudien die potenziell protektive Wirkung eines hohen Selenstatus in Bezug auf Magen-, Blasen und Prostatakrebs, ein Teil der Untersuchungen war allerdings aufgrund des Designs und der Datenqualität nur begrenzt aussagekräftig. Die Auswertung der RCTs konnte ebenfalls nicht eindeutig aufzeigen, dass eine Selensupplementation das Krebsrisiko senkt. Laut EPIC-Kohortenstudie besteht dagegen ein Zusammenhang zwischen

niedrigem Selenstatus und dem Risiko, im Laufe des Lebens an CRC zu erkranken [114]. Eine CRC-fördernde Wirkung aufgrund der verringerten Expression bzw. Aktivität bestimmter Selenoproteine und/oder das Auftreten spezieller Selenoproteinvarianten ist bei mangelhafter Selenversorgung nicht auszuschließen [115]. Patienten mit bereits bestehenden Tumoren des Gastrointestinaltrakts (GIT) weisen häufig einen geringeren Blut- bzw. Plasmaselengehalt gegenüber gesunden Probanden auf. Interessanterweise zeigten ebendiese Tumore im Vergleich zum gesunden umgebenden Gewebe eine Selenanreicherung [116, 117]. Welchen Einfluss solch eine Selenanreicherung in Krebszellen letztendlich auf den Krankheitsverlauf und damit die Überlebenswahrscheinlichkeit hat, ist aktuell noch ungeklärt. Es gibt jedoch vielfältige Hinweise auf die Regulation und damit oft auch Funktion vieler Selenoproteine während CRC [118], von denen im Folgenden einige Vertreter vorgestellt werden.

1.3.1 Glutathionperoxidase 1

Die GPX1 wurde 1973 als erstes Selenoprotein in Säugerzellen beschrieben [119]. Sie kommt als Tetramer vor, wird ubiquitär exprimiert und ist im Cytosol, in den Mitochondrien und teilweise auch in den Peroxisomen lokalisiert [120–122]. Das Enzym wirkt der Anhäufung toxischer Wasserstoffperoxidkonzentrationen (H_2O_2) entgegen, indem es GSH als Elektronendonator verwendet. Unter allen GPXen scheint diese Isoform dabei die beste GSH-Bindung aufgrund ihrer fünf an der Reaktion beteiligten Aminosäurereste aufzuweisen [123]. Das Substratspektrum umfasst auch andere lösliche Hydroperoxide sowie Monoacylglycerolhydroperoxide mit und ohne Phospholipidanteil [124, 125]. Die GPX1 hat eine hauptsächlich antioxidative Funktion und schützt *in vivo* vor allem gegen schweren und akuten oxidativen Stress [102]. Der niedrige Rang in der Hierarchie der Selenoproteine bedingt jedoch, dass die Expression der GPX1 sensibel auf die Selenzufuhr reagiert und beispielsweise drastisch im Mangel sinkt [126].

Die Rolle der GPX1 während der Karzinogenese ist ambivalent und zunächst einmal abhängig vom Stadium der Erkrankung. In der Initiationsphase hat das Enzym aufgrund der Hemmung oxidativ-bedingter DNA-Mutationen krebshemmende Eigenschaften [127]. Die Studienlage zur Rolle während der Tumorpromotion ergab dagegen sowohl anti- als auch prokarzinogene Funktionen. Eine GPX1-Überexpression in Krebszellen der Bauchspeicheldrüse sorgte für ein verringertes Zellwachstum und damit einhergehend kleinere Tumore im Nacktmausmodell [128]. Laut Untersuchungen scheint das Enzym zudem ein Tumorsuppressor bei Magenkrebs zu sein [129]. Ein GPX1-Knockdown (KD) verringerte dagegen die Proliferation von Brustkrebszellen [130]. Weiterhin führte eine Überexpression sowohl in humanen Gliomzellen als auch in chemisch-induziertem Hautkrebs bei Mäusen zu erhöhter Malignität [131, 132]. Offenbar hängt die Rolle der GPX1 von der Menge und der Herkunft des zellulär produzierten H_2O_2 ab, da die Regulation des

Proteins in vielen der zitierten Studien eine gleichzeitige Änderung des Redoxstatus der Zelle zur Folge hatte. Zuletzt sind auch sogenannte Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP; engl.: *single nucleotide polymorphism*) in den Fokus der Forschung gerückt. Daraus resultierende Genvarianten verschiedener Selenoproteine inklusive der GPX1 haben möglicherweise funktionelle Auswirkungen auf deren Expression und Aktivität und können damit das Risiko, an Krebs zu erkranken, beeinflussen (siehe zusammenfassend [133]).

1.3.2 Glutathionperoxidase 2

Die erstmalige Beschreibung der homotetrameren GPX2 erfolgte 1993 durch Chu et al. [134]. Zusätzlich zur hohen Sequenzhomologie teilt sich das Protein laut dieser Untersuchung ein ähnliches Substratspektrum mit der GPX1. Neben H₂O₂ werden somit auch organische Hydroperoxide reduziert, diese jedoch mit höherer Reaktivität [134]. Im Gegensatz zur GPX1 wird die GPX2-mRNA selbst bei Selenmangel stabil exprimiert [135, 136]. Eine solch stabile mRNA ermöglicht die rasche Proteinneusynthese nach Selensupplementation. Hierdurch nimmt das Enzym, ähnlich wie die GPX4, einen hohen Rang in der Hierarchie der Selenoproteine ein. Die GPX2 ist ausschließlich in Epithelzellen lokalisiert und dort vor allem im GIT, weswegen man früher von einer Funktion als Barriere gegen die Absorption gastrointestinaler Hydroperoxide ausging [137]. Daneben findet man das Protein auch in der Leber, dem Magen und der Gallenblase [138] sowie in Epithelzellen von Blase [134], Brust [139] und Lunge [140]. Im Darmepithel sind die proliferierenden Zellen des Kryptengrunds sowie Panethzellen des Dünndarms durch eine hohe GPX2-Expression gekennzeichnet [141]. Die Aktivierung des GPX2-Promotors erfolgt dabei unter anderem durch den Wnt-Signalweg [142, 143], welcher für seinen regulatorischen Einfluss auf intestinale Stammzellen bekannt ist [144]. Auch in humanen induzierten pluripotenten Stammzellen zeigte sich die GPX2 stark hochreguliert und vermittelte dort einen Schutz vor oxidations-bedingten DNA-Schäden [145]. Ebenso war bei der Organogenese muriner Embryos eine transient erhöhte Expression des Enzyms, vor allem in den schnell wachsenden Geweben, nachweisbar [146]. Diese Befunde deuten auf eine mögliche Funktion in der intestinalen Homöostase, insbesondere bei der ständigen Erneuerung des Darmepithels, hin [102]. Zudem ist die antiinflammatorische Funktion der GPX2 gut beschrieben. Einerseits kommt es zur Hochregulation des Proteins in Modellen der chemisch-induzierten Colitis sowie auch in Patienten mit CED [147]. Andererseits entwickeln Mäuse mit Doppel-Knockout (DKO) von GPX1 und GPX2 ebenfalls eine chronische Colitis [148], welche jedoch durch ein GPX2-Allel verhindert werden kann [149]. Mechanistisch könnte dies mit der Hemmung der COX2-Expression durch die GPX2 und der damit einhergehenden verminderten Produktion des Entzündungsmediators Prostaglandin E₂ (PGE₂) zusammenhängen [150].

Während die GPX1 in bestehenden Tumoren zumeist eine im Vergleich zu gesundem Gewebe verringerte Expression zeigte, ist die GPX2 häufig in Krebszellen hochreguliert. Hohe GPX2-Level sind dabei zumeist zu Beginn der Karzinogenese, beispielsweise während der neoplastischen Transformation von Keratinozyten [151] oder bei der Entstehung früher Adenome [152], zu beobachten. Im Kontext einer entzündungsgetriebenen Karzinogenese wiesen GPX2-KO-Mäuse eine höhere Anzahl an Tumoren im Kolon auf, was zur postulierten antiinflammatorischen Rolle des Enzyms passt [153]. In einem Modell des sporadisch auftretenden CRC resultierte das Fehlen des Proteins dagegen in einer verringerten Tumorzahl im Vergleich zu den Kontrolltieren [154]. Ursache dafür ist laut den Autoren der Wegfall der antiapoptischen Funktion der GPX2 und damit die effiziente Eliminierung teilweise transformierter Zellen. Auch in Xenografts kolorektaler HT29-Zellen sowie aus CRC-Patienten gewonnenen Tumorsphäroiden war die GPX2-Expression positiv mit dem Tumorwachstum verknüpft [155, 156]. Eine Hochregulation in Abhängigkeit von der Art des kolorektalen Tumors, dem sogenannten *Colon Cancer Subtype* (CCS), scheint zudem einen Einfluss auf spätere Behandlungsmöglichkeiten zu haben [157]. Die höchste Menge an GPX2-mRNA wiesen vergleichsweise gut differenzierte, chromosomen-instabile Tumore (CCS1) auf, die häufig eine KRAS und/oder TP53-Mutation sowie eine gleichzeitige Expression vieler Wnt-Zielgene zeigen. Eine hohe Enzymexpression in therapieresistenten, ungleich aggressiveren Tumoren mit stammzellähnlichem Phänotyp (CCS3) korrelierte dagegen mit einer signifikant geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit [156]. Die GPX2 scheint also vor allem zu Beginn der Karzinogenese ebenso wie die GPX1 vor DNA-Schäden und damit einhergehender Zelltransformation zu schützen. Auch im Zuge der durch Entzündung geförderten CRC ist eine gewisse antikarzinogene Funktion gegeben. Bereits bestehende Tumore profitieren dagegen offenbar von der antioxidativen Eigenschaft des Enzyms und auch die Fähigkeit zur Migration und Invasion von Krebszellen korreliert mit der GPX2-Expression [155].

1.3.3 Selenoprotein H

Die genomweite Suche nach SECIS-Elementen, potenziell-kodierenden UGA-Codons und Cys-enthaltenden Homologen führte 2003 zur Charakterisierung des Selenoproteoms in Säugetieren. Dabei stieß man neben vier weiteren bis dato unbekanntenen Selenoproteinen auch auf SELENOH, das keinerlei Sequenzhomologie zu bereits funktionell charakterisierten Proteinen aufwies [158]. Eine Ähnlichkeit zu anderen Selenoproteinen ist durch das CXXU-Motiv gegeben, welches auf eine mögliche Funktion als Oxidoreduktase hinweist. Hierbei sind die Aminosäuren Cys (C) und Sec (U) durch zwei beliebige Aminosäuren (XX) getrennt, was an die Thioredoxin-typische Faltung mit α -Helix und β -Faltblatt sowie CXXC-Motiv im aktiven Zentrum erinnert. SELENOH wird daher zur Proteinfamilie der Redoxine (Rdx-Proteine) gezählt [159]. Eine Expression konnte bisher in verschiedenen Mausegeweben, vor

allem während der Embryogenese, nachgewiesen werden. Das Protein ist dabei präferentiell in den Kernkörperchen des Zellkerns lokalisiert [160].

Reguliert wird die Expression des Proteins zum größten Teil durch den Selenstatus. Sowohl im Kolon marginal mit Selen-versorgter Mäuse als auch in Leber, Niere und Muskel stark selen-defizienter Ratten waren signifikant verringerte SELENOH-Transkriptlevel gegenüber Gewebeproben von Tieren messbar, die mit einer Selen-adäquaten Diät gefüttert wurden [126, 161]. Die Selensensitivität der mRNA-Expression ließ sich zudem in YAMC-Zellen (engl.: *young adult mouse colon*) bestätigen [162]. Die genaue Funktion des Proteins ist noch unklar, deutet aber auf eine Rolle in der Redox-Homöostase hin. Untersuchungen in der Taufliege *Drosophila melanogaster* beschrieben SELENOH als einen wichtigen Bestandteil des antioxidativen Schutzsystems. Der KD des Proteins verringerte dabei unter anderem die Zahl geschlüpfter, lebender Insektenlarven und erhöhte den Anteil an sichtbaren, morphologischen Abnormalitäten der Tiere [163]. LCC1-Lungenkrebszellen der Maus zeigten mit SELENOH-KD zudem eine höhere Empfindlichkeit gegenüber H_2O_2 [160]. In UVB-bestrahlten murinen HT22-Hippocampuszellen war mit stabiler SELENOH-Überexpression eine erhöhte Lebensfähigkeit bei gleichzeitig verringerter Produktion von O_2^- nachweisbar [164]. Dabei scheint das Protein in diesen Zellen die Mitochondrien-vermittelte intrinsische Apoptose zu verhindern [165]. Auch eine Steigerung der mitochondrialen Biogenese und Leistung wurde bei SELENOH-Überexpression beobachtet [166, 167]. Das Protein ist weiterhin möglicherweise an der Regulation des GSH-Stoffwechsels beteiligt. Bei Überexpression von SELENOH in HT22-Zellen waren erhöhte Level von GSH sowie GSH-synthetisierender Enzyme messbar [168]. Laut dieser Studie agiert SELENOH damit als Redoxsensor, vermutlich vermittelt über die DNA-Bindung durch ein AT-Hakenmotiv.

Eine mögliche Rolle von SELENOH in der Karzinogenese ist abgesehen von dessen hoher Expression in diversen Tumorzelllinien bisher nur unzureichend untersucht worden [169]. Experimente in diploiden MRC-5 Lungenfibroblasten deuten allerdings auf eine mögliche Funktion des Proteins in der Wachstumsregulation hin. Zellen mit einem SELENOH-KD weisen dabei unter anderem eine gegenüber Kontrollzellen stark erniedrigte Proliferationsrate auf. Zudem schützte SELENOH die Zellen unter oxidativen Stressbedingungen vor der zellulären Seneszenz, einem Schutzprogramm zur Unterbindung unkontrollierter Zellteilung [170]. Aus Experimenten mit Zebrafischen ist zudem bekannt, dass ein DKO von SELENOH zusammen mit TP53 die gastrointestinale Tumorentwicklung beschleunigt [171].

1.4 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es die Rolle der beiden Selenoproteine GPX2 und SELENOH bei CRC genauer zu beleuchten. Hierfür sollte die Expression der Proteine in einer humanen Darmkrebszelllinie mittels stabil-transfizierter shRNA herunterreguliert werden. Um Isoform-spezifische Effekte der GPX2 zu detektieren, war geplant einen zusätzlichen Zellklon mit verminderter Aktivität der stark sequenz-homologen GPX1-Expression herzustellen und zu untersuchen. In diesen Tumorzellen sollten dann zunächst mithilfe eines PCR-Arrays durch die KDs beeinflusste zelluläre Signalwege analysiert werden. Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe deuteten dabei bereits auf eine Funktion der GPX2 in der entzündungsgetriebenen Karzinogenese sowie dem damit eng verbundenen NFκB-Signalweg hin. Die Stimulation von Krebszellen mit dem proinflammatorischen Zytokin IL1β sollte daher zur Aufklärung der Rolle von GPX1 und GPX2 in diesem Kontext beitragen. Weiterhin sollte die Substratspezifität der GPX2 und damit einhergehend der zelluläre Schutz vor Apoptose untersucht werden. In diesem Kontext war die Untersuchung von Darmkrebszellen mit modifizierter GPX2-Aktivität geplant, wobei eine Behandlung mit verschiedenen Hydroperoxiden eine oxidative Belastungssituation darstellen sollte.

Der Effekt des SELENOH-KDs in HT29- und zusätzlich Caco2-Zellen sollte vor allem in Hinblick auf das tumorigene Potenzial dieser Zellen unter Einbeziehung möglicher molekularer Mechanismen untersucht werden. Zusätzlich zur Detektion spezifischer Marker für die Proliferation und Differenzierung sollte der Einfluss des Proteins auf die Wachstums- und Migrationsfähigkeit von Tumorzellen untersucht werden. Die Übertragung auf ein Tumor-Xenograft-Modell in der Maus sowie die Analyse der SELENOH-Expression in Gewebeschnitten von Darmkrebspatienten sollte die *in vivo* Relevanz des Proteins in der kolorektalen Karzinogenese klären.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Materialien

Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Antibody Diluent (background reducing)	DAKO, Glostrup, Dänemark
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bacto-Agar	BD, Franklin Lakes, USA
Blue Loading Buffer (6x)	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Bovines Serumalbumin (für Bradford)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Bovines Serumalbumin (für Reverse Transkription)	New England Biolabs, Ipswich, USA
Bovines Serumalbumin (für Antikörper)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bradford-Färbelösung	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Coomassie Brilliant Blau G-250	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
D(+)-Glucose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)	Bioline, London, GB
Diethanolamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dihydrorhodamin 123 (DHR123)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dynabeads [®] mRNA DIRECT [™] Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
DMEM high glucose	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Eosin-Y	Fluka, Deisenhofen, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid (100 mg Tabletten)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Formaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
GlutaMAX [™] -I	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Glutathion (GSH)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glutathionreduktase (GR)	Roche, Basel, Schweiz
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Histofluid	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Hydroperoxyeicosatetraensäure (HPETE)	laboreigene Herstellung
Hydroperoxyoctadecadiensäure (HPODE)	laboreigene Herstellung
innuPrep DOUBLEpure Kit	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Serva, Heidelberg, Deutschland
L(+)-Selenomethionin	Acros Organics, Geel, Belgien
LE Agarose	Biozym Oldendorf, Deutschland
Liquid DAB+ Substrate Chromogen System	DAKO, Glostrup, Dänemark
Luperox [®] TBH70X, tert-Butylhydroperoxidlösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Magermilchpulver	Sucofin, Zeven, Deutschland
Magnesiumchlorid (für qPCR)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
M-MLV Reverse Transkriptase + 10x Puffer	Promega, Fitchburg, USA
Nicht-essenzielle Aminosäuren	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
N-Histofine [®] Simple Stain [™] Mouse MAX PO (M)	Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan
N-Histofine [®] Simple Stain [™] Mouse MAX PO (R)	Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan
Natriumazid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumbutyrat	Acros Organics, Geel, Belgien
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumorthovanadat (Na ₃ VaO ₄)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumselenit (Na ₂ SeO ₃)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Neutralrot	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Oligo(dT)15-Primer	Promega, Fitchburg, USA
p-Nitrophenylphosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Paraffin	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Pen Strep (Penicillin / Streptomycin)	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
PeqGold DNA Leiter Mix	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Ponceau S	Serva, Heidelberg, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Protease-Inhibitor Cocktail III	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Proteinase K (20 mg/mL)	Analytik Jena, Jena, Deutschland
psiRNA-h7SKneo	InvivoGen, San Diego, USA
psiRNA-h7SKnScr	InvivoGen, San Diego, USA
qPCR-Wasser	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Real [™] Target Retrieval solution	DAKO, Glostrup, Dänemark
RNase	Roche, Basel, Schweiz

RNase A-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RNAasin [®]	Promega, Fitchburg, USA
Roti [®] -Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese [®] Gel 40 (29:1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RQ1-DNase	Promega, Fitchburg, USA
RQ1-Reaktionspuffer (10x)	Promega, Fitchburg, USA
RT ² First Strand Kit RT ² qPCR Master Mixes	Qiagen, Venlo, Niederlande
RT ² qPCR Master Mix	Qiagen, Venlo, Niederlande
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
SensiFAST cDNA Synthesis Kit	Biolone, London, GB
SuperSignal [®] West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SYBR [®] Green I	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Taq-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Taq-Puffer (10x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Tris	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Tris/HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Tween [®] 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.2 Lösungen und Puffer

Tabelle 2: Hergestellte Lösungen und Puffer

ALP-Lysepuffer	0,5 mM MgCl ₂
(pH 9,8)	10 % Diethanolamin
Blotpuffer D (Western Blot)	100 mM Glycin
	25 mM Tris
	15 % Methanol
Coomassie Brilliant Blau-Färbelösung	42,5 Vol.-% Ethanol
	10 Vol.-% Essigsäure
	5 Vol.-% Methanol
	0,1 % Coomassie Brilliant Blau G-250

Elektrophoresepuffer	192 mM Glycin
(pH 8,5)	25 mM Tris
	3,5 mM SDS
Entfärbelösung (NRU)	50 Vol.-% Ethanol
	1 Vol.-% Essigsäure
Entfärbe- und Fixierlösung	10 Vol.-% Methanol
	7 Vol.-% Essigsäure
Färbelösung (Zellzyklus)	PBS
	1 g/L Glucose
	100 U/mL RNase
	50 µg/mL Propidiumiodid
Hämalaunlösung nach Mayer (H&E)	302 mM Chloralhydrat
	105 mM Kalialaun
	5,2 mM Zitronensäure
	3,3 mM Hämatoxylin
	1 mM NaIO ₃
HBSS	137 mM NaCl
	5,4 mM KCl
	4,2 mM NaHCO ₃
	1,3 mM CaCl ₂
	1,0 mM MgSO ₄
	0,44 mM KH ₂ PO ₄
	0,25 mM Na ₂ HPO ₄
Homogenisationspuffer	300 mM KCl
(pH 7,6)	100 mM Tris/HCl
	0,1 % Triton X-100
	+ 1 µL/mL Protease-Inhibitor Cocktail III
	+ 2 µL/mL 200 mM Natriumorthovanadat
PBS	140 mM NaCl
(pH 7,4)	10 mM Na ₂ HPO ₄
	3 mM KH ₂ PO ₄

Ponceau-Lösung	5 % Essigsäure
	0,001 % Ponceau S
Prämix (Soft Agar)	10 mL konditioniertes Medium
	3 mL 6x DMEM Medium
	2 mL FCS
Reduzierender Laemmli-Puffer (5x)	62,5 mM Tris
(pH 6,8)	10 % Glycerin
	2,5 % β -Mercaptoethanol
	2 % SDS
	1,25 % Bromphenolblau
RIPA-Puffer	150 mM NaCl
(pH 7,7)	50 mM Tris
	2 mM EDTA
	1 % Nonidet P40
	0,5 % Natriumdesoxycholat
	0,1 % SDS
TAE-Puffer	40 mM Tris
(pH 8)	20 mM Essigsäure
	1 mM EDTA
TBST	150 mM NaCl
(pH 7,5)	50 mM Tris
	0,1 % Tween 20
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl
(pH 8)	1 mM EDTA
	+ ggfls. 0,2 % Triton X-100 (v/v)
Trypanblau-Lösung	0,4 % Trypanblau
	1:3 mit PBS verdünnt
Trypsin-EDTA-Lösung	0,05 % Trypsin
(pH 7,4)	0,02 % EDTA

2.3 Tierversuche

Männliche C57BL/6J und APC^{min/+}-Mäuse wurden in einzelbelüfteten Käfigen bei 12-stündigem Licht-Dunkel-Rhythmus und freiem Zugang zu Futter und Wasser unter spezifisch-pathogen-freien Bedingungen gehalten.

Den C57BL/6J-Mäusen wurde Futter auf Basis von Torula-Hefe (Altromin C1045, Lage, Deutschland) mit einem Selengehalt von 0,086 mg/kg (-Se) verabreicht. Für die Selen-adäquate Diät wurde das Futter mit L(+)-Selenomethionin (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) auf einen Selengehalt von 0,15 mg/kg (+Se) standardisiert. Die APC^{min/+}-Mäuse erhielten Standardfutter mit einem ungefähren Selengehalt von 0,3 mg/kg. Zum Zeitpunkt der Tötung waren die Tiere 16 Wochen alt.

Alle im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Tierversuche wurden unter Berücksichtigung der Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Haltungsbedingungen entsprachen dabei den Richtlinien der *Federation of Laboratory Animal Science Associations* sowie der Gesellschaft für Versuchstierkunde. Eine Genehmigung der Experimente (Projektnummer 2347-06-2014) erfolgte durch die Tierschutzkommission des DIfE sowie durch die lokalen Behörden (Landesamt für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz, Brandenburg, Deutschland).

2.3.1 Nacktmausversuch

Um das Tumorwachstum des SELENOH-KDs *in vivo* zu untersuchen, wurden HT29-Zellen (2×10^6 /mL) in Medium resuspendiert, das frei von Antibiotika und fötalem Kälberserum (FCS) war. Je 1×10^6 Zellen des SCR oder SELENOH-KD2 wurden dann subkutan in den linken oder rechten Hinterlauf von 10 athymischen Nacktmäusen (Crl:CD1-Foxn1^{nu}, 6-8 Wochen alt) injiziert. Die Tiere stammten von Charles River (Wilmington, USA), wurden keimfrei gehalten und hatten freien Zugang zu Standardfutter und Trinkwasser. Vier Wochen später wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation getötet und die Tumore entnommen sowie gewogen. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren oder bis zur histologischen Einbettung in 4 % Formaldehydlösung gelagert. Der Tierversuch wurde in der Abteilung Humanernährung von Dr. René Thierbach am Institut für Ernährungswissenschaften, Friedrich-Schiller-Universität Jena, durchgeführt. Alle Experimente wurden durch die zuständigen örtlichen Behörden genehmigt (Jena, 02-011/15).

2.3.2 Histologische Aufarbeitung der Mausproben

Die für immunhistochemische Untersuchungen vorgesehenen Gewebeproben wurden direkt nach der Entnahme in Einbettkassetten gelegt, 24 h lang in 4 % Formaldehyd fixiert und dann für 24 h mit fließendem Leitungswasser gespült. Die darauf folgende Entwässerung der Proben mithilfe des Shandon Hypercenter XP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ist in Tabelle 3 beschrieben.

Tabelle 3: Entwässerung der Gewebeprobe vor Einbettung in Paraffin

Substanz	Temperatur	Dauer	Bemerkung
Ethanol (55 %)	40 °C	45 min	
Ethanol (70 %)	40 °C	60 min	
Ethanol (96 %)	40 °C	60 min	
Ethanol (96 %)	40 °C	90 min	
Ethanol (100 %)	40 °C	60 min	
Ethanol (100 %)	40 °C	90 min	im Vakuum
Toluol	40 °C	60 min	
Toluol	40 °C	120 min	im Vakuum
Paraffin	60 °C	90 min	
Paraffin	60 °C	120 min	im Vakuum

Die Einbettung der Proben in Paraffin erfolgte am Shandon Histocentre 2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Von den Paraffinblöcken wurden dann mit einem Rotationsmikrotom (HM 355S, Walldorf, Deutschland) 2 µM dünne Schnitte angefertigt. Diese wurden im Wasserbad bei 38 °C gestreckt, auf Objektträger aufgezogen und im Wärmeschrank bei 38 °C getrocknet. Zur Vorbereitung der Färbung mussten die Proben wiederum im Multistainer ST5020 (Leica, Wetzlar, Deutschland) entparaffiniert und rehydriert werden. Dabei kam das in Tab. 4 aufgeführte Protokoll zur Anwendung.

Tabelle 4: Verarbeitungsschritte der Gewebeprobe vor und nach der Färbung

Entparaffinierung/Rehydrierung		Entwässerung	
Substanz	Dauer	Substanz	Dauer
Toluol	120 sec	Ethanol (70 %)	20 sec
Toluol	180 sec	Ethanol (96 %)	60 sec
Ethanol (100 %)	120 sec	Ethanol (100 %)	120 sec
Ethanol (100 %)	180 sec	Ethanol (100 %)	180 sec
Ethanol (96 %)	120 sec	Toluol	180 sec
Ethanol (70 %)	120 sec	Toluol	180 sec
Ethanol (40 %)	120 sec		
Wasser (destilliert)	120 sec		

H&E-Färbung

Die Färbung mittels Hämatoxilin und Eosin (H&E) macht verschiedene Zellstrukturen sichtbar, die anschließend aufgrund ihrer Farben unterschieden werden können. Dabei färbt basisches Hämalan die saure DNA blau, wogegen basische Plasmaproteine durch das saure Eosin pink erscheinen. Entparaffinierte Gewebeschnitte wurden zunächst 1 min in saurer Hämalanlösung nach Mayer gefärbt und 6 min mit fließendem Leitungswasser sowie destilliertem Wasser gespült. Die Färbung mit Eosin-Y erfolgte für 50 s. Es folgte ein erneuter Waschschrift der Schnitte mit fließendem Leitungswasser für 20 s sowie das abschließende Abspülen mit destilliertem Wasser.

Immunhistochemische Färbung

Die in Kunststoffküvetten mit Citratpuffer (DAKO Real™ Target Retrieval solution, pH 6,0) bedeckten Gewebeschnitte wurden zunächst für 5 min in der Mikrowelle aufgeköcht und dann 5 min zum Abkühlen stehen gelassen. Fünf weitere Minuten in der Mikrowelle sollten den Antigenaufschluss gewährleisten. Nach zweimaligem Spülen folgten 10 min in 3 % H₂O₂, um die endogene Peroxidaseaktivität zu blockieren. Nach zwei Mal 2 min in destilliertem Wasser und 5 min in Tween-Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBST; engl.: *Tris-buffered saline with Tween20*) erfolgte die Umrandung der Schnitte mit einem wasserabweisendem Stift (DAKO Pen). Anschließend wurde der mit Antibody Diluent verdünnte Antikörper (AK) gegen SELENOH (aus Kaninchen; Abcam ab151023; 1:300) bzw. gegen β -Catenin (aus Maus; BD 610153; 1:8000) aufgebracht und über Nacht bei 4 °C in Wasserdampf-gesättigten Kammern inkubiert. Am nächsten Tag folgten zwei Mal 5 min in TBST und eine Spülung in TBS. Dann wurde der Peroxidase-gekoppelte Sekundär-AK (N-Histofine Simple Stain MAX PO anti-rabbit / anti-mouse) auf die Schnitte getropft und 30 min in einer wasserdampfgesättigten Kammer inkubiert. Nach zwei Waschschrritten in TBST und einem Waschschrtritt in TBS folgte die Visualisierung der Färbung durch Zugabe einer 3,3'-Diaminobenzidin-Lösung (Liquid DAB+ Substrate Chromogen System). Hierbei oxidiert die Peroxidase des Sekundär-AKs das Chromogen 3,3-Diaminobenzidin mithilfe des im Substratpuffer enthaltenen H₂O₂ zu einem braunen Präzipitat. Diese Reaktion wurde nach 1 min durch Spülen der Schnitte in destilliertem Wasser gestoppt. Es folgte die Entwässerung und Eindeckung der gefärbten Proben in Histofluid mithilfe des Coverslipper CV5030 (Leica, Wetzlar, Deutschland) (Tab. 4). Die Immunfärbungen von SELENOH wurden anschließend anhand eines Punktesystems von 0 (keine sichtbare Färbung) bis 3 (starke Färbung) an einem Axio Observer D1-Mikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet.

2.4 Zellkultur

Für die Durchführung der Zellkulturexperimente dienten die drei humanen Kolonkarzinomzelllinien Caco2, HCT116 und HT29. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank (Memmert, Schwabach, Deutschland) bei 37 °C, 5 % CO₂-Partialdruck und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre. Die Zellen erhielten *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) mit verschiedenen Zusätzen und 10 % FCS (Tab. 5). Da der Anteil an Selen im verwendeten FCS gering war (Charge F7524; Biochrom, Berlin), wurden die Zellen, wenn nicht anders angegeben, ab Aussaat mit 50 nM Natriumselenit (weiterhin als Selenit bezeichnet) inkubiert.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Komplettmedien für die Zellkultur

Bestandteil	HT29/Caco2	HCT116
DMEM high glucose	500 mL	500 mL
FCS	50 mL	50 mL
100 U/mL Penicilin, 100 µg/mL Streptomycin (Pen Strep)	5 mL	-
Pen Strep, GlutaMAX™ -I (2 mM)	-	10 mL
Nicht-essenzielle Aminosäuren	5,5 mL	-

Abgesehen von der Zellernte wurden alle Arbeiten an den Zelllinien unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Etwa alle 3-4 Tage, jeweils vor Erreichen der Konfluenz, wurden die Zellen bis maximal Passage 30 umgesetzt. Dazu wurden sie mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS; engl.: *phosphate-buffered saline*) gewaschen und 2-5 min mit einer Lösung, bestehend aus Trypsin und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), im Brutschrank inkubiert, um die Zellen voneinander und vom Boden der Kulturflasche zu lösen. Nach Abstoppen dieser Reaktion durch Gabe von serumhaltigem Medium wurde die Zellsuspension für 5 min bei 250 g zentrifugiert. Danach wurden 20 µL des mit Medium resuspendierten Pellets mit 20 µL Trypanblaulösung gemischt. Da nur tote Zellen den Farbstoff aufnehmen, dienten die mittels Neubauer-Zählkammer gezählten vitalen Zellen zur Berechnung der zur Aussaat notwendigen Zellzahlen. Bei Erreichen der maximalen Passagezahl wurden frische Zellen kurz im Wasserbad angetaut, in vorgewärmtem Medium aufgenommen, zentrifugiert (5 min, 250 g) und in frischem Kulturmedium resuspendiert. Vor der ersten Verwendung in Experimenten wurden diese Zellen anschließend mindestens zwei Mal passagiert.

2.4.1 Herstellung von shRNA-vermittelten Knockdowns

Um die Funktion von GPX1, GPX2 und SELENOH zu untersuchen, wurde die Expression dieser Gene jeweils mittels RNA-Interferenz posttranskriptionell herunterreguliert. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode wurden die Zellen mit dem psiRNA-h7SKneo-Vektor transfiziert, welches eine spezifische shRNA enthielt. Nach stabiler Aufnahme des Plasmids in das Genom einiger Zellen wurden diese Klone anschließend mithilfe der ebenfalls im Plasmid enthaltenen Antibiotikaresistenz selektiert. Erfolgreich transfizierte Zellen exprimierten folgend shRNA, die als Hairpin-Duplex vorliegt und von einer dsRNA-spezifischen Endonuklease (Dicer) zu einer siRNA geschnitten wird. Die siRNA wird nach Einbau in den RNA-induced silencing complex (RISC) linearisiert und bindet als Einzelstrang komplementär einen Bereich auf der stillzulegenden Ziel-mRNA. Diese mRNA kann folglich nicht mehr in ein Protein translatiert werden, da es zum Abbau des instabilen Gebildes aus siRNA und mRNA kommt. Eine Übersicht der verwendeten shRNA-Sequenzen ist in Tabelle 6 zu finden.

Als Kontrolle diente ein Zellklon mit dem Plasmid psiRNA-h7SKnScr, dessen exprimierte shRNA an keine spezifische mRNA bindet (scramble/SCR). Dieser Klon sowie die beiden GPX2-KD Klone lagen der Arbeitsgruppe bereits zu Beginn dieser Arbeit vor.

Tabelle 6: Sequenzen der verwendeten shRNA-Konstrukte

GPX1 shRNA-Konstrukt (GPX1-KD)	fwd	5'-ACCTCGGTACTACTTATCGAGAATGTT CAAGAGACATTCTCGATAAGTAGTACCTT-3'
	rev	5'-CAAAAAGGTACTACTTATCGAGAATGTCT CTTGAACATTCTCGATAAGTAGTACCG-3'
GPX2 shRNA-Konstrukt 1 (GPX2-KD1)	fwd	5'-ACCTCGATCCTGAACAGTCTCAAGTATCA AGAGTACTTGAGACTGTTCAAGGATCTT-3'
	rev	5'-CAAAAAGATCCTGAACAGTCTCAAGTAC TCTTGATACTTGAGACTGTTCAAGGATCG-3'
GPX2 shRNA-Konstrukt 2 (GPX2-KD2)	fwd	5'-ACCTCGCTCAACACACAGATCTCCTATC AAGAGTAGGAGATCTGTGTGTTGAGCTT-3'
	rev	5'-CAAAAAGCTCAACACACAGATCTCCTACTCTT GATAGGAGATCTGTGTGTTGAGCG-3'
SELENOH shRNA-Konstrukt 1 (SELENOH-KD1)	fwd	5'-ACCTCGGTGGAAGAGTTGAAGAAGTACCT CAAGAGGGTACTTCTTCAACTCTTCCACCTT-3'
	rev	5'-CAAAAAGGTGGAAGAGTTGAAGAAGTACC CTCTTGAGGTACTTCTTCAACTCTTCCACCG-3'
SELENOH shRNA-Konstrukt 2 (SELENOH-KD2)	fwd	5'-ACCTCAACCCTCTAGTAAGGCATTGTAATC AAGAGTTACAATGCCTTACTAGAGGGTTTT-3'
	rev	5'-CAAAAAACCCTCTAGTAAGGCATTGTAAC TCTTGATTACAATGCCTTACTAGAGGGTTG-3'

2.4.2 Herstellung von Klonen mit überexprimierter oder inaktiver GPX2

Die Rolle der GPX2 bei Stimulation mit verschiedenen Hydroperoxiden sollte anhand der Überexpression des Proteins untersucht werden. Dazu wurden HCT116-Zellklone hergestellt, die nach lentiviraler Transfektion mit dem Vektor pEYFP-C1 eine YFP-getaggte GPX2 exprimierten (YFP-GPX2). In einem weiteren Klon wurde das Sec im katalytischen Zentrum der GPX2 zum Serin mutiert. Dadurch sollte trotz GPX2-Expression keine Enzymaktivität vorhanden sein (YFP-GPX2 U40S). Als Kontrolle dienten Zellen mit YFP-Transfektion. Die verschiedenen Zellklone wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Onno Kranenburg am University Medical Center Utrecht (Niederlande) hergestellt.

2.5 Protein-Analytik

2.5.1 Herstellung von Gesamtzelllysaten mit Homogenisationspuffer

HCT116- und HT29-Zellen (5×10^5 bzw. 3×10^5 /Well) wurden, wenn nicht anders vermerkt, für drei Tage mit 50 nM Selenit in 6-Well-Platten ausgesät. Die Zellernte erfolgte nach der jeweils in den Abbildungen angegebenen Stimulationsdauer. Dabei wurden die Zellen zwei Mal mit je 2 mL PBS gewaschen und dann zwei Mal mit 5 mL PBS in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Das Pellet wurde nach der Zentrifugation (5 min, 4 °C, 250 g) in 80-150 µL Homogenisationspuffer aufgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zum Aufschluss der Zellen erfolgten zehn Stöße auf Eis bei 70 % Energie mit einem Ultraschallstab (UP50H, Hielscher Ultrasonics, Teltow, Deutschland). Der Überstand wurde nach erneuter Zentrifugation (15 min, 4 °C, 21.000 g) in ein leeres Reaktionsgefäß überführt und einer Proteinbestimmung unterzogen (siehe 2.5.3). Caco2-Zellen (3×10^5 /Well) wurden in 6-well-Platten ausgesät und nach drei (Tag 0), sieben (Tag 7) oder 14 Tagen (Tag 14) nach Erreichen der Konfluenz geerntet. Sofern nicht anders angegeben, wurden jeweils in den letzten 72 h vor der Ernte 50 nM Selenit supplementiert. Ein Mediumwechsel fand etwa alle drei Tage statt. Zur Ernte wurden die Zellen zwei Mal mit je 2 mL PBS gewaschen und anschließend mit 500 µL Trypsin-EDTA-Lösung 2-5 min lang im Brutschrank inkubiert. Die Zugabe von 4 mL Komplettmedium stoppte die Ablösung der Zellen. Es folgte eine Zentrifugation (5 min, 250 g), das Waschen mit 5 mL PBS sowie ein erneuter Zentrifugationsschritt. Zum Zellpellet wurden 1 mL PBS gegeben und je nach Pelletgröße wurden 75-300 µL der Suspension für die mRNA-Isolation in RNase-freie Reaktionsgefäße abgenommen. Der Lysatrest wurde anschließend zentrifugiert (5 min, 4 °C, 250 g) und in 80-150 µL Homogenisationspuffer aufgenommen. Wie auch bei den HCT116- und HT29-Zellen beschrieben kam es dann zur Ultraschallbehandlung sowie Zentrifugation des Zelllysats mit anschließender Proteinbestimmung.

2.5.2 Herstellung von Gesamtzelllysaten mit RIPA-Puffer

Für Versuche ohne Aktivitätsmessungen wuchsen 5×10^5 HT29-Zellen/Well drei Tage lang mit 50 nM Selenit in 6-well-Platten. Die Zellernte erfolgte am Ende der in der jeweiligen Abbildung beschriebenen Stimulation. Hierzu wurden die Zellen zwei Mal mit je 2 mL PBS gewaschen und nach Zugabe von 150 µL RIPA-Puffer 5 min auf Eis bei 500 rpm geschwenkt (Schüttler WT 12, Biometra, Göttingen, Deutschland). Das Zelllysate wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 15 min bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Proteinbestimmung für Western Blot Analysen eingesetzt.

2.5.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteingehalte erfolgte nach der Methode von Bradford [172]. Hierbei reagiert das Farbreagenz Coomassie Brilliant Blue G-250 unter Verschiebung des Extinktionsmaximums von 465 nm nach 595 nm mit basischen Aminosäuren. Die Extinktion ist direkt proportional zur Proteinkonzentration und kann mithilfe eines Eichstandards photometrisch quantifiziert werden. Für die Messung wurden 10 µL der verdünnten Probenlysate in Triplikaten mit 200 µL Bradford-Farbreagenz (1:5 verdünnt mit destilliertem Wasser) in einer 96-Well-Platte gemischt, kurz geschüttelt und 15 min lang inkubiert. Die mitgeführte Standardreihe aus bovinem Serumalbumin (BSA) umfasste einen Bereich von 0,025–0,3 mg/mL Protein. Gemessen und ausgewertet wurde die Extinktion bei 630 nm im Synergy 2-Plattenphotometer mit Gene 5-Software (BioTek, Winooski, USA)

2.5.4 SDS-Page und Western Blot

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) diente zur Auftrennung von Proteingemischen anhand ihres Molekulargewichts. Dazu wurden Proben definierter Proteinkonzentration mit reduzierendem Laemmli-Puffer versetzt und 7 min lang bei 95 °C im Thermomixer comfort 5355 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) denaturiert. Die Auftragung erfolgte in die Taschen von SDS-Polyacrylamid-Gelen (Tab. 7) in einer Minigelapparatur (Biometra, Göttingen, Deutschland). Zur Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine wurde eine in einfachem Laemmlipuffer verdünnte Leiter (PageRuler Plus Prestained Protein) mitgeführt. Die Probenauftrennung fand anschließend bei 15-25 mA pro Gel und maximaler Spannung in Elektrophoresepuffer statt. Das Sammelgel diente zur Konzentrierung der Proben und das Trenngel zur Trennung der einzelnen Proteine.

Tabelle 7: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel beim Western Blot

Komponenten	Trenngel		Sammelgel
	12,5 %	15 %	5 %
Doppelt destilliertes Wasser	2,45 mL	2,07 mL	3,06 mL
40 % Acrylamid-Bisacrylamid 29:1 (Rotiphorese® Gel 40)	1,88 mL	2,25 mL	638 µL
1,5 M TRIS-HCl pH 8,8	1,5 mL	1,5 mL	-
0,5 M TRIS-HCl pH 6,8	-	-	1,25 mL
10 % SDS	60 µL	60 µL	50 µL
10 % APS	60 µL	60 µL	50 µL
10 % TEMED	60 µL	60 µL	50 µL

Nach Ende der Elektrophorese folgte die Übertragung der aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham Protran Optitran, GE Healthcare, Little Chalfont, GB) mittels *semi-dry*-Verfahren.

Das hierzu aus Filterpapieren (GB005 Blotting Paper, GE Healthcare, Little Chalfont, GB), Nitrozellulosemembran und SDS-Polyacrylamidgel gebaute Sandwich wurde in Blotpuffer getränkt und in der Blotkammer (Hoefer, Holliston, USA) mit maximaler Spannung und $1,2 \text{ mA/cm}^2$ Membran für 2 h bei 4°C geblottet. Anschließend wurde die proteinbeladene Nitrozellulosemembran in TBST + 5 % Magermilchpulver 1 h lang inkubiert, um potenzielle unspezifische AK-Bindestellen für zu blockieren. Es folgten mehrere Waschschrte mit TBST und die Inkubation der Membran mit dem jeweiligen Primär-AK (Tab. 8) über Nacht bei 4°C . Das SDS-Polyacrylamidgel wurde mit Coomassie-Brillantblau-Lösung angefärbt und danach eine Nacht lang in einer Entfärbe- und Fixierlösung inkubiert. Dies ermöglichte den Scan des Gels (GS-800™ Calibrated Densitometer, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) und dessen Auswertung als Normalisierungsreferenz mithilfe der Quantity One® Software V4.6.9 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Die mit Primär-AK inkubierte Nitrozellulosemembran wurde am folgenden Tag erneut mehrmals mit TBST gewaschen und dann 1 h mit einem in TBST verdünnten Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundär-AK (für Phospho-AK: Ziege-anti-Kaninchen, Cell Signaling, #7074, 1:2000 / für YFP und IκB: Pferd-anti-Maus, Cell Signaling #7076, 1:2000 / für alle weiteren Primär-AK: Ziege-anti-Kaninchen, Rockland 605-4302, 1:50000) inkubiert. Nach dem Abwaschen überschüssiger AK-Lösung mit TBST folgte die Visualisierung der Immunreaktion mithilfe eines Luminol-haltigen Detektionsreagenz (SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate) am Luminescent Image Analyzer LAS-3000 (Fujifilm, Tokyo, Japan).

Tabelle 8: Im Western Blot verwendete Primärantikörper

Name	Molekülmasse	Spezies	Hersteller	Verdünnung
β-Aktin	42 kDa	Kaninchen	Abcam (ab8227)	1:10000 in TBST
COX2	74 kDa	Kaninchen	Cell Signaling (#12282)	1:1000 in TBST
YFP (GFP)	27 kDa	Maus	Roche (11814460001)	1:1000 in TBST
GPX1	22 kDa	Kaninchen	Epitomics (3120-1)	1:5000 in TBST
GPX2	22 kDa	Kaninchen	GBF, Braunschweig [173]	1:5000 in TBST
GPX4	17 kDa	Kaninchen	Abcam (ab125066)	1:5000 in TBST
IκBα	39 kDa	Maus	Cell Signaling (#4814)	1:5000 in TBST + 5 % BSA
P21	21 kDa	Kaninchen	Cell Signaling (#2947)	1:1000 in TBST + 5 % BSA
Phospho- IKKα/IKKβ	85/87 kDa	Kaninchen	Cell Signaling (#2078)	1:1000 in TBST + 5 % BSA
Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2)	44/42 kDa	Kaninchen	Cell Signaling (#9102)	1:2000 in TBST + 5 % BSA
SELENOH	14 kDa	Kaninchen	Abcam (ab151023)	1:500 in TBST

Die densitometrische Auswertung der Banden wurde mittels Aida Image Analyser-Software V4.0.4 (Raytest, Straubenhardt, Deutschland) vorgenommen. Eine Normalisierung der Proteinexpression fand auf das Referenzprotein β -Aktin oder auf die Coomassie-Brillantblau-Gelfärbung statt.

2.5.5 ALP-Aktivität

Der Differenzierungsgrad der Zellen wurde mithilfe der Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) erfasst. Hierbei setzt das Enzym das farblose p-Nitrophenyl-Phosphat (NPP) und Wasser zu p-Nitrophenol (NP) und Phosphat um.



Abbildung 3: Schematische Darstellung der ALP-Reaktion.

Zur Messung der ALP-Aktivität wurden maximal 10 μL Probe bzw. Homogenisationspuffer als Leerwert in Triplikaten mit ALP-Lysepuffer auf 75 μL /Well in einer 96-Well-Platte aufgefüllt. Es folgten 5 min Inkubation bei 37 °C im Plattenreader und die automatische Zugabe von 25 μL NPP (10,64 mM, gelöst in ALP-Lysepuffer) zu jeder Probe. Die Extinktion des entstehenden NPs wurde 60 min lang bei 405 nm erfasst. Der zur Berechnung der Enzymaktivität nötige molare Extinktionskoeffizient von NP beträgt bei dieser Wellenlänge $18,45 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Die ermittelten Enzymaktivitäten wurden auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe bezogen.

2.5.6 Gesamt-GPX-Aktivität

Die Gesamt-GPX-Aktivität wurde indirekt photometrisch in 96-Well Mikrotiterplatten gemessen (modifiziert nach [174]). Hierbei wird ausgenutzt, dass das bei der GPX-katalysierten Reduktion von H_2O_2 entstehende Glutathiondisulfid (GSSG) wiederum von der Glutathionreduktase (GR) reduziert wird. Da diese Reaktion NADPH-abhängig ist, kann dessen Extinktionsabnahme erfasst werden.

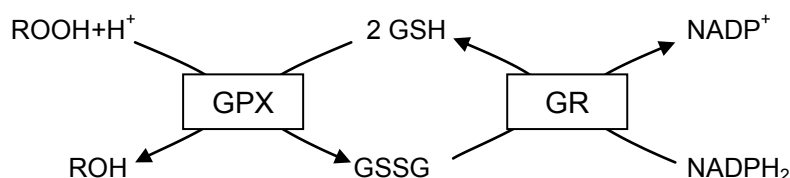


Abbildung 4: Reaktionsschema bei Messung der GPX-Aktivität.

Jeder Messansatz setzte sich aus 17,5 μL Probe (ggf. verdünnt in Homogenisationspuffer) und 222,5 μL Reaktionsmix (100 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1 mM Natriumazid, 0,2 mM NADPH in 0,001 % NaHCO_3 , 3,4 mM GSH in 1 μM HCl, 674 mU/mL GR, 0,1 % Triton X-100) zusammen. Als Leerwert diente Homogenisationspuffer und als Positivkontrolle eine 1:20 verdünnte, laboreigene Testisprobe aus der Maus.

Gemessen wurden von jeder Probe drei Replikate. Nach 10 min Inkubation im Plattenphotometer bei 37 °C wurden automatisch 10 µL des jeweiligen Substrats zu den Proben gespritzt. Die Endkonzentration betrug dabei für H₂O₂, TBHP und Hydroperoxyoctadecadiensäure (HPODE) je 50 µM und für Hydroperoxyeicosatetraensäure (HPETE) 12,5 µM. Die Erfassung der Reaktion erfolgte 2 min lang photometrisch bei 340 nm. Der Extinktionskoeffizient von NADPH bei dieser Wellenlänge ist 6,22 mM⁻¹ x cm⁻¹. Die Enzymaktivität wurde nach Normalisierung auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe in mU/mg Protein berechnet.

2.6 RNA-Analytik

2.6.1 RNA-Isolation

Die mRNA der Zellkulturproben wurde mit dem Dynabeads[®] mRNA DIRECT™ Kit isoliert. Hierbei kommt es zu einer spezifischen Basenpaarung des Poly(A)-Schwanzes der mRNA mit den kovalent an die magnetischen Dynabeads[®] gebundenen Oligo-(dT)25-Resten. Zunächst wuchsen 1,5x10⁵ HT29-Zellen pro Well für drei Tage in 12-Well-Platten und wurden dann mit den Testsubstanzen in serumfreiem Medium stimuliert. Als einzige Ausnahme wurde für die Versuche mit Natriumbutyrat (weiterhin als Butyrat bezeichnet) FCS-haltiges Serum genutzt.

Für die Caco2-Zellen erfolgte die Ernte der Protein- und RNA-Proben simultan (siehe 2.5.1). Für die Ernte von HT29-Spheroïden wuchsen pro Klon 2x10⁵ Zellen sieben Tage lang in je vier Wells einer NUNC[®] low cell binding 96-Well-Platte (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in Krebsstammzellmedium [175]. Die Spheroïde wurden anschließend für 5 min bei 250 g zentrifugiert, vom überstehenden Medium befreit und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zur mRNA-Isolation wurden die Proben nach zwei PBS-Waschschrïtten mit 250 µL Lysepuffer des Kits versetzt. Die DNA des Lysats wurde dann durch mehrmaliges Aufziehen und Auswerfen in einer Sterican[®]-Kanüle (Gr. 1, G 20 x 1 ½", B.Braun, Melsungen, Deutschland) zerkleinert. Nach 2 min in der Zentrifuge bei 21.000 g wurde der Überstand in ein Reaktionsgefäß mit den bereits laut Anleitung vorbereiteten Dynabeads[®] überführt. Es folgten 10 min Schütteln im Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und mehrere Waschschrïtte mit verschiedenen Puffern des Kits nach Anleitung, bevor die mRNA mit 15 µL Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5) eluiert wurde. Die Bestimmung der mRNA-Konzentration erfolgte am NanoDrop 2000 (V1.5, Peqlab, Erlangen, Deutschland) mit anschließender Lagerung der Proben bei -80 °C.

2.6.2 Reverse Transkription

Zur Analyse der Genexpression mittels qPCR musste die isolierte mRNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Hierzu wurden 150 ng mRNA mit 0,15 pmol Oligo(dT)15-Primer in einem 21 µL Ansatz für 4 min bei 72 °C im T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) erhitzt, um Sekundärstrukturen aufzuschmelzen. Anschließend wurden 25 µL des Reaktionsmixes (1x Moloney-Maus-Leukämie-Virus (M-MLV) Reverse Transkriptase (RT) Puffer; 0,7 mM dNTP; 0,1 mg/mL BSA; 30 U *RNAsin*[®] Ribonuclease Inhibitor; 180 U RT des M-MLV) zum Ansatz gegeben und für 2 h bei 37 °C inkubiert, um die Synthese der cDNA zu ermöglichen. Nach anschließender 10-minütiger Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 94 °C wurde der 45 µL fassende Ansatz 1:2 bis 1:4 mit qPCR-Wasser verdünnt. Die mRNA der HT29-Spheroide wurde aufgrund geringer Ausbeute ohne vorherige Konzentrationsbestimmung direkt mit dem SensiFAST cDNA Synthesis Kit umgeschrieben. Dazu wurde der entsprechende Reaktionsmix (7,5 µL mRNA, 2 µL 5x TransAmp Puffer und 0,5 µL RT) für 10 min bei 25 °C, 15 min bei 42 °C, 15 min bei 48 °C und 5 min bei 85 °C im Thermocycler inkubiert. Die finale Verdünnung des Ansatzes mit qPCR-Wasser betrug 1:10.

2.6.3 Primerdesign, Herstellung von PCR-Produkten und Standardgeraden

Neue Primer wurden, sofern nicht in der Abteilung vorliegend, mit der Software PerlPrimer V1.1.2.1 [176] entworfen. Die Sequenzen hatten dabei einen GC-Gehalt von 40-60 %, eine Schmelztemperatur von 65-68 °C sowie eine Länge von 20-24 bp. Weiterhin banden sie, falls möglich, in zwei verschiedenen Exons, um die Amplifikation genomischer DNA zu vermeiden. Die lyophilisierten Primer (Sigma-Aldrich) wurden anschließend mit qPCR-Wasser auf 100 µM resuspendiert und einem PCR-Lauf unterzogen (Tab. 9).

Tabelle 9: Temperatur- und Zeitangaben zum (q)PCR-Programm

1. Initiale Denaturierung und Aktivierung der Polymerase	95 °C	5 min	
2. Denaturierung	95 °C	30 sec	} 35-40x
Annealing der Primer	60 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	30 sec	
3a. Finale Elongation (PCR)	72 °C	10 min	
3b. Schmelzkurvenanalyse (qPCR)	95 °C	30 sec	
	62 °C	30 sec	
	95 °C	30 sec	

Ein 25 µL PCR-Ansatz setzte sich aus 18,875 µL qPCR-Wasser, 1 µL cDNA, 1x Taq-Puffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, je 0,25 µM Primer und 625 mU Taq-Polymerase zusammen. Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurde 1,5 % Agarose in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) aufgekocht und nach kurzem Abkühlen in eine Gelkammer gegossen. Die PCR-Ansätze

wurden nach Zusatz von 6x Ladepuffer zusammen mit 5 µL einer PegGold DNA Leiter auf das Gel aufgetragen und bei 90 V und maximaler Stromstärke in TAE-Puffer laufen gelassen. Die mit Ethidiumbromidlösung (5 µg/mL) angefärbte DNA wurde dann im GelDoc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) unter UV-Licht überprüft. Der restliche PCR-Ansatz wurde mit dem innuPrep DOUBLEpure Kit nach Herstellerangaben extrahiert und nach 10 min Schütteln bei 37 °C in 20 µL Elutionspuffer eluiert. Das gewonnene PCR-Produkt diente nach der Messung der DNA-Konzentration am NanoDrop zur Herstellung von qPCR-Standards in einem Konzentrationsbereich von 1×10^2 – 1×10^9 DNA-Molekülen/µL.

2.6.4 Real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Mit dieser Methode ist es möglich, mRNA-Transkripte während ihrer Amplifikation zu quantifizieren. Dabei wird ausgenutzt, dass der eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green I in Echtzeit (engl.: *real-time*) mit doppelsträngiger DNA interkaliert. Um sicher zu gehen, dass nur ein spezifisches Amplifikat entsteht, wurde im Anschluss an den qPCR-Lauf eine Schmelzkurve durch schrittweises Erhöhen der Temperatur erstellt. Bei Erreichen der Schmelztemperatur des Amplifikats wird der Farbstoff wieder frei gegeben und das Fluoreszenzsignal abgeschwächt. Dieser Vorgang ist in der Auswertung als Peak sichtbar und kann somit die Abwesenheit unspezifischer PCR-Produkte und Primerdimere bestätigen. Für die qPCR wurden 11 µL qPCR-Wasser und 1 µL cDNA in jedes Well einer 96-Well-Platte vorgelegt und mit 13 µL Reaktionsmix (1x Taq-Puffer; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP; 0,1x SYBR Green; je 0,25 µM Primer; 625 mU Taq DNA Polymerase) vermischt. Zusätzlich zu den Proben wurde eine Standardreihe mitgeführt (siehe 2.6.3). Die Standards dienten unter Nutzung der MxPro Software Mx3005P V4.10 (Stratagene, Santa Clara, CA, USA) zur Quantifizierung der Konzentration der Probentranskripte nach dem qPCR-Lauf (Tab. 9) im Mx3005P qPCR System (Agilent, Santa Clara, USA). Die Ergebnisse wurden auf einen aus drei Referenzgenen bestehenden Faktor normalisiert. Bei diesen handelte es sich um die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), die Ornithin-Decarboxylase-Antizym 1 (OAZ1) und das RPL13A.

2.6.5 PCR-Array

Der Human Signal Transduction Pathway Finder-RT² Profiler PCR Array (Qiagen, Venlo, Niederlande) ermöglichte die parallele Analyse von 84 Genen verschiedener Signalwege in einer Probe. Hierzu wurde cDNA mit dem RT² First Strand Kit nach Herstellerangaben in drei parallelen Ansätzen aus zuvor isolierter mRNA synthetisiert (siehe 2.6.1). Diese cDNA wurde dann für den PCR-Array gepoolt und in der qPCR unter Verwendung des RT² qPCR Master Mixes eingesetzt. Die Auswertung der Rohdaten wurde mithilfe des RT² Profiler[™] PCR Array Data Analysis Web Portals vorgenommen. Für die in den KD Klonen regulierten Gene wurde auf <http://www.genecards.org> im Bereich „Pathways“ geprüft, in welche Signalwege das

jeweilige Gen involviert ist. Grundlagen dieser Seite sind unter anderem PathCards (eine Datenbank humaner biologischer Signalwege), die Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes sowie Informationen von Biotechnologiefirmen (wie z. B. Cell Signaling Technology, R&D Systems, Qiagen).

Tabelle 10: In der qPCR verwendete Primersequenzen

Gen	Genbank-Nr.	Spezies	Sequenz 5' → 3'		Amplifikat
			fwd	rev	
ASCL2	NM_005170.2	human	fwd	TCTAAGGGCACAGAGAATCC	182 bp
			rev	ACTGCTCGTGTCCAGATC	
BIRC3	NM_001165.4	human	fwd	TGCTGTGATGGTGGACTCAGG	157 bp
			rev	AGCAGCTGTTCAAGTAGATGAGGG	
BMP2	NM_001200.2	human	fwd	ACACTGAGACGCTGTTCCCA	194 bp
			rev	TCGACCTTTAGGAGACCGCAG	
CA9	NM_001216.2	human	fwd	TACAGCTGAACTTCCGAGCGAC	137 bp
			rev	CTAGGATGTCACCAGCAGCCAG	
CCL5	NM_002985.2	human	fwd	CTGCTGCTTTGCCTACATTGCC	119 bp
			rev	ACTTGCGGTTCTTTCCGGGTG	
CCNE1	NM_001793.4	human	fwd	GTTTCAGGGTATCAGTGGTGC GA	194 bp
			rev	CAACATGGCTTTCTTTGCTCGGG	
CDH3	NM_001793.4	human	fwd	TGACCATGGCAACAAGAGCAG	149 bp
			rev	ACCAGCAGGAGGAACAGCAG	
COX2	NM_004878.3	human	fwd	ACGCTGCTGGTCATCAAGATG	76 bp
			rev	TGGCAAAGGCCTTCTTCCGC	
CSF1	NM_000757.5	human	fwd	TCTCTGCAGCGGCTGATTGAC	188 bp
			rev	CAGCTGCACAATGGCGATGG	
DAB2	NM_001244871.1	human	fwd	GGCAATAGCTAGCCGGTGTCTG	105 bp
			rev	CAGGCAGCAAACCTCAGTACCA	
DPP4	NM_001935.3	human	fwd	TACAAAAGTGACATGCCTCAGTT	133 bp
			rev	TGTGTAGAGTATAGAGGGGCAGA	
FABP1	NM_001443.2	human	fwd	AGTCAAGACAGTGGTTCAGTTGGA	103 bp
			rev	TGGTATTGGTGATTATGTCGCCGT	
FASR	NM_000043.4	human	fwd	GGAAGGAGTACACAGACAAAGCCC	186 bp
			rev	TCACATTTGGTGCAAGGGTCACAG	
GADD45B	NM_015675.3	human	fwd	ACATCAACATCGTGCGGGTGTGTC	122 bp
			rev	TGTGAGGGTTCGTGACCAGGAG	
GADPH	NM_001289746.1	human	fwd	ACTCATGACCACAGTCCATGCC	144 bp
			rev	GATGACCTTGCCACAGCCT	
JAG1	NM_000214.2	human	fwd	TCAGGGAGACCTTGCATCACCA	119 bp
			rev	GCCACACCAGACCTTTGAGCAG	
LFNG	NM_001040167.1	human	fwd	GAACAAGGTGCGTCCTGTCCA	164 bp
			rev	TCGCAGTTGGTCTGTGGT	
LGR5	NM_003667.2	human	fwd	ACGGCAGGATGTTGCTCAGG	167 bp
			rev	CCGCAAGACGTA ACTCTCCAG	

MMP7	NM_002423.3	human	fwd	AGCTATGCGACTCACCGTGCT	115 bp
			rev	AGTCCTGAGCCTGTTCCCACTG	
OAZ1	NM_004152.2	human	fwd	GCAGCGGATCCTCAATAGCCA	139 bp
			rev	AGACCCTGGAACCTCTCACTGCT	
P21	NM_078467.1	human	fwd	CTGTCTTGTACCCTTGTGCCTC	115 bp
			rev	GAGTGGTAGAAATCTGTTCATGCTGG	
PCNA	NM_002592.2	human	fwd	AGAAGGTGTTGGAGGCACTCAAGG	188 bp
			rev	ACATACTGGTGAGGTTACGCCC	
RPL13A	NM_012423.2	human	fwd	AGCCTACAAGAAAGTTTGCCTATCTG	115 bp
			rev	TAGTGGATCTTGGCTTTCTCTTTCT	
SELENOH	NM_170746.2	human	fwd	GCTTCCAGTAAAGGTGAACCCGA	134 bp
			rev	TCAGGGAATTTGAGTTTGCCTGG	
SERPINE1	NM_000602.4	human	fwd	CTGGTTCTGCCCAAGTTCTCCC	160 bp
			rev	ATCTTCACTTTCTGCAGCGCCT	
SOCS3	NM_003955.4	human	fwd	GCACAAGCACAAGAAGCCAACC	126 bp
			rev	TTCCCTCCAACACATTCCAGGTC	
SORBS1	NM_001034954.1	human	fwd	CGCACCTACATCGAGCTTCTTCC	166 bp
			rev	TGCCGGAGCAGTGTGATCCT	
TNFA	NM_000594.2	human	fwd	GCCTCTTCTCCTTCTGATCGT	190 bp
			rev	TGAGGGTTTGCTACAACATGGG	
VEGFA	NM_001025366.2	human	fwd	ACCATGCCAAGTGGTCCCAG	118 bp
			rev	CAGGGTCTCGATTGGATGGCAG	
ZEB1	NM_001128128.2	human	fwd	GATGATGAATGCGAGTCAGATGC	85 bp
			rev	ACAGCAGTGTCTTGTGTTGT	

2.7 Immunhistochemische Färbung des Colon Cancer Tissue Arrays

Die SELENOH-Expression in humanen Darmtumoren wurde mithilfe des „Colon cancer tissue array, set 2“ von abcam (ab178129) untersucht. Dieser enthält von 16 Patienten je eine Probe von gesundem Kolongewebe sowie jeweils zwei dazugehörige Schnitte eines bösartigen Adenokarzinoms. Das Gewebe lag vom Hersteller in 10 % Formaldehydlösung fixiert vor und wurde vor der Verwendung 30 min lang bei 60 °C inkubiert. Die weitere Bearbeitung der Schnitte von der Entparaffinierung bis zur mikroskopischen Auswertung erfolgte wie in 2.3.2 beschrieben.

2.8 NRU-Assay

Die Proliferation und Viabilität von Zellen wurde anhand der Neutralrotaufnahme (NRU; engl.: *neutral red uptake*) bestimmt. Hierbei gelangt Neutralrot durch nicht-ionische Diffusion in die Lysosomen, in welchen der saure pH-Wert zur Protonierung des Farbstoffs führt. Das nun vorliegende Kation akkumuliert in lebenden Zellen und korreliert mengenmäßig mit der Zellzahl. Tote oder geschädigte Zellen sind dagegen nicht in der Lage, Neutralrot aufzunehmen [177]. Die Aussaat der Zellen erfolgte, sofern möglich, als Triplikate in 200 µL Kompletmedium in die inneren Kavitäten einer 96-Well-Platte.

Für die Messung des Wachstums von GPX1- und GPX2-KD wuchsen 1×10^4 HT29-Zellen für die in Abb. 7 A angegebene Anzahl an Tagen. Zur Erfassung der Zellviabilität nach Behandlung mit verschiedenen Hydroperoxiden oder KillerTRAIL wurden 4×10^4 HCT-116-Zellen/Well ausgesät und 24 h später für 60 min mit dem jeweiligem Hydroperoxid entsprechender Konzentration in RPMI-Medium (engl.: *Roswell Park Memorial Institute*) inkubiert, gefolgt von 23 h Kultur in Kompletmedium. Die Stimulationsdauer für KillerTRAIL betrug 24 h in Kompletmedium (Abb. 16 E). Einen Tag vor Gabe des Neutralrots wurde die Stammlösung (4 mg/mL in PBS) mit Kompletmedium auf 40 μ g/mL verdünnt und 24 h lang bei 37 °C inkubiert. Am Tag der Messung wurde das Neutralrotmedium 10 min bei 600 g zentrifugiert und jeweils 100 μ L des Überstandes kamen für 2 h im Brutschrank auf die Zellen. Nach der Inkubation folgte ein einmaliges Waschen mit 150 μ L PBS/Well, um den nicht aufgenommenen Farbstoff zu entfernen. Das in den Zellen verbliebene Neutralrot wurde dann mit je 150 μ L Entfärbelösung 10 min lang im Schüttler extrahiert. Gemessen wurde die Intensität des Farbstoffs anschließend bei 540 nm im Plattenphotometer.

2.9 DHR123-Assay

In diesem Assay wurde die Oxidation des lipophilen Fluoreszenzfarbstoffs Dihydrorhodamin 123 (DHR123) zu Rhodamin 123 durch intrazelluläre Oxidantien gemessen. Dazu wurden drei Replikate von je 4×10^4 HT29-Zellen in 200 μ L Kompletmedium in die inneren Kavitäten einer 96-Well-Platte ausgesät und nach drei Tagen mit HBSS gewaschen. Es folgten eine Inkubation mit 20 μ M DHR für 45 min bei 37 °C im Brutschrank und ein erneuter Waschschrift mit HBSS. Die anschließende Stimulation mit 1 mM H_2O_2 , 50 μ M *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP), 50 μ M HPODE oder 50 μ M HPETE in farblosem RPMI-Medium bei 37 °C im Brutschrank dauerte 60 min. Nach wiederholtem Waschen mit HBSS kam es zur Messung der Rhodaminfluoreszenz im Plattenphotometer ($\lambda_{\text{Exzitation}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission}} = 530 \text{ nm}$). Im Anschluss wurde ein NRU-Assay durchgeführt und auf dessen Ergebnisse normalisiert.

2.10 DNA-Laddering

Die Fragmentierung der DNA ist ein charakteristisches Merkmal für die zelluläre Apoptose und kann im Agarosegel sichtbar gemacht werden. Für die Versuche wuchsen je 1×10^6 HCT116-Zellen drei Tage lang in 10 cm Schalen mit Kompletmedium und 50 nM Selenit. Die Zellen wurden dann für 90 min mit 1 mM H_2O_2 , 1 mM TBHP, 300 μ M HPODE oder 100 μ M HPETE in RPMI-Medium inkubiert, gefolgt von 23 h Kultur in Kompletmedium. Die Stimulation mit 60 ng/mL KillerTRAIL in Kompletmedium dauerte 24 h. Am nächsten Tag wurde der gesamte Inhalt der Zellkulturschale in Falconröhrchen überführt und 5 min bei 250 g zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschriffe des Zellpellets mit zwischenzeitlicher Zentrifugation und die Aufnahme in 300 μ L TE-Puffer+Triton X-100. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde erneut zentrifugiert (15 min bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit) und

250 μL des Überstands wurden bis zur Durchführung des DNA-Laddering bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Dieser Überstand wurde wiederum mit 1,8 μL RNase A-Lösung (10 mg/ml) versetzt und für 60 min im Thermomixer 5436 bei $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 750 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Proben mit 12,5 μL 10%igem SDS und 2 μL Proteinase K vermischt und erneut inkubiert (60 min, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 750 rpm). Danach wurden 26,5 μL 5 M NaCl und 256 μL eiskaltes Isopropanol zu jeder Probe pipettiert und für mindestens 10 min auf Eis gelagert. Nach einer erneuten Zentrifugation für 15 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und maximaler Geschwindigkeit wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet getrocknet, in 15-50 μL TE-Puffer gelöst und 20 min lang bei $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 750 rpm geschüttelt. Die Konzentration der isolierten DNA wurde im NanoDrop überprüft. Für die elektrophoretische Auftrennung wurden 10 μg der isolierten DNA mit 6x Ladepuffer und destilliertem Wasser zu einem 9 μL Ansatz gemischt und mit einer DNA-Leiter in einem 1,5%igen Agarosegel laufen gelassen (siehe 2.6.3). Die Banden wurden densitometrisch mit der Aida Software ausgewertet.

2.11 Zellzyklusanalyse

Im Zuge der Zellzyklusanalyse wuchsen HT29-Zellen (SCR2: 2×10^5 Zellen/Well; SELENOH-KD: je Klon $1,5 \times 10^5$ Zellen/Well) für drei Tage in 6-Well-Platten mit Komplettmedium und 50 nM Selenit. Nach zwei Mal Waschen mit PBS folgte eine Inkubation für 48 h in Hungermedium, um eine Synchronisation in der G_0/G_1 Phase zu induzieren. Im Anschluss daran wurden die Zellen entweder direkt geerntet (Zeitpunkt 0 h) oder für weitere 6, 24 bzw. 48 h mit Komplettmedium inkubiert. Zur Ernte wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung behandelt (siehe 2.4). Im Anschluss wurden 1×10^6 Zellen zwei Mal mit $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem Probenpuffer gewaschen und nach tröpfchenweiser Zugabe von je 1 mL eiskaltem 70%igem Ethanol für mindestens 18 h bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert. Es folgte eine Zentrifugation (10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 500 g) und die Aufnahme des Zellpellets in frisch-hergestellte Färbelösung. Dieser Ansatz wurde für 45 min bei Raumtemperatur geschüttelt (Orbital Shaker, Neolab, Heidelberg, Deutschland) und gefiltert (Falcon[®] 70 μm Cell Strainer, Corning, Corning, USA). In einem MACSQuant[®] Analyzer (Miltenyi Biotec, Teterow, Deutschland) wurden dann 10^5 Ereignisse pro Klon und Versuch analysiert. Die gewonnenen Daten wurden anschließend mithilfe der FlowJo Software (Version 10, FlowJo LLC, Ashland, USA) ausgewertet.

2.12 Soft Agar-Assay

Mit diesem Assay lässt sich das verankerungsunabhängige Wachstum von Zellen, also ohne die Anheftung an eine Zellkulturschale, testen. Dafür wurde zunächst ein Bodenagar aus 2 % Agar und Wasser hergestellt und auf $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Nach Abkühlung auf $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde der Bodenagar zu gleichen Teilen mit $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmem Prämix vermischt und je 2 mL dieser Mischung wurden luftblasenfrei in eine 6-Well-Platte pipettiert. Im Prämix enthalten war konditioniertes Medium, welches zuvor bis zu einen Tag lang zur Kultivierung der jeweiligen

Zelllinie genutzt wurde. Hierbei kommt es zur Sezernierung von Wachstumsfaktoren, welche zusammen mit dem Medium durch Abzentrifugation enthaltener Zellen gewonnen wurden. Der Top-Agar, bestehend aus 0,7 % Agar und Wasser, wurde ebenfalls auf 90 °C erwärmt und auf 45 °C abgekühlt. Dieser wurde zu gleichen Teilen mit den zuvor im Prämix aufgenommenen Zellen vermischt und je 2 mL/Well wurden auf den inzwischen festen Boden-Agar gegeben. Die Zellzahlen waren dabei so gewählt, dass jedes Well letztlich 5×10^3 HT29- oder 5×10^4 Caco2-Zellen enthielt. Während der 14 Tage dauernden Kultivierungszeit wurden die Zellen mit 50 nM Selenit supplementiert und nach sieben Tagen einmalig mit 400 µL frischem Kulturmedium/Well versorgt. Die gebildeten Kolonien wurden anschließend durch Zugabe von 500 µL 0,01 %iger Kristallviolettlösung pro Well für 1 h bei 37 °C angefärbt. Die automatische Zählung der Kolonien erfolgte nach dem Einscannen der Platten am GS-800™ Densitometer mittels Quantity One® Software. Zur Erfassung der durchschnittlichen Koloniegröße wurden von jedem Zellklon 100 Kolonien im Axio Observer D1-Mikroskop fotografiert und mit der Software Zen AxioVision V4.8.2 (Carl Zeiss) vermessen.

2.13 Scratch-Assay

Im Scratch Assay kann die Migrations- und Proliferationsfähigkeit adhärent-wachsender Zellen überprüft werden, indem man das Schließen einer Wunde im Zellrasen zeitlich verfolgt. Dazu wuchsen von den entsprechenden HT29-Klonen jeweils 6×10^5 Zellen/Well in einer 12-Well-Platte drei Tage lang mit 50 nM Selenit bis zum Erreichen der Zellkonfluenz. Ein zu Beginn des Versuchs mittig in jedes Well platziertes 2 cm langes, steriles Metallstäbchen (1 mm Durchmesser) wurde anschließend entfernt und sorgte nach einem Mediumwechsel für einen Spalt im Zellrasen. Dieser Spalt wurde direkt nach dem Zufügen (Zeitpunkt 0 h) und nachfolgend alle 24 h für insgesamt drei Tage mit dem Axio Observer D1-Mikroskop fotografiert und an je 10 verschiedenen Stellen im Duplikat bei drei voneinander unabhängigen Experimenten mit der Software Zen AxioVision vermessen.

2.14 Statistische Auswertung

Die in dieser Arbeit gezeigten Zellkulturexperimente wurden mindestens drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt. Alle in den Abbildungen gezeigten Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Für die statistische Auswertung der Versuche wurde Prism V5.1 (GraphPad Software, San Diego, USA) genutzt. Beim Vergleich von zwei Behandlungsgruppen kam der zweiseitige Studentische t-Test zum Einsatz. Mehr als zwei in Zusammenhang stehende Gruppen wurden abhängig von der Anzahl zu berücksichtigender Parameter, wenn nicht anders angegeben, mittels ein- bzw. zweifaktorieller Varianzanalyse (One- oder Two-Way ANOVA; engl.: *analysis of variance*) und Bonferroni's Posttest ausgewertet. Ein p-Wert < 0,05 galt dabei generell als statistisch signifikant.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der GPX2 in der kolorektalen Karzinogenese

Die Rolle der GPX2 in der kolorektalen Karzinogenese ist bisher nicht eindeutig geklärt. Ihr werden, abhängig vom Krebsstadium, sowohl pro- als auch antikarzinogene Funktionen zugeschrieben [178]. Um die Funktion der GPX2 in diesem Kontext genauer zu untersuchen, wurden von HT29-Zellen zwei Einzelzellklone mit shRNA-vermitteltem GPX2-KD (GPX2-KD1 und -KD2) untersucht. Weiterhin kam ein Zellklon mit einem KD der stark sequenzzhomologen GPX1 (GPX1-KD) zum Einsatz. Mit diesem konnten gezielt spezifische Funktionen dieser Isoform in den Tumorzellen untersucht werden. Als Kontrolle diente ein Kontrollklon ohne KD (SCR).

3.1.1 Effektivität des GPX1- und GPX2-KDs in Abhängigkeit vom Selenstatus

Als Erstes wurde die KD-Effizienz anhand der Proteinexpression in den einzelnen Klonen mit Blick auf mögliche Auswirkungen auf andere GPX-Isoformen untersucht. Bei suboptimaler Selenversorgung lag fast keinerlei GPX1-Expression mehr im GPX1-KD vor, was sich auch durch zusätzliche Gabe von 50 nM Selenit nicht änderte. Die GPX2-KD-Klone wiesen bei -Se eine mit dem SCR vergleichbar geringe Menge an GPX1 auf, welche durch Selensupplementation erheblich gesteigert werden konnte (Abb. 5 A). Die GPX2-Expression war lediglich in den GPX2-KDs bei -Se signifikant erniedrigt und stieg in allen Klonen jeweils nach Selengabe signifikant an (Abb. 5 B). Die Expression der GPX4 war in keinem der untersuchten Klone beeinträchtigt und zeigte sich in allen Klonen bei +Se gegenüber den suboptimal mit Selen versorgten Zellen erhöht (Abb. 5 C). Die extrazelluläre GPX3 war, wie zu erwarten, in den Zelllysaten auf Proteinebene generell nicht detektierbar (Daten nicht gezeigt).

Es konnte insgesamt eine signifikante Minderung der entsprechenden Proteinsynthese in den jeweiligen KD-Zellen nachgewiesen werden. Weiterhin war die Expression anderer untersuchter GPX-Isoformen von keinem der KDs beeinflusst.

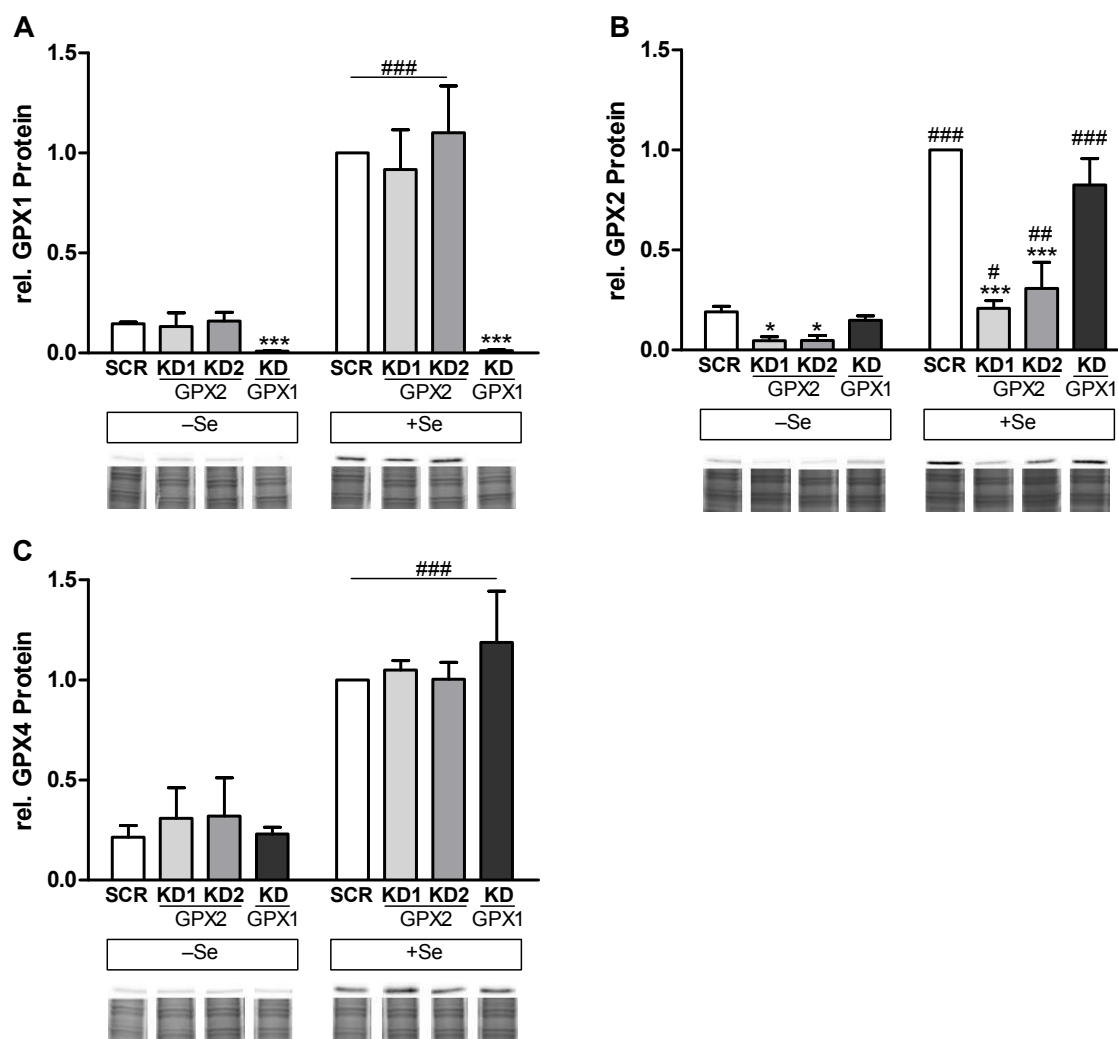


Abbildung 5: Die Expression der GPX1, GPX2 und GPX4 im GPX1- und GPX2-KD.

HT29-Kontrollklone (SCR) und Klone mit shRNA-vermitteltem GPX1- oder GPX2-KD wurden ohne (-Se) oder drei Tage mit 50 nM Selenit (+Se) inkubiert. In den Zellen wurde die Proteinexpression der (A) GPX1, (B) GPX2 und (C) GPX4 mittels Western Blot detektiert und auf die Coomassie-Färbung des jeweiligen Gels normalisiert. Mittelwerte + Standardabweichung (n = 3). *p<0,05; ***p<0,001 versus SCR; #p<0,05; ###p<0,01; ####p<0,001 versus jeweiligem Klon bei -Se mittels Two-Way ANOVA und Bonferroni's Posttest.

3.1.2 PCR-Array und durch GPX1- bzw. GPX2-KD regulierte Gene

Die Auswirkung der verminderten Expression von GPX1 bzw. GPX2 in den HT29-Zellen wurde anschließend mittels Human Signal Transduction Pathway Finder-PCR-Array untersucht. Mit diesem Array ließ sich die Expression von 84 Genen aus unterschiedlichen Signalwegen ermitteln. Die Ergebnisse ermöglichten anschließend Aussagen darüber, ob ein KD der GPX1 oder GPX2 mit Veränderungen metabolischer oder stress-aktivierter Prozesse einhergeht. Von den im PCR-Array untersuchten Genen waren nach Validierung mittels qPCR insgesamt 18 im GPX1- und/oder in den GPX2-KDs signifikant unterschiedlich zum SCR reguliert (Abb. 6 A). Sechs dieser Gene (*Baculoviral IAP repeat containing 3*, BIRC3; *CC-chemokine ligand 5*, CCL5; *Colony stimulating factor 1*, CSF1; *Growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45B*, GADD45B; *Cyclin dependent kinase inhibitor 1A*,

CDKN1A/p21; Tumornekrosefaktor alpha, TNFA) waren hierbei im GPX1-KD signifikant stärker gegenüber dem SCR und den Zellen mit GPX2-KD exprimiert. Von vier Genen (*Bone morphogenetic protein 2*, BMP2; O-fucosylpeptide 3-Beta-N-Acetylglucosaminyltransferase, LFNG; Matrix Metalloproteinase-7, MMP7; *Sorbin and SH3 domain containing 1*, SORBS1) fanden sich in den GPX2-KDs, nicht aber im GPX1-KD, erniedrigte mRNA-Gehalte. Für insgesamt acht Gene (*Carbonic anhydrase 9*, CA9; *Disabled homolog 2*, DAB2; *Fatty acid binding protein 1*, FABP1; *First apoptosis signal receptor*, FASR; *Jagged 1*, JAG1; *Serpin family E member*, SERPINE1, *Suppressor of cytokine signaling 3*, SOCS3; *Vascular endothelial growth factor A*, VEGFA) lagen sowohl im GPX1- als auch in den GPX2-KDs gleichermaßen im Vergleich zum SCR hoch- oder herunterregulierte Transkriptmengen vor. Die in den KDs differentiell exprimierten Gene wurden anschließend in die übergeordneten Signalwege eingeordnet. Jeweils acht der 18 regulierten Gene lassen sich dem *Extracellular-signal regulated kinase* (ERK)-, dem *Pigment epithelium-derived factor* (PEDF)- sowie G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR)-vermittelten Signalwegen zuordnen. Für je sieben Gene gab es Hinweise einer Beteiligung im TNF- und p21-aktivierte Kinasen (PAK)-Signalweg.

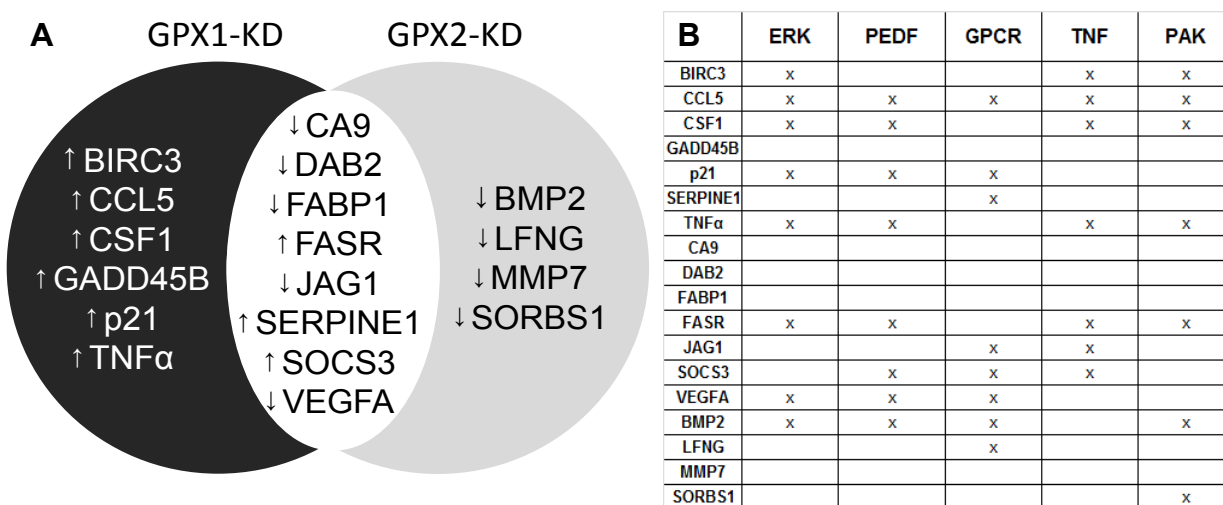


Abbildung 6: Signifikant im GPX1- oder GPX2-KD regulierte Gene und deren Einordnung in Signalwege.

Der Human Signal Transduction Pathway Finder PCR-Array wurde mit den HT29-Klonen SCR, GPX1-KD und GPX2-KD2 durchgeführt und die signifikant regulierten Gene wurden mittels qPCR im SCR, GPX1-KD und GPX2-KD1 & -KD2 validiert. **(A)** Im Venn-Diagramm dargestellt sind die Gene, welche entweder nur in einem der beiden oder gleichzeitig in beiden KDs signifikant ($p < 0,05$) gegenüber dem SCR hoch- (\uparrow) oder herunterreguliert (\downarrow) waren. **(B)** Jedes der gegenüber dem SCR signifikant regulierten Gene wurde anhand von <http://www.genecards.org> (Bereich „Pathways & Interactions“) den entsprechend beteiligten Signalwegen zugeordnet. Gezeigt sind die fünf Signalwege mit den meisten Zuordnungen.

3.1.3 Zellproliferation & Differenzierungsstatus im GPX1- und GPX2-KD

Die in Abbildung 6 B aufgeführten Signalwege haben gemein, dass sie relevant für das Wachstumsverhalten von (Tumor-)Zellen sind. Der Einfluss des KDs von GPX1 oder GPX2 auf das Wachstum von HT29-Zellen wurde daher anhand der Aufnahme des Farbstoffs Neutralrot zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zellaussaat getestet. Die Akkumulation dieses Farbstoffs in lebenden Zellen ist direkt proportional zu deren Anzahl und ermöglicht somit Aussagen über die Proliferation und Viabilität [179, 180]. Ein sowie drei Tage nach Aussaat zeigte sich kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Zellklonen (Abb. 7 A). Nach sechs Tagen in Kultur kam es hingegen offenbar zu einem Wachstumsstopp in allen KD-Linien, nicht aber im SCR. Sowohl der GPX1-KD als auch die beiden GPX2-KD-Klone zeigten eine gegenüber der Kontrolle verminderte Neutralrotaufnahme. Die Auswirkung des GPX1- bzw. GPX2-KDs auf die Differenzierungsfähigkeit von HT29-Zellen wurde zudem im unbehandelten Zustand sowie nach dreitägiger Butyrat-Behandlung anhand der Messung der ALP-Aktivität überprüft. Bereits im basalen, unstimulierten Zustand wiesen die KDs eine im Vergleich zum SCR um mehr als die Hälfte erniedrigte ALP-Aktivität auf (Abb. 7 B). Nach der Butyrat-Behandlung war in allen Zellklonen ein Anstieg der Enzymaktivität messbar. Interessanterweise war die durch die Differenzierung induzierte Steigerung der ALP sowohl im GPX1- als auch im GPX2-KD signifikant zur Kontrolle vermindert.

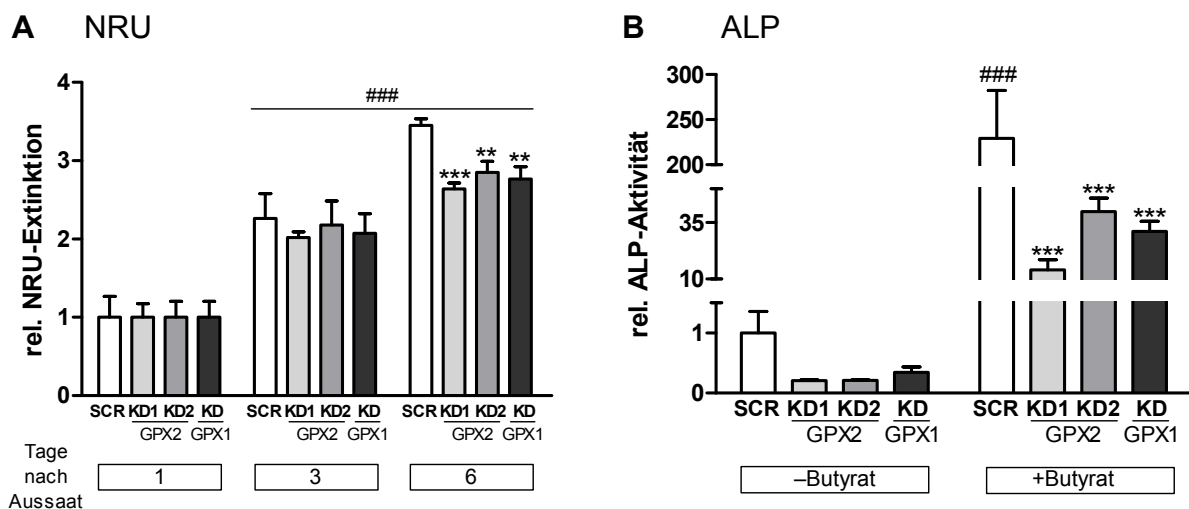


Abbildung 7: Die zelluläre Proliferation und Differenzierung im GPX1- und GPX2-KD.

(A) HT29-Kontrollklone (SCR) und Klone mit shRNA-vermittelterm GPX1- oder GPX2-KD wuchsen für die angegebene Anzahl an Tagen mit 50 nM Selenit im Medium. Nach zweistündiger Inkubation mit Neutralrot wurde die zelluläre Aufnahme des Farbstoffs photometrisch ermittelt. **(B)** Besagte HT29-Klone wurden für 72 h ohne (-Butyrat) oder mit 4 mM Butyrat (+Butyrat) stimuliert und die gesamte Versuchsdauer über mit 50 nM Selenit inkubiert. In den Zellen wurde die Aktivität der ALP photometrisch gemessen und auf den Proteingehalt der Proben normalisiert. Mittelwerte + Standardabweichung (n = 3). **p<0,01; ***p<0,001 versus SCR; ###p<0,001 versus jeweiligem Klon bei Tag 1 nach Aussaat (A) bzw. -Butyrat (B) mittels Two-Way ANOVA und Bonferroni's Posttest.

Die weitere Charakterisierung des Einflusses von GPX1 und GPX2 auf das Wachstumsverhalten von Tumorzellen erfolgte anhand von verschiedenen mRNA-Markern im adhären HT29-Kulturmodell mit und ohne differenzierende Butyratbehandlung. Als Erstes wurde das *Proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) als Marker der Zellproliferation untersucht. Die basalen Transkriptlevel waren lediglich im GPX2-KD1 erniedrigt, während der GPX2-KD2 sowie der GPX1-KD zum SCR vergleichbare Werte zeigten. Nach Induktion der Differenzierung sank die Expression in allen Klonen gleichermaßen auf weniger als 20 % des Ausgangsniveaus (Abb. 8 A). Die Dipeptidylpeptidase 4 (DPP4) ist eine Bürstensaummembran-assoziierte Hydrolase, deren Expression positiv mit der Differenzierung von Enterozyten korreliert [181]. Im undifferenzierten Zustand exprimierten alle drei adhären gewachsenen KD-Klone signifikant weniger DPP4 als die SCR-Kontrolle. Nach Butyratbehandlung war in allen untersuchten Zellen mehr DPP4-mRNA detektierbar. Der basal zwischen SCR und den KD-Klonen bestehende Expressionsunterschied war nach induzierter Zelldifferenzierung allerdings nur noch in den Klonen mit GPX2-KD messbar. Der GPX1-KD wies hingegen eine mit dem SCR vergleichbar starke und somit gegenüber dem GPX2-KD fast doppelt so hohe DPP4-Expression auf (Abb. 8 B).

Einigen der im PCR-Array in beiden KD-Klonen regulierten Gene wird eine mögliche Bedeutung in Bezug auf intestinale Stammzellen nachgesagt. So zeigte sich beispielsweise eine Interaktion zwischen der Stammzellnische und VEGFA [182], dessen Transkript im GPX1- und GPX2-KD erniedrigt war (Abb. 6 A). Die ebenfalls im PCR-Array in beiden KDs herunterregulierte CA9 weist im Darm ein Expressionsmuster auf, das dem des *Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5* (LGR5) ähnelt [183]. Da LGR5 ein wichtiger intestinaler Marker für Stammzellen [184] sowie stammzellähnliche Darmkrebszellen [185] ist, wurde er als Nächstes untersucht. Basal zeigte sich in den adhären Zellen im GPX2-KD1 eine signifikant niedrigere und in den restlichen KD-Klonen tendenziell verringerte LGR5-Expression gegenüber dem SCR. Nach Butyratbehandlung waren die Transkriptmengen in allen Zellen signifikant auf circa 10 % der Ausgangswerte herunterreguliert (Abb. 8 C).

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, dem eine Rolle bei der Kontrolle intestinaler (Krebs-)Stammzellen zugesprochen wird, ist *Achaete-scute family bHLH transcription factor 2* (ASCL2) [186]. Die qPCR-Analyse dieses Gens ergab für alle adhären KD-Zellen Transkriptmengen, die weniger als 10 % des SCR betragen. Die Zelldifferenzierung führte zur Halbierung der ursprünglichen mRNA-Menge in der Kontrolle, hatte aber keine Effekte auf die sowieso schon geringe Genexpression im GPX1- und GPX2-KD (Abb. 8 D).

Ein wichtiger Faktor für den Erwerb von stammzellähnlichen Eigenschaften ist die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT), die Umwandlung von Epithelzellen zu motilen, mesenchymalen Zellen [187, 188]. Als bedeutender Transkriptionsfaktor für diesen Prozess

wurde das Zinkfinger E-box-bindende Homeobox-Protein (ZEB1) identifiziert [189], dessen Expression daher ebenfalls untersucht wurde. In undifferenzierten, adhären HT29-Zellen war die ZEB1-Expression im GPX1-KD signifikant und in den beiden GPX2-KDs tendenziell gegenüber dem SCR erhöht. Die Butyratbehandlung reduzierte die ZEB1-mRNA-Gehalte in allen Zellen um mindestens 50 % und alle KDs zeigten weiterhin eine zumindest tendenziell erhöhte ZEB1-Expression (Abb. 8 E).

Zuletzt wurde mit Cadherin 3 (CDH3) ein Zelladhäsionsmolekül untersucht, dessen häufig in kolorektalen Tumoren erhöhte Expression [190] mit geringerer Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten einhergeht [191]. In der unbehandelten adhären Kultur war dieser Marker nach Analyse mittels One-Way-Anova signifikant geringer im GPX1- und auch in den GPX2-KDs gegenüber dem SCR exprimiert (nicht gezeigt). Nach der Zelldifferenzierung stieg die Expression von CDH3 in allen Klonen, im SCR wurden jedoch weiterhin signifikant höhere Transkriptlevel als im GPX1- und GPX2 KD nachgewiesen (Abb. 8 F).

Anschließend wurden die mRNA-Marker auch in dreidimensionalen HT29-Spheroïden untersucht. Dieses Modell bietet gegenüber adhären wachsenden Zellen den Vorteil, dass Spheroïde strukturell und funktional stärker der Tumorsituation *in vivo* ähneln. Weiterhin kommt es innerhalb dieser Kulturen zu einer Anreicherung sogenannter Tumorstammzellen, deren Bedeutung für die Tumorbilogie seit einigen Jahren diskutiert wird [192]. Das PCNA-Expressionslevel war in den Spheroïden in allen Klonen vergleichbar hoch und zeigte damit für den GPX2-KD1 ein anderes Ergebnis als im adhären wachsenden Zellkulturmodell (Abb. 9 A). Alle KD-Klone wiesen weiterhin in der Spheroïdkultur signifikant weniger mRNA von DPP4 (Abb. 9 B), ASCL2 (Abb. 9 D) und CDH3 (Abb. 9 F) im Vergleich zum jeweiligen SCR auf. In Bezug auf LGR5 zeigten die Spheroïde mit GPX2-KD mit den adhären Zellklonen vergleichbare, tendenziell erniedrigte Transkriptlevel gegenüber der Kontrolle, wogegen die mRNA der GPX1-KD tendenziell erhöht war (Abb. 9 C). Die Gehalte an ZEB1 waren in der Spheroïdkultur tendenziell in den GPX2-KDs und signifikant im GPX1-KD gegenüber dem SCR erhöht (Abb. 9 E).

Zusammenfassend zeigten Zellen mit GPX1- oder GPX2-KD Anzeichen einer geringeren Differenzierung. Zugleich war eine verringerte Viabilität der KDs, gemessen anhand der Zellzahl, nach sechs Tagen in Kultur messbar. Die mRNA-Gehalte der untersuchten Stammzellmarker waren entweder tendenziell (LGR5) oder signifikant (ASCL2) in den GPX2-KDs herunterreguliert. Für den GPX1-KD war dies nur für ASCL2 der Fall. Von LGR5 konnte in den Spheroïden dieses Klons eine verstärkte mRNA-Expression nachgewiesen werden. Der potenzielle Tumormarker CDH3 wies in beiden Modellen in allen KD-Zellen eine geringere Expression gegenüber dem SCR auf. Das für die EMT wichtige Gen ZEB1 war dagegen in den GPX2-KDs tendenziell und im GPX1-KD signifikant zur Kontrolle erhöht.

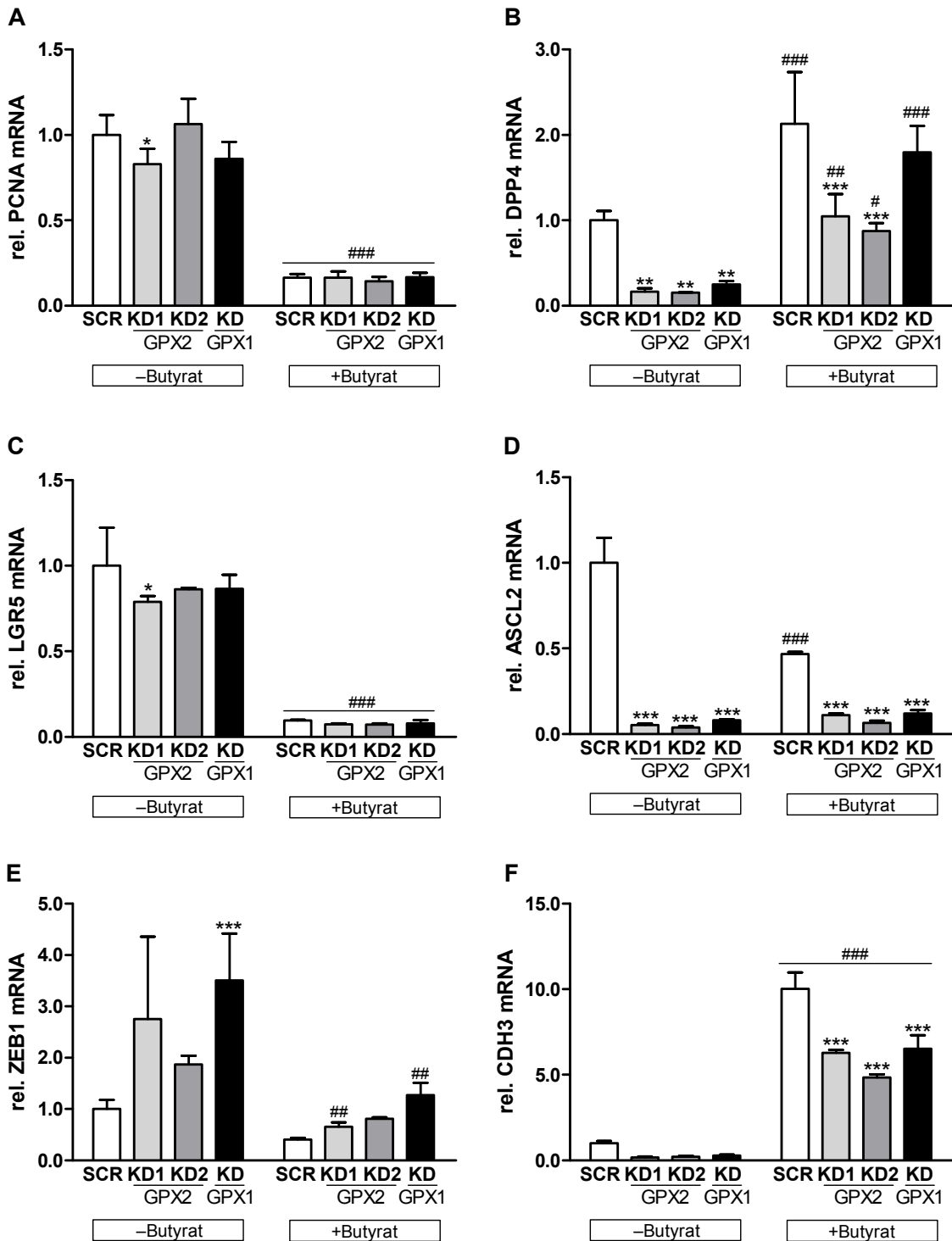


Abbildung 8: Expression von mRNA-Markern in HT29-Zellen mit GPX1- und GPX2-KD.

HT29-Zellen mit shRNA-vermitteltem KD von GPX1 oder GPX2 wuchsen drei Tage lang mit 50 nM Selenit. Es folgte eine 24-stündige Kultivierung ohne (-Butyrate) bzw. mit 4 mM Butyrate (+Butyrate) sowie die anschließende Messung der mRNA-Expression von (A) PCNA, (B) DPP4, (C) LGR5, (D) ASCL2, (E) ZEB1 und (F) CDH3. Normalisiert wurde auf einen Referenzfaktor, bestehend aus den Genen GAPDH, OAZ1 und RPL13a. Mittelwerte + Standardabweichung (n = 3). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 versus SCR; #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 versus entsprechendem Klon bei -Butyrate mittels Two-Way ANOVA und Bonferroni's Posttest.

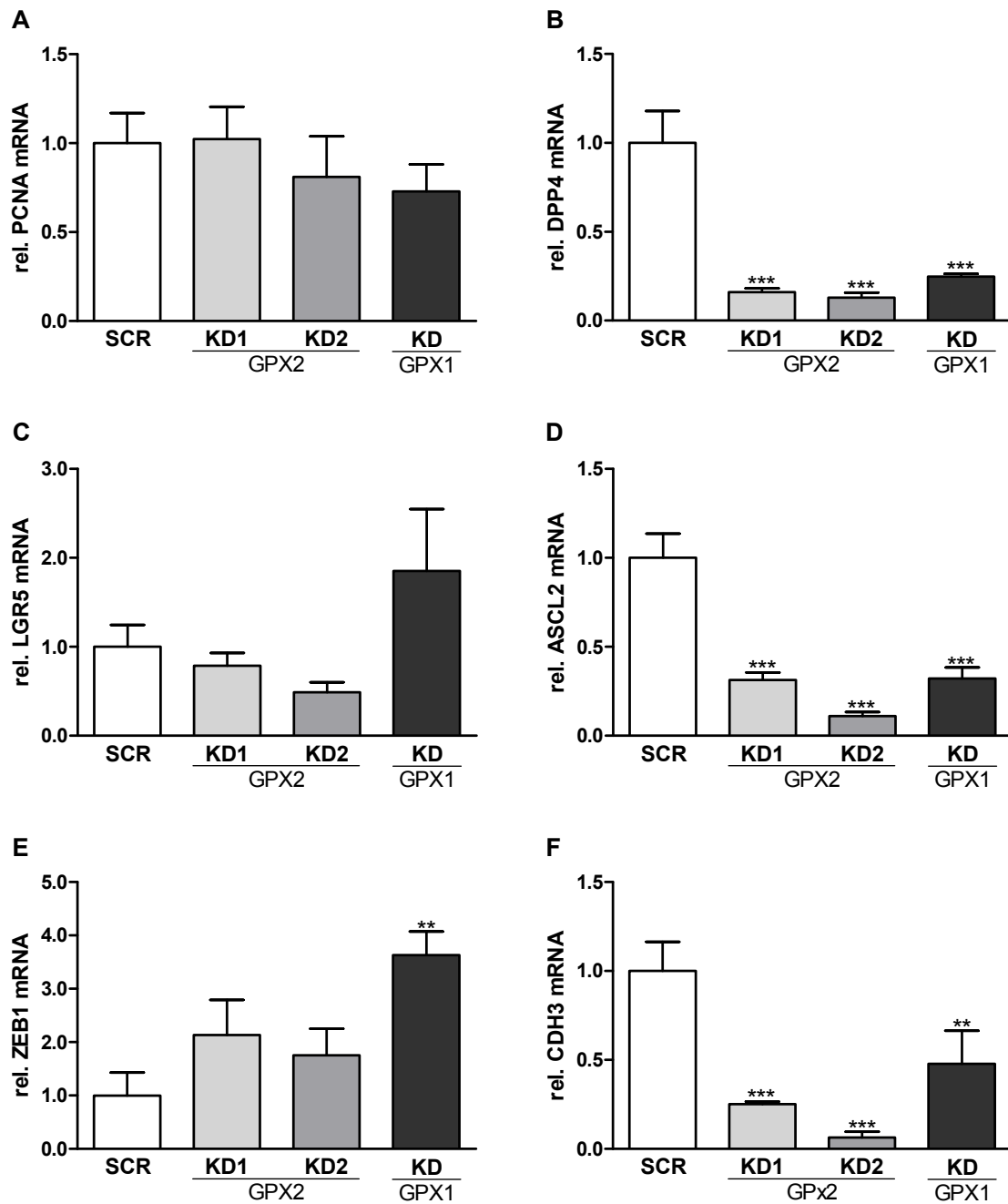


Abbildung 9: Expression von mRNA-Markern in HT29-Spheroiden mit GPX1- und GPX2-KD.

HT29-Zellen mit shRNA-vermitteltem KD von GPX1 oder GPX2 wuchsen sieben Tage lang als Spheroiden mit 50 nM Selenit. In diesen Zellen wurde dann die mRNA-Expression von (A) PCNA (B) DPP4, (C) LGR5, (D) ASCL2, (E) ZEB1 und (F) CDH3 untersucht. Normalisiert wurde auf einen Referenzfaktor aus den Referenzgenen GAPDH, OAZ1 und RPL13a. Mittelwerte + Standardabweichung (n = 3). **p < 0,01; ***p < 0,001 versus SCR mittels One-Way ANOVA und Bonferroni's Posttest.

3.1.4 Interaktion des GPX1- und GPX2-KDs mit Komponenten des NFκB-Signalwegs

Es ist bekannt, dass ein GPX2-KO in Mäusen mit einer erhöhten TNF α -Expression im Darm einhergeht [193]. Das Zytokin kann dabei unter anderem den NFκB-Signalweg aktivieren [194], und somit zur Tumorigenese beitragen [195]. Ergebnissen der Arbeitsgruppe zufolge scheint die GPX2 weiterhin die IL1 β -vermittelte NFκB-Aktivierung zu hemmen [196]. Für die GPX1 konnte in früheren Untersuchungen ebenfalls eine Interaktion mit NFκB nachgewiesen werden [197]. Die Auswertung des PCR-Arrays zeigte zudem im GPX1- und GPX2-KD die Hochregulation der NFκB-Zielgene SERPINE1 [198] und SOCS3 [199] auf (Abb. 6 A). Aufgrund dieser Befunde sollte eine mögliche Funktion der beiden GPXen im NFκB-Signalweg untersucht werden. Zunächst wurden dazu HT29-Zellen 3 h lang mit IL1 β stimuliert und anschließend mittels qPCR auf die Expression von SERPINE1 und SOCS3 untersucht. Bereits im basalen Zustand waren in allen KDs gegenüber dem SCR zumindest tendenziell erhöhte Expressionslevel der jeweiligen mRNA messbar (Abb. 10 A+B). Vom ebenfalls durch NFκB-aktivierbaren CSF1 [200] waren in den GPX2-KDs doppelt- und im GPX1-KD acht Mal so hohe Transkriptmengen detektierbar (Abb. 10 C). Diese Ergebnisse bestätigen das mittels PCR-Array bestimmte Expressionsprofil dieser Gene im GPX1- und GPX2-KD. Als weiteres NFκB-Zielgen wurde die COX2 untersucht [201, 202]. Die basale Expression lag in den KDs etwa siebenfach über der des SCR (Abb. 10 D). Die dreistündige Stimulation mit IL1 β hatte eine signifikante Expressionssteigerung der vier untersuchten Gene in den Zellen ohne GPX1 bzw. GPX2 zur Folge, wogegen der Effekt in der SCR-Kontrolle schwächer ausfiel. So war nach der IL1 β -Gabe im SCR doppelt so viel SERPINE1-Transkript wie im basalen Zustand vorhanden, wogegen in allen KDs mindestens drei Mal mehr mRNA vorlag (Abb. 10 A). Die SOCS3-Expression stieg mit IL1 β im SCR auf das Fünffache des Ausgangswertes, während der GPX1-KD acht und der GPX2-KD2 zwölf Mal mehr Transkript aufwies. Trotz des basal signifikant erhöhten SOCS3-Transkriptlevels im GPX2-KD1 stieg dessen Expression nach IL1 β -Behandlung weniger stark als in den restlichen KD-Klonen (Abb. 10 B). Für CSF1 und die COX2 war nach Stimulation mit IL1 β lediglich die Expressionssteigerung in den KDs, nicht aber im SCR, statistisch signifikant (Abb. 10 C+D). Generell verursachte die IL1 β -Stimulation im GPX1-KD die stärkste absolute Steigerung der Expression aller untersuchten Gene.

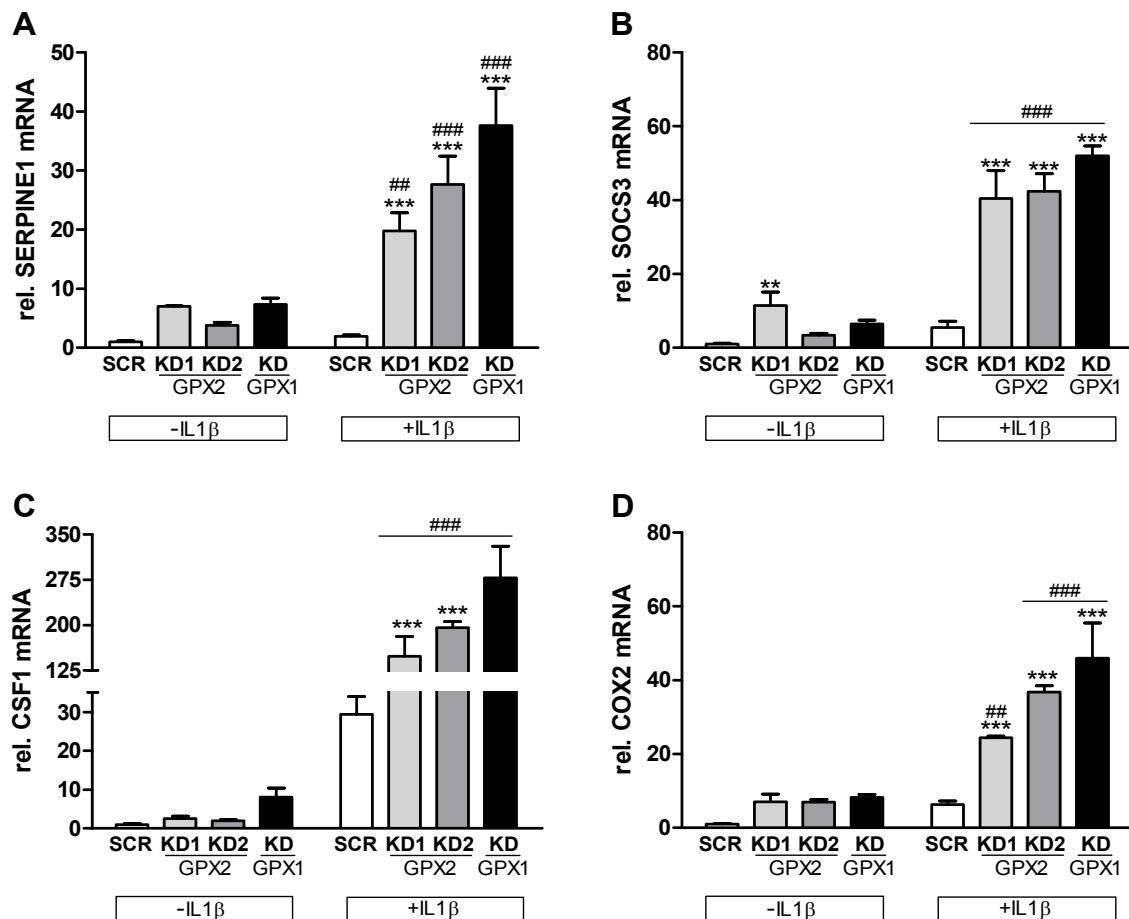


Abbildung 10: Expression von NFκB-Zielgenen im GPX1- und GPX2-KD.

In HT29-Zellen mit shRNA-vermittelterm KD von GPX1 oder GPX2 wurde vor und nach 3-stündiger Behandlung mit 1 ng/mL IL1β (+IL1β) die mRNA-Expression von **(A)** SERPINE1, **(B)** SOCS3, **(C)** CSF1, und **(D)** COX2 mittels qPCR gemessen. Normalisiert wurde auf einen Referenzfaktor bestehend aus den Genen GAPDH, OAZ1 und RPL13a. Mittelwerte + Standardabweichung (n = 3). **p<0,01; ***p<0,001 versus SCR; ##p<0,01; ###p<0,001 versus entsprechendem Klon bei -IL1β mittels Two-Way ANOVA und Bonferroni's Posttest.

Da der GPX1- und GPX2-KD eine erhöhte Expression von NFκB-Zielgenen aufwies, sollte geklärt werden, ob dies die Folge einer verstärkten Aktivierung des Signalwegs war. Als ein aktivierendes Signal wurde die proteasomale Degradierung des *Nuclear Factor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-cells Inhibitor, Alpha* (IκBα) beschrieben [203]. Dieses Protein bindet im basalen Zustand NFκB und verhindert damit dessen Translokation in den Zellkern. Auf Proteinebene war im Western Blot nach 30 min IL1β-Stimulation signifikant weniger IκBα im GPX2-KD1 und im GPX1-KD als im SCR detektierbar. Der zweite GPX2-KD Klon wies tendenziell ebenfalls geringere Proteinmengen auf (Abb. 11 A). Dieses Ergebnis deutet auf einen möglicherweise schnelleren Abbau von IκBα in den KD-Linien hin. Solch ein Abbau wird unter anderem durch die IKK induziert, die dafür zunächst selbst aktivierend phosphoryliert werden müssen [51]. Der Grad der IKK-Phosphorylierung war nach 15 min Stimulation mit IL1β in beiden GPX2-KDs signifikant gegenüber dem SCR erhöht, während im GPX1-KD signifikant weniger Phospho-IKK nachweisbar war (Abb. 11 B). Welche Kinase

genau die IKK aktiviert, ist aktuell noch nicht eindeutig geklärt. Eine Beteiligung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), zu denen auch ERK gehört, wurde diskutiert [204]. Da die Auswertung des PCR-Arrays eine mögliche Regulation dieses Signalwegs im GPX1- und GPX2-KD aufzeigte (Abb. 6 B), wurde die Aktivierung der ERK-Isoformen 1 und 2 im Western Blot überprüft. Basal zeigte sich im Phosphorylierungsgrad der Kinasen kein Unterschied zwischen der SCR-Kontrolle und den beiden GPX-KDs. Eine 30-minütige Stimulation mit IL1 β steigerte die Phosphorylierungslevel und damit die Aktivierung des Proteins in allen Klonen. Sowohl für ERK1 als auch ERK2 kam es dabei zu einer signifikant stärkeren Phosphorylierung in den KD-Linien gegenüber der Kontrolle (Abb. 11 C+D).

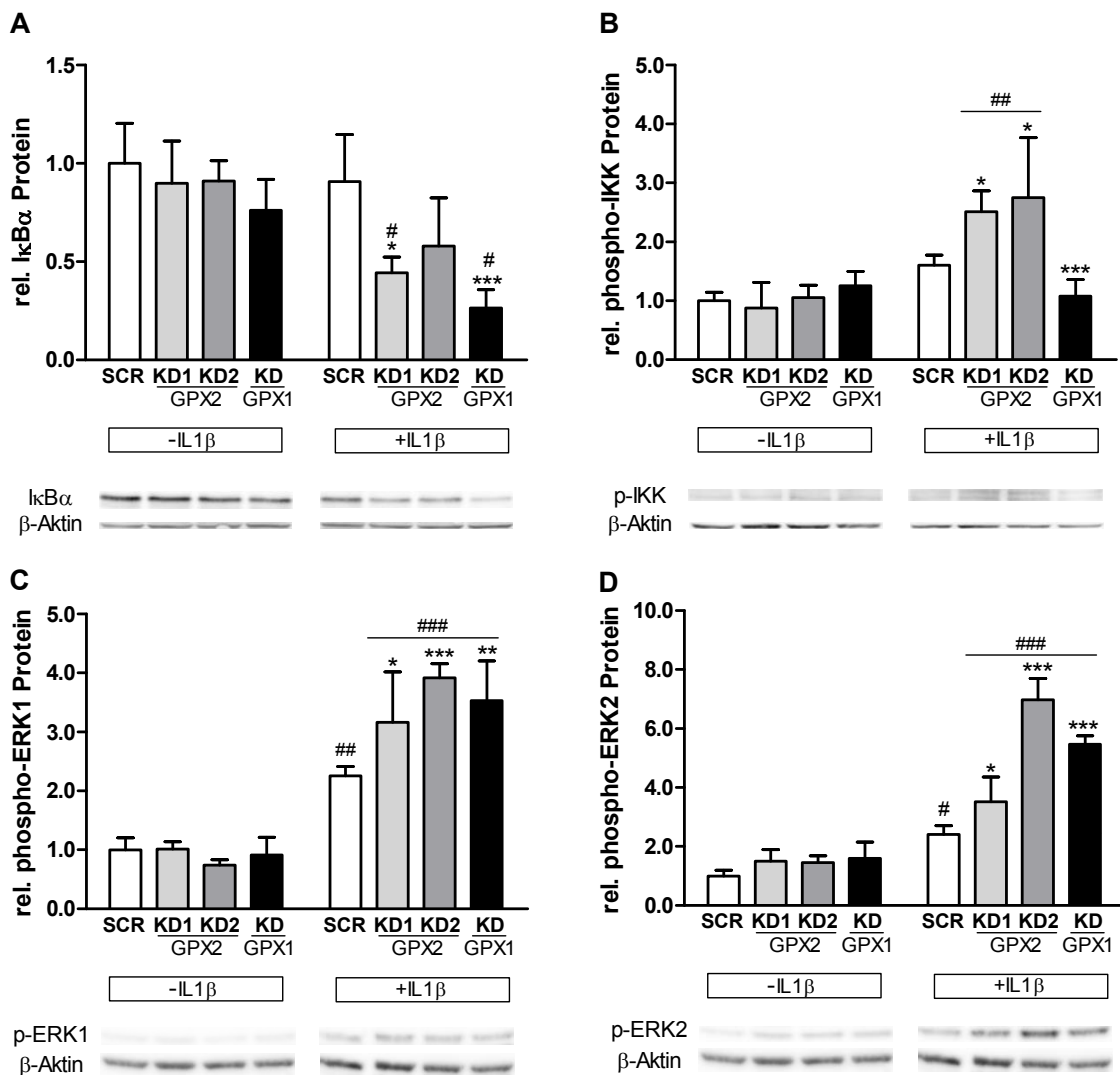


Abbildung 11: Analyse von Komponenten des NF κ B-Signalwegs im GPX1- und GPX2-KD.

In HT29-Zellen mit shRNA-vermitteltem KD von GPX1 oder GPX2 wurden vor sowie nach 15 bzw. 30 min Behandlung mit 1 ng/mL IL1 β (+IL1 β) die Proteinexpression von (A) IkB α (30 min) sowie die Phosphorylierungslevel von (B) IKK (15 min), (C) ERK1 (30 min) und (D) ERK2 (30 min) im Western Blot detektiert. Normalisiert wurde auf das Referenzprotein β -Aktin. Mittelwerte + Standardabweichung (n = 3). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 versus SCR; #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 versus entsprechendem Klon bei -IL1 β mittels Two-Way ANOVA und Bonferroni's Posttest.

Studien weisen auf die Relevanz eines veränderten zellulären Redoxstatus für die Aktivierung des MAPK- [205] als auch des NFκB-Signalwegs [52] hin. Um zu prüfen, ob Antioxidantien solch einer Aktivierung entgegenwirken können, wurden die Zellen vor der IL1β-Behandlung mit N-Acetyl-Cystein (NAC) inkubiert und auf die Proteinexpression von COX2 untersucht. Im unstimulierten Zustand zeigte sich wie bereits auf mRNA-Ebene (Abb. 10 D) eine gegenüber dem SCR erhöhte COX2-Expression in allen GPX-KD Klonen (Abb. 12 A). Nach 4 h mit IL1β konnte in allen Klonen etwa doppelt so viel COX2-Protein wie basal detektiert werden, wobei die GPX1- und GPX2-KDs erneut eine höhere Proteinexpression im Vergleich zum SCR aufwiesen. Die 60-minütige Vorbehandlung mit NAC wiederum hob den Effekt der anschließenden IL1β-Stimulation auf und die Menge an COX2-Protein verringerte sich in allen Zellklonen auf das Niveau un behandelter Zellen. Die Proteinexpression war jedoch trotz NAC-Behandlung im GPX1- und GPX2-KD noch immer im Vergleich zum SCR erhöht. Ähnliche Beobachtungen ließen sich bei einstündiger Vorbehandlung IL1β-stimulierter Zellen mit dem MEK/ERK-spezifischen Inhibitor PD98059 machen. Auch hier hob der Hemmstoff die durch IL1β gesteigerte COX2-mRNA-Expression auf, hatte aber keinen Einfluss auf bereits basal erhöhte Transkriptmengen in den GPX1- und GPX2-KDs (Abb. 12 B).

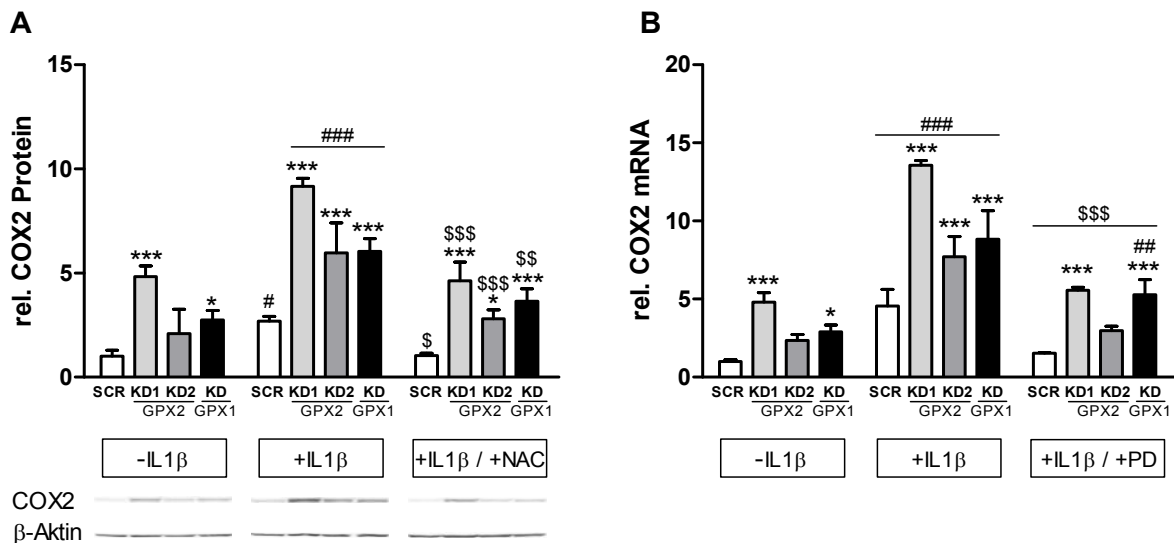


Abbildung 12: Expression von COX2 im GPX1- und GPX2-KD nach Behandlung mit NAC oder PD98059.

(A) HT29-Zellen mit shRNA-vermitteltem KD von GPX1 oder GPX2 wurden 4 h mit 1 ng/mL IL1β (+IL1β) behandelt oder für 1 h mit 50 mM NAC inkubiert und dann mit IL1β (+IL1β / +NAC) stimuliert. Vor und nach der Behandlung wurde die Proteinexpression von COX2 im Western Blot detektiert und auf das Referenzprotein β-Aktin normalisiert.

(B) Besagte Zellen wurden 3 h mit 1 ng/mL IL1β (+IL1β) behandelt oder 1 h mit 10 μM PD98059 inkubiert und dann für 3 h mit 1 ng/mL IL1β (+IL1β / +PD) stimuliert. Anschließend wurde die mRNA-Expression von COX2 mittels qPCR gemessen und auf einen Referenzfaktor, bestehend aus den Genen GAPDH, OAZ1 und RPL13a, normalisiert. Mittelwerte + Standardabweichung (n = 3). *p<0,05; ***p<0,001 versus SCR; #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 versus jeweiligem Klon bei -IL1β; \$p<0,05; \$\$p<0,01; \$\$\$p<0,001 versus entsprechendem Klon bei +IL1β mittels Two-Way ANOVA und Bonferroni's Posttest.

Zusammengefasst ließ sich sowohl für GPX1- als auch GPX2-KD-Zellen eine verstärkte Aktivierung des NFκB-Signalwegs nach IL1β-Stimulation zeigen. Auch eine erhöhte Phosphorylierung der möglicherweise vorgeschalteten MAP-Kinasen ERK1/2 war in beiden KD-Linien nachweisbar. Zwar konnte eine NAC-Behandlung die durch IL1β erhöhte Expression von COX2 rückgängig machen, die Expressionsunterschiede zwischen GPX1- bzw. GPX2-KD und der Kontrolle blieben jedoch weiterhin bestehen.

3.1.5 Substratspezifität der GPX2 und Untersuchungen zur Apoptose

Für die GPX1 und die GPX4 ist bekannt, dass eine Überexpression dieser GPX-Isoformen eine NFκB-Aktivierung verhindern kann [206, 207]. Es wird angenommen, dass dies über die Reduktion von NFκB-aktivierenden Hydroperoxiden geschieht. Im Fall der GPX1 handelt es sich dabei vermutlich um Wasserstoffperoxid und bei der GPX4 werden in diesem Zusammenhang Lipidhydroperoxide als Substrat vermutet. Durch frühere Untersuchungen weiß man, dass das Substratspektrum der GPX2 wahrscheinlich dem der GPX1 ähnelt [134], die genaue Substratspezifität ist allerdings unklar. Da Hydroperoxide neben ihrer Rolle als physiologische Signalmoleküle auch relevant in der kolorektalen Karzinogenese sind [208], wurde die Funktion der GPX2 in diesem Kontext genauer untersucht. Zunächst war zu klären, ob ein KD von GPX1 oder GPX2 den oxidativen Status von Darmkrebszellen beeinflusst. Dazu wurde die Oxidation des Farbstoffs DHR123 zu Rhodamin mit und ohne Zugabe verschiedener Hydroperoxide bestimmt.

Im basalen Zustand war im Vergleich zur SCR-Kontrolle eine doppelt so hohe Rhodaminfluoreszenz im GPX1-KD und im GPX2-KD1 messbar, im zweiten GPX2-KD betrug die Steigerung etwa 50 %. Sowohl H₂O₂, TBHP als auch HPODE und HPETE bewirkten in allen Klonen eine signifikant gesteigerte DHR123-Oxidation gegenüber dem unstimulierten Zustand. Die ermittelte Fluoreszenz war nach Gabe von H₂O₂ im GPX1-KD und GPX2-KD1 tendenziell im Vergleich zur SCR-Kontrolle erhöht. TBHP verursachte im GPX1-KD und GPX2-KD1 eine signifikant und im GPX2-KD2 eine tendenziell höhere DHR123-Oxidation gegenüber dem SCR. Nach HPODE-Gabe zeigten alle KD-Klone eine gesteigerte Fluoreszenz, wobei dies jedoch einzig im GPX1-KD statistisch signifikant war. Die HPETE-Stimulation hatte den stärksten Fluoreszenzanstieg in allen Zellen zur Folge. Unterschiede zwischen dem SCR und dem GPX1- oder GPX2-KD waren jedoch nicht detektierbar (Abb. 13).

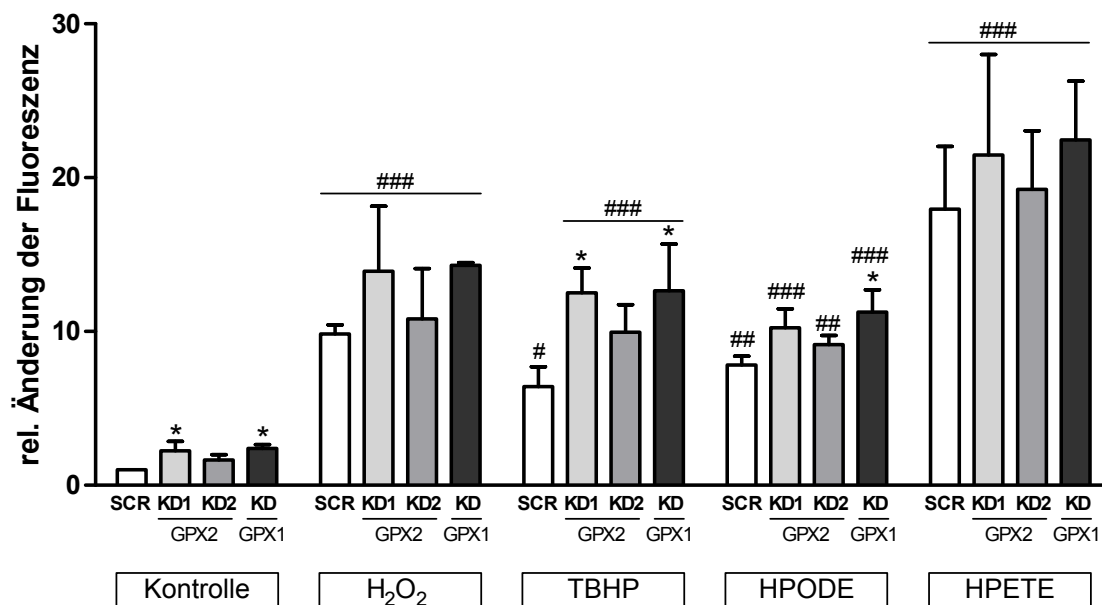


Abbildung 13: Suszeptibilität des GPX1- und GPX2-KDs für verschiedene Hydroperoxide.

HT29-Zellen mit shRNA-vermitteltem KD der GPX1 oder GPX2 wurden drei Tage mit 50 nM Selenit behandelt. Es folgte eine Inkubation mit 5 μ M DHR123 für 45 min bei 37 °C und anschließend 60 min Stimulation mit 1 mM H₂O₂ oder je 50 μ M TBHP, HPODE bzw. HPETE. Im Anschluss an die Fluoreszenzmessung wurde ein NRU-Assay durchgeführt und auf diesen normalisiert. Mittelwerte + Standardabweichung (n = 3). *p<0,05 versus SCR; #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 versus entsprechendem Kontrollklon mittels Two-Way ANOVA und Bonferroni's Posttest.

Wie gezeigt weisen HT29-Zellen bei Fehlen von GPX1 bzw. GPX2 nach Stimulation mit verschiedenen Hydroperoxiden eine zum Teil erhöhte DHR123-Oxidation auf. Ob dieser Umstand im Kontext der oxidativem Stress-bedingten Apoptose eine Rolle spielt, sollte im Folgenden für die GPX2 geklärt werden. Dazu wurde das Protein mit einem YFP-tag versehen und in HCT116-Darmkrebszellen überexprimiert (YFP-GPX2). Als Kontrolle dienten YFP-transfizierte HCT116-Zellen (YFP). Weiterhin wurden Zellen untersucht, bei denen das Selenocystein im katalytischen Zentrum der überexprimierten GPX2 zu Serin mutiert war (YFP-GPX2 U40S). Mit diesem Zellklon konnte die Beteiligung der enzymatischen Funktion der GPX2 beurteilt werden. Die Herstellung der Zellen erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Onno Kranenburg (UMC Utrecht, Niederlande).

Als Erstes wurde überprüft, ob sich das Einbringen der GPX2 auf die Proteinexpression der verschiedenen GPX-Isoformen auswirkte. Die YFP-getaggte GPX2 war deutlich im YFP-GPX2-Klon und noch stärker in der U40S-Mutante, nicht aber in der YFP-transfizierten Kontrolle nachweisbar. Eine endogene GPX2-Expression bei 22 kDa konnte in keinem der drei Klone nachgewiesen werden. Die Expression des transfizierten YFP-Kontrollvektors wurde ebenfalls untersucht und war in der YFP-Kontrolle am höchsten. Die zwei Klone mit transfizierter GPX2 hingegen wiesen bedeutend weniger YFP auf (Abb. 14 A).

Weiterhin war die Expression der GPX1 (Abb. 14 B) und der GPX4 (Abb. 14 C) in jeweils allen drei Klonen auf einem vergleichbaren Niveau und damit nicht durch die Transfektion beeinflusst.

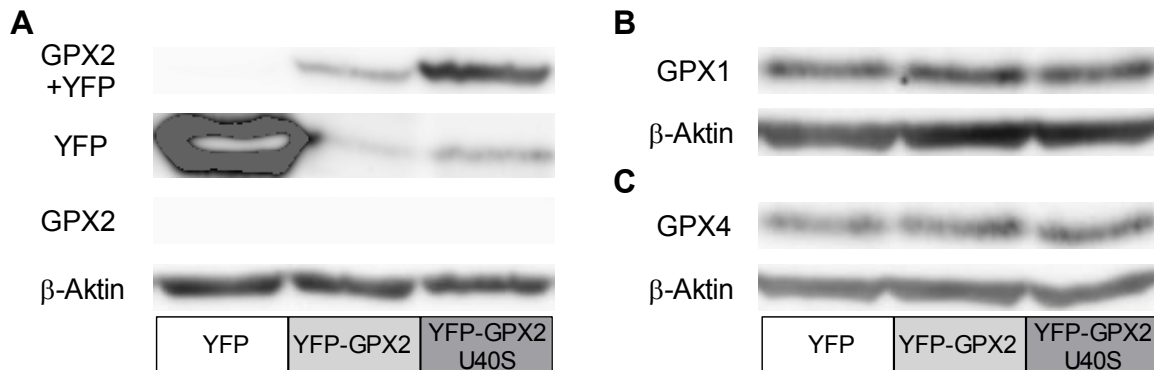


Abbildung 14: Charakterisierung der HCT116-Zellen mit GPX2-Überexpression.

In HCT116-Zellen mit YFP-Kontrollvektor (YFP), GPX2-Überexpression (YFP-GPX2) oder überexprimierter inaktiver GPX2 (YFP-GPX2 U40S) wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten die Proteinexpression von **(A)** GPX2 und YFP sowie **(B)** GPX1 und **(C)** GPX4 mittels Western Blot überprüft. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot mit entsprechenden Banden des Referenzproteins β-Aktin.

Die Bestimmung der GPX-Aktivität sollte nun Hinweise zur möglichen Substratpräferenz der GPX2-transfizierten HCT116-Zellen liefern. Im Zuge dieser Untersuchung wurden die vier Hydroperoxide H_2O_2 , TBHP, HPODE und HPETE getestet. Mit jedem der getesteten Substrate zeigte der Klon mit GPX2-Überexpression in allen Versuchen eine gegenüber der YFP-Kontrolle erhöhte Gesamt-GPX-Aktivität. Der Klon mit mutierter GPX2 lag beim Substrat H_2O_2 signifikant und im Fall der restlichen Substrate tendenziell unter Kontrollniveau. Für H_2O_2 (Abb. 15 A) und TBHP (Abb. 15 B) konnte in allen Klonen eine insgesamt höhere absolute GPX-Aktivität verglichen mit den Lipidhydroperoxiden HPODE (Abb. 15 C) und HPETE (Abb. 15 D) nachgewiesen werden. Die beiden letztgenannten Substanzen wurden jedoch im GPX2-Überexprimierer doppelt so gut wie von der YFP-Kontrolle umgesetzt. Bei H_2O_2 wies der YFP-GPX2-Klon dagegen eine im Vergleich zum YFP-Klon um nur 62 % erhöhte Enzymaktivität auf. Die höchste absolute Enzymaktivität zeigte der GPX2-Überexprimierer mit knapp 87 mU/mg Protein bei TBHP, dies entspricht fast drei Mal der Menge wie im Klon ohne GPX2.

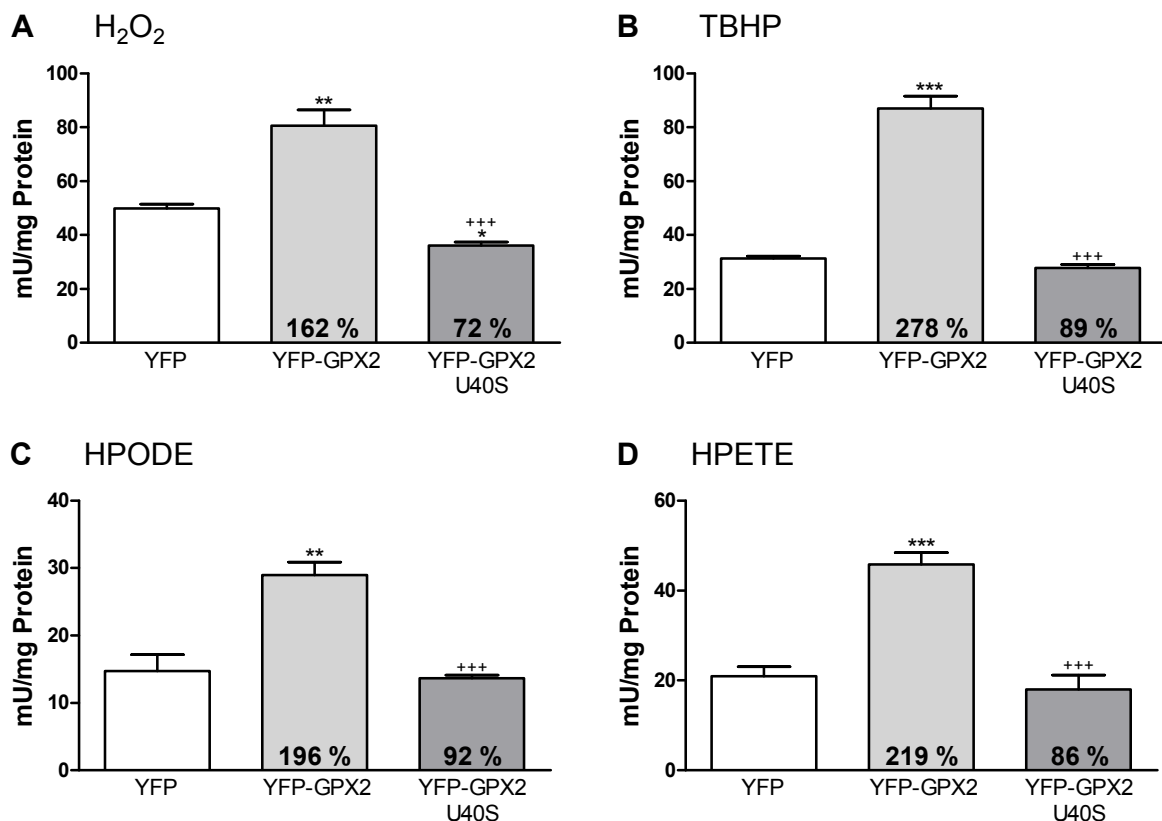


Abbildung 15: GPX-Aktivität in Zellen mit GPX2-Überexpression.

In HCT116-Zellen mit YFP-Kontrollvektor (YFP), GPX2-Überexpression (YFP-GPX2) oder überexprimierter inaktiver GPX2 (YFP-GPX2 U40S) wurde die GPX-Aktivität photometrisch detektiert und auf den Proteingehalt der Proben normalisiert. Als Substrate kamen **(A)** 50 μ M H₂O₂, **(B)** 50 μ M TBHP, **(C)** 50 μ M HPODE und **(D)** 12,5 μ M HPETE zum Einsatz. Mittelwerte + Standardabweichung (n = 3). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 versus YFP; ***p<0,001 versus YFP-GPX2 mittels One-Way ANOVA und Bonferroni's Posttest.

Für alle getesteten Substrate ging also die funktionale GPX2-Überexpression mit einer erhöhten GPX-Aktivität gegenüber den Klonen mit fehlender bzw. inaktiver GPX2 einher. Um zu prüfen, ob die GPX2 die Zellen vor den negativen Folgen erhöhter Hydroperoxidmengen schützt, wurden die YFP-Kontrolle und der YFP-GPX2-Klon mit unterschiedlichen hohen Konzentrationen der vier bekannten Substrate behandelt. Als zusätzliche Positivkontrolle kam KillerTRAIL, ein potenter Auslöser von Apoptose in Tumorzellen [209], zum Einsatz. Die Messung der Neutralrotaufnahme gab dabei Auskunft über die Zellviabilität. Eine Stimulation mit H₂O₂ verringerte sowohl im YFP-Klon als auch im GPX2-Überexprimierer ab 500 μ M zwar signifikant die Lebensfähigkeit der Zellen, aber selbst bei 2 mM betrug der Anteil lebender Zellen noch mindestens 80 % (Abb. 16 A). Bei der Behandlung mit TBHP waren vergleichbare Ergebnisse zu beobachten, die Substanz schien ähnlich wie H₂O₂ geringe Auswirkungen auf die Zellviabilität zu haben (Abb. 16 B). Das Lipidhydroperoxid HPODE sorgte bei 400 μ M für eine tendenziell geringere Lebensfähigkeit der YFP-Kontrollzellen (55 %) im Vergleich zum GPX2-Überexprimierer (75 %). In der höchsten getesteten HPODE-Konzentration (500 μ M) waren die Unterschiede zwischen den Klonen signifikant, nur noch

28 % der YFP-Klone, aber fast 70 % der Zellen mit GPX2, waren lebensfähig (Abb. 16 C). Auch die Stimulation mit HPETE beeinflusste die Lebensfähigkeit der Zellen mit GPX2 in geringerem Maße als die der YFP-Kontrolle. Während 50 μM der Substanz keine Effekte hatte, waren bei 100 μM signifikant mehr YFP-GPX2- als YFP-Kontrollzellen lebendig. Bei 150 μM zeigten dann nur noch knapp 2 % der Kontrolle, aber 20 % der Zellen mit GPX2 eine Aufnahme von Neutralrot (Abb. 16 D). KillerTRAIL sorgte ab 50 ng/mL in beiden Klonen für ein signifikantes Absinken der Neutralrotaufnahme, bei der höchsten getesteten Konzentration (150 ng/mL) lag der Anteil an toten Zellen gleichermaßen bei knapp 50 % (Abb. 16 E).

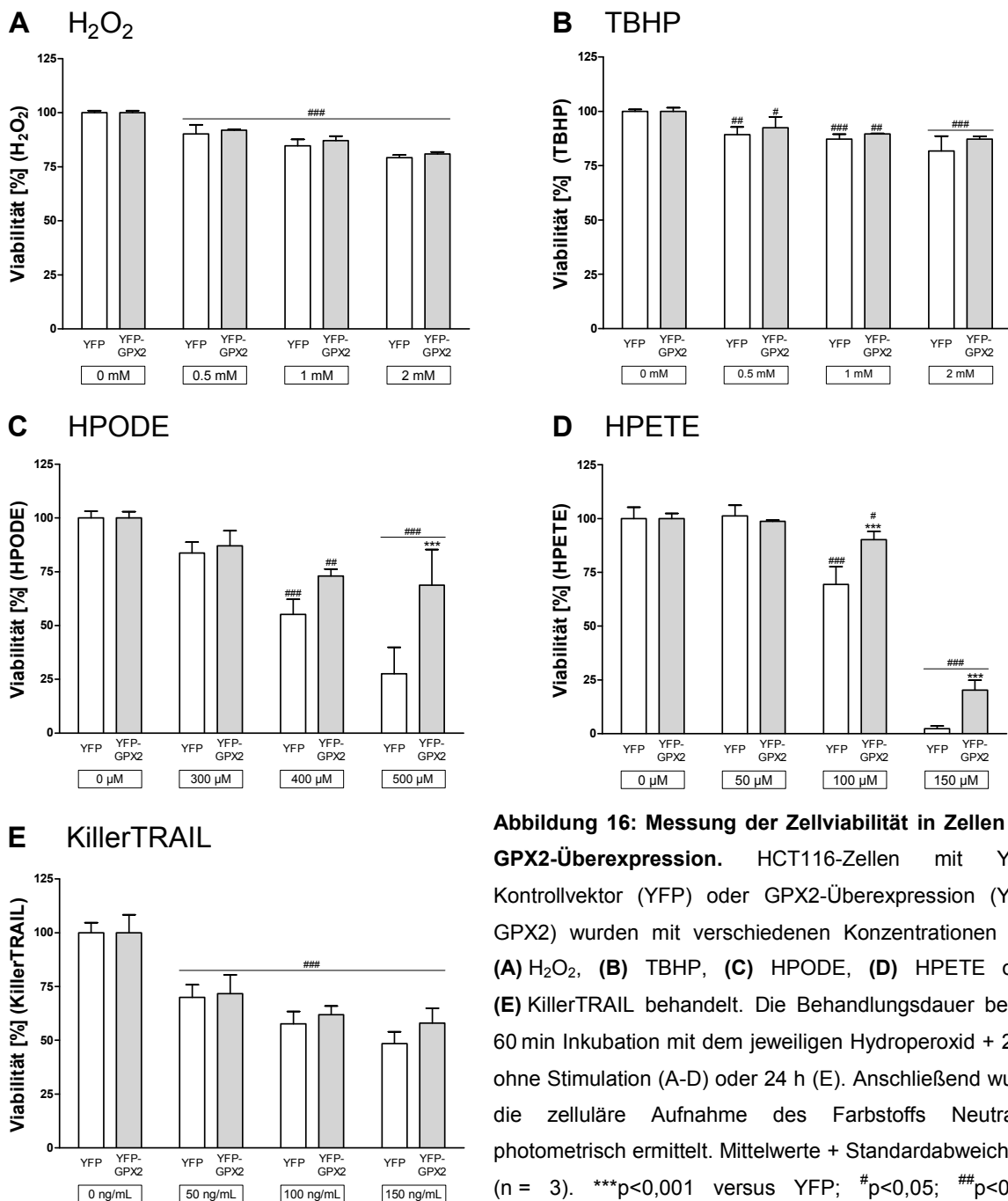


Abbildung 16: Messung der Zellviabilität in Zellen mit GPX2-Überexpression. HCT116-Zellen mit YFP-Kontrollvektor (YFP) oder GPX2-Überexpression (YFP-GPX2) wurden mit verschiedenen Konzentrationen von (A) H₂O₂, (B) TBHP, (C) HPODE, (D) HPETE oder (E) KillerTRAIL behandelt. Die Behandlungsdauer betrug 60 min Inkubation mit dem jeweiligen Hydroperoxid + 23 h ohne Stimulation (A-D) oder 24 h (E). Anschließend wurde die zelluläre Aufnahme des Farbstoffs Neutralrot photometrisch ermittelt. Mittelwerte + Standardabweichung (n = 3). ***p<0,001 versus YFP; #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 versus entsprechendem unbehandelten Klon mittels Two-Way ANOVA und Bonferroni's Posttest.

Die Analyse der Zellviabilität nach Hydroperoxidbehandlung deutet darauf hin, dass eine GPX2-Überexpression HCT116-Zellen bevorzugt vor Schäden durch einige der getesteten Lipidhydroperoxide schützt. Dies sollte mit einem weiteren Ansatz, dem DNA-Laddering, validiert werden sollte. Hierbei wurde das Auftreten geschnittener DNA-Fragmente, einem typischen Kennzeichen der Apoptose [210], elektrophoretisch nachgewiesen. Neben den bisherigen vier Hydroperoxidsubstraten wurden die Zellen erneut auch mit KillerTRAIL behandelt. Je nach Behandlung kam es zu unterschiedlich starker DNA Fragmentierung in den Zellen, während diese in keinem der unbehandelten Klone festzustellen war (Abb. 17 F). Die Stimulation mit H_2O_2 verursachte die stärkste Reaktion im Klon mit mutierter GPX2, während die YFP-Kontrolle und der GPX2-Überexprimierer eine miteinander vergleichbar starke DNA-Fragmentierung aufwiesen (Abb. 17 A). Nach der TBHP-Behandlung waren in beiden Klonen mit GPX2-Expression tendenziell weniger DNA-Fragmente als im YFP-Kontrollklon detektierbar (Abb. 17 B). Im Fall von HPODE war der YFP-GPX2-Klon tendenziell besser, die GPX2-Mutante tendenziell schlechter als der YFP-Klon ohne GPX2 geschützt (Abb. 17 C). Beim Substrat HPETE resultierte die Expression einer funktionalen GPX2 ebenfalls in geringerer DNA-Fragmentierung, wogegen der Klon mit inaktiver GPX2 auf Kontrollniveau lag (Abb. 17 D). Die stärkste Reaktion hatte die Behandlung mit KillerTRAIL zur Folge, allerdings zeigten sich hierbei keine Unterschiede zwischen den drei Klonen (Abb. 17 E).

Die Untersuchungen zur DNA-Fragmentierung lassen die getesteten Lipidhydroperoxide als bevorzugtes, endogen vorkommendes Substrat der GPX2 im Vergleich zu H_2O_2 und TBHP vermuten. Dies steht im Einklang mit den Messungen der GPX-Aktivität, in welchen HPODE und HPETE vom GPX2-Überexprimierer relativ gesehen besser als H_2O_2 umgesetzt wurden. Die Zellviabilität im NRU-Test war bei Fehlen der GPX2 am stärksten nach Gabe von HPODE und HPETE herabgesetzt. Die Rolle von TBHP als Substrat der GPX2 lässt sich nicht eindeutig beurteilen. Zwar war eine hohe Umsetzung im GPX-Aktivitätsassay messbar, ein stark zellschädigender Effekt der Substanz bei Fehlen der GPX2 ließ sich aber zumindest nicht mit den getesteten Konzentrationen und Methoden finden.

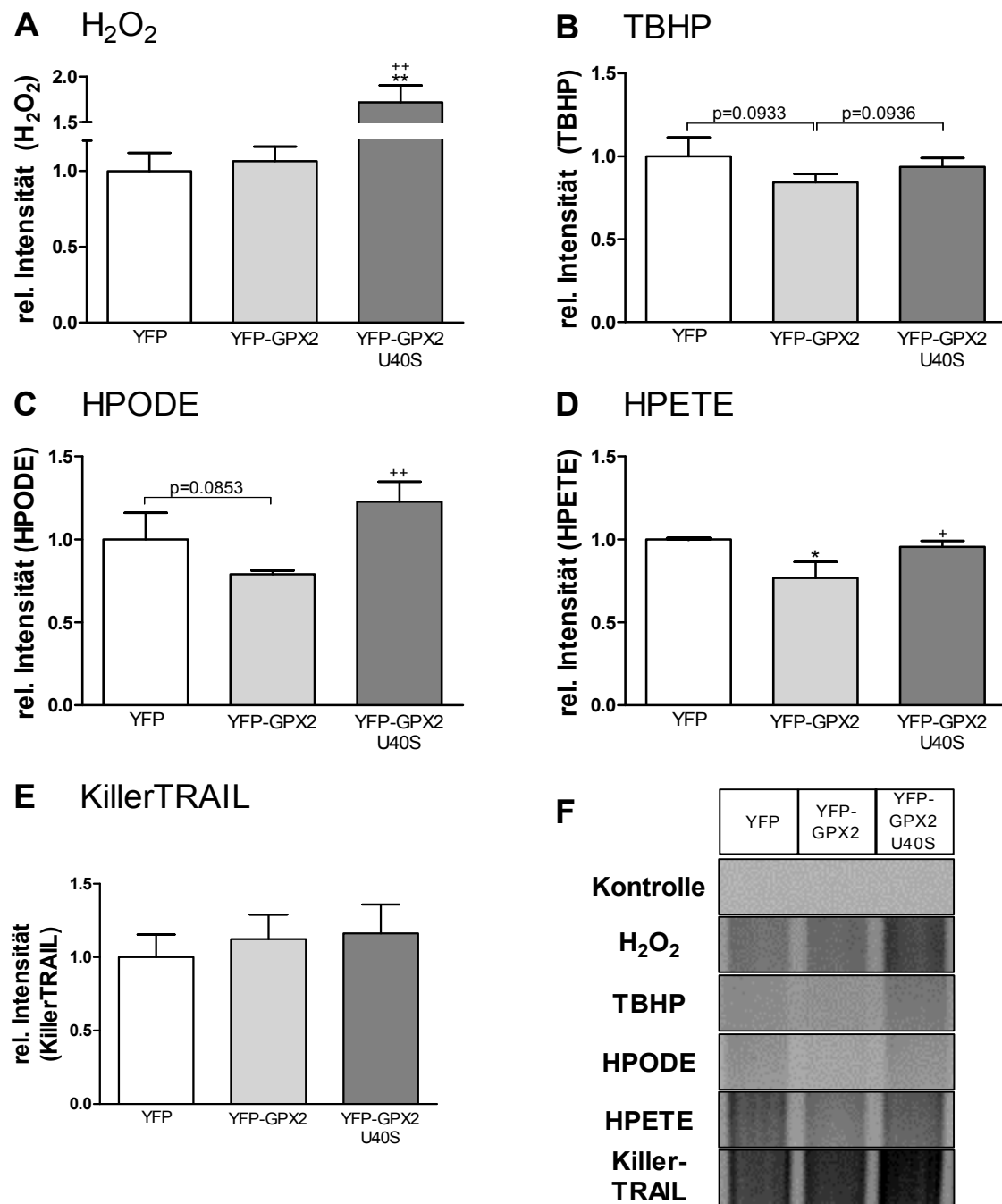


Abbildung 17: Qualitative Erfassung des Zelltods bei überexprimierter GPX2 nach Behandlung mit verschiedenen Hydroperoxiden oder KillerTRAIL.

HCT116-Zellen mit YFP-Kontrollvektor (YFP), GPX2-Überexpression (YFP-GPX2) oder überexprimierter inaktiver GPX2 (YFP-GPX2 U40S) wurden mit (A) 1 mM H₂O₂, (B) 1 mM TBHP, (C) 300 µM HPODE, (D) 100 µM HPETE oder (E) 60 ng/mL KillerTRAIL behandelt. Die Behandlungsdauer betrug 90 min Inkubation mit dem jeweiligen Hydroperoxid + 23 h ohne Stimulation (A-D) bzw. 24 h (E). Anschließend wurden 10 µg der aufgearbeiteten DNA mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt und densitometrisch ausgewertet. (F) Dargestellt sind repräsentative Gelausschnitte. Mittelwerte + Standardabweichung (n = 3). *p<0,05; **p<0,01 versus YFP; +p<0,05; ++p<0,01 versus YFP-GPX2 mittels ungepaartem Student's t-Test.

3.2 Funktion von Selenoprotein H bei Darmkrebs

SELENOH gehört im Gegensatz zur GPX2 zu den am stärksten durch die Selenzufuhr regulierten Selenoproteinen [91, 211]. Ein niedriger Selenstatus und die damit einhergehende geringe Expression von selen-sensitiven Selenoproteinen erhöht laut der prospektiven EPIC-Studie das Risiko, an Kolorektalkrebs zu erkranken [114]. In Krebszelllinien verschiedener Gewebe (u. a. Prostata, Brust, Leber und Gebärmutterhals) konnten interessanterweise hohe Mengen des SELENOH-Transkripts nachgewiesen werden [169]. Daher sollte nun untersucht werden, ob SELENOH möglicherweise ein Bindeglied zwischen dem systemischem Selenstatus und CRC darstellt.

3.2.1 Expression von SELENOH in humanen Adenokarzinomen und in präkanzerösen Läsionen von APC^{min/+}-Mäusen

Als Erstes wurde geprüft, ob SELENOH, wie z. B. die GPX2 auch, eine abnormale Expression während der kolorektalen Karzinogenese aufweist. Die Expression des Proteins wurde zunächst mithilfe eines Colon cancer tissue arrays untersucht. Dieser enthielt Gewebeproben bösartiger Adenokarzinome des Kolons sowie gepaarte Schnitte des umliegenden, gesunden Gewebes. Die Immunfärbung der Präparate ergab in 12 von 14 Fällen eine signifikant im Tumor verstärkte oder zumindest im Vergleich zum gesunden Gewebe gleichwertig starke Expression von SELENOH (Abb. 18 A). Zwei gesunde Gewebeproben waren stärker als die dazugehörigen Tumore für das Protein angefärbt. Abbildung 18 A zeigt auch exemplarisch für diese Proben die verstärkte Expression von SELENOH im Tumor im Vergleich zu gesundem Gewebe. Zusätzlich dazu wurde exemplarisch Dünndarmgewebe von APC^{min/+}-Mäusen auf die Expression des Proteins untersucht (Abb. 18 B). Die Gewebemorphologie wurde anhand von H&E-Färbungen bewertet (Abb. 18 C). SELENOH war dabei stärker in dysplastischen Bereichen als im umgebenden gesunden Gewebe exprimiert. Es konnte weiterhin eine Kolo-kalisation der SELENOH-Expression mit β -Catenin beobachtet werden (Abb. 18 D).

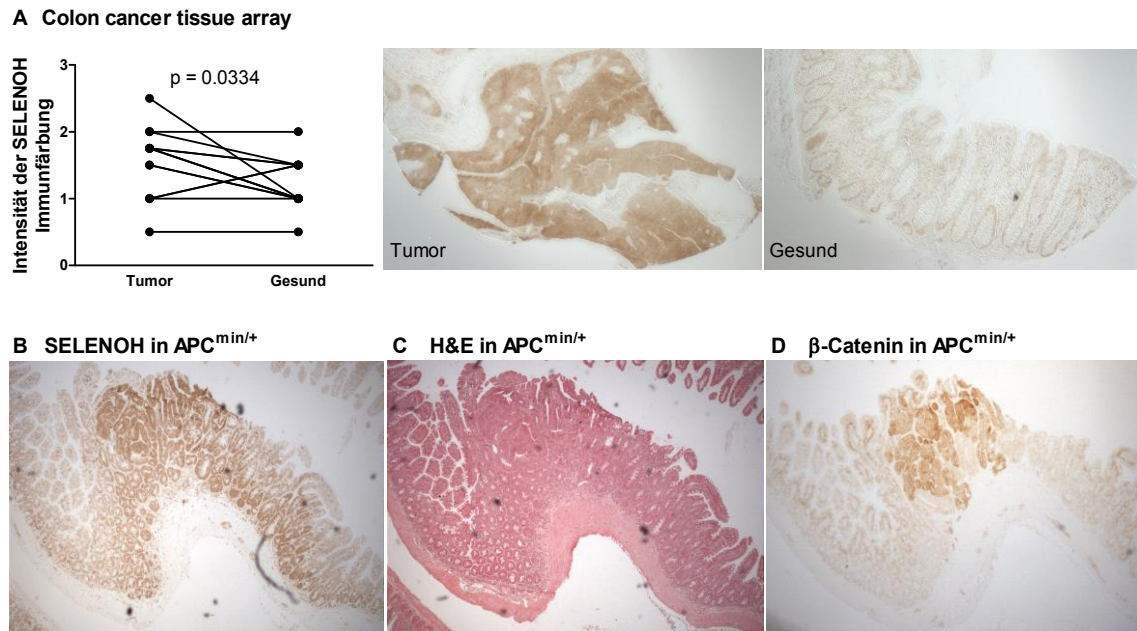


Abbildung 18: Expression von SELENOH in humanen Adenokarzinomen und in präkanzerösen Läsionen von APC^{min/+}-Mäusen.

(A) Ein „Colon cancer tissue array paired with normal tissues“ wurde immunhistologisch für SELENOH angefärbt. Die mikroskopische Auswertung erfolgte anhand einer Punkteskala (n = 14). Aufgrund identischer Bewertung überlappen sich einige Datenpunkte und sind daher nicht als einzelne Einträge sichtbar. Analyse mittels gepaartem Student's t-Test. Dargestellt sind weiterhin repräsentative SELENOH-Färbungen eines Adenokarzinoms sowie des dazugehörigen, gesunden Gewebes aus dem Array. Weiterhin wurden Serienschritte (2 µm) des Dünndarms von APC^{min/+}-Mäusen für (B) SELENOH, (C) H&E und (D) β-Catenin angefärbt. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen.

3.2.2 Effektivität des SELENOH-KDs in Abhängigkeit vom Selenstatus

Nachdem sich eine verstärkte SELENOH-Expression in Tumorgewebe gezeigt hat, sollte eine mögliche Funktion von SELENOH bei CRC genauer untersucht werden. Dazu wurden, analog zum GPX2-KD (siehe 3.1.1), jeweils zwei KD-Klone mittels stabil-transfizierter shRNA in den Darmkrebszelllinien HT29 und Caco2 erzeugt. Die SELENOH-Transkriptlevel reduzierten sich im KD auf weniger als ein Drittel der SCR-Kontrolle (Abb. 19 A+B). Auf Proteinebene war der Effekt des KDs noch ausgeprägter, weniger als 20 % des Proteingehalts des SCR konnten jeweils in Zellen mit SELENOH-KD detektiert werden (Abb. 19 C+D).

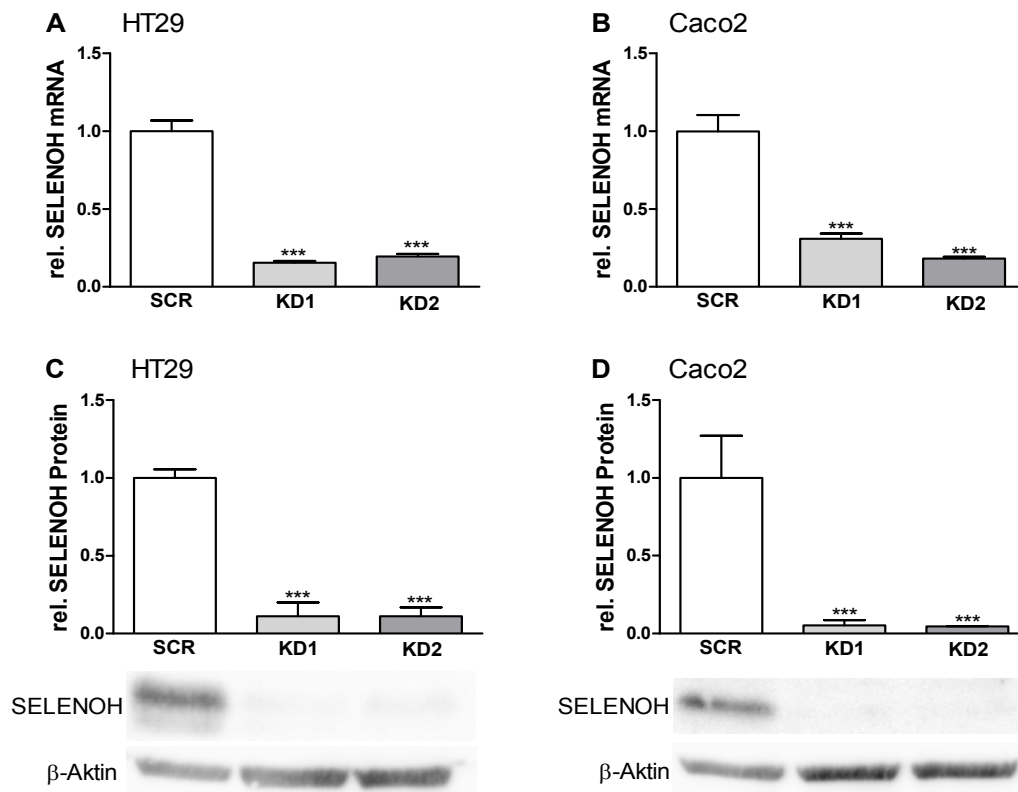


Abbildung 19: SELENOH-Expression im SELENOH-KD von zwei Darmkrebszelllinien.

(A, B) In HT29- und Caco2-Zellen mit shRNA-vermitteltem SELENOH-KD wurde die mRNA-Expression von SELENOH mittels qPCR detektiert und auf einen Referenzfaktor (GAPDH, OAZ1 und RPL13a) normalisiert. (C, D) Der Effekt des SELENOH-KDs wurde auf Proteinebene im Western Blot bestimmt und auf das Referenzprotein β -Aktin normalisiert. Mittelwerte + Standardabweichung (n = 3). ***p<0,001 versus SCR mittels One-Way ANOVA und Bonferroni's Posttest.

3.2.3 Einfluss des SELENOH-KDs auf die Proliferation und Migration von Darmkrebszellen sowie auf die Tumorigenese in der Maus

Zunächst wurde untersucht, wie sich der KD von SELENOH auf die Zellproliferation und -migration auswirkt. Dazu wurde bei der Aussaat ein steriles Metallstäbchen inmitten von HT29-Zellen platziert und nach Erreichen der Konfluenz vorsichtig wieder entfernt. Die Breite der entstandenen Wunde wurde zu Beginn sowie alle 24 h für drei Tage vermessen. Während es bei SCR-Kontrollzellen zu einem Verschluss von etwa 40 % der Wundöffnung nach 72 h kam, verringerte sich in den SELENOH-KD Klonen der Spaltdurchmesser mit 55 % signifikant stärker (Abb. 20 A+B). Der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist in den repräsentativen Bildern zum Versuch ersichtlich (Abb. 20 C).

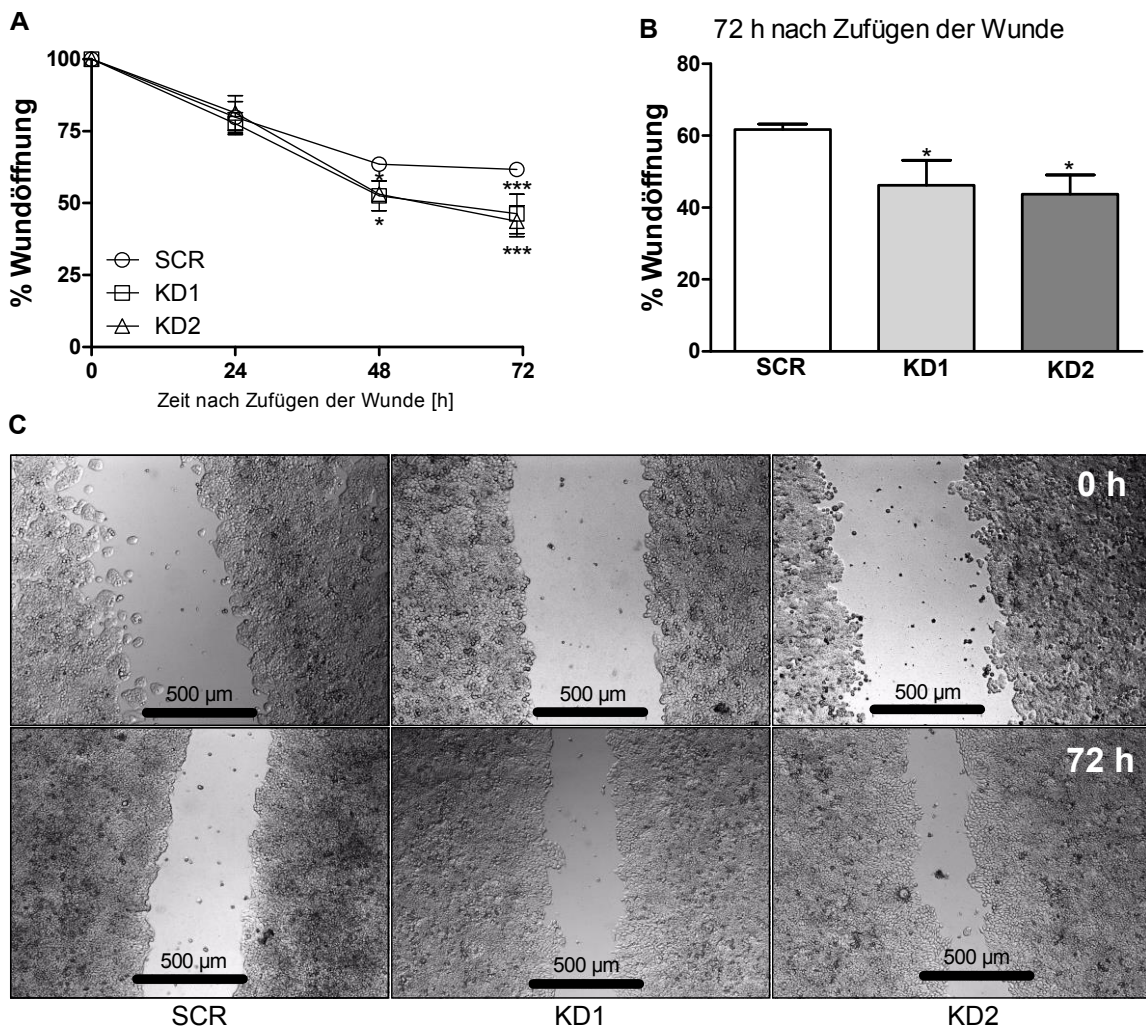


Abbildung 20: Proliferation und Migration des SELENOH-KDs im scratch Assay.

(A, B) HT29-Zellen mit shRNA-vermitteltem SELENOH-KD wuchsen für drei Tage mit 50 nM Selenit bis zum Erreichen der Konfluenz. Dem Zellrasen wurde anschließend eine Wunde zugefügt und der sich verschließende Zellspalt wurde 0, 24, 48 und 72 h danach an jeweils 10 verschiedenen Stellen im Duplikat mikroskopisch vermessen. (C) Dargestellt sind repräsentative Bilder der Zellspalte zum Zeitpunkt 0 und 72 h nach Zufügen der Wunden. Mittelwerte + Standardabweichung (n = 3). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ versus SCR mittels Two-Way (A) oder One-Way ANOVA (B) und Bonferroni's Posttest.

Ein möglicher Einfluss von SELENOH auf das tumorigene Potenzial von Darmkrebszellen wurde nun anhand der Koloniebildung im Soft Agar untersucht. Durch die verankerungsunabhängigen Wachstumsbedingungen wird die *in vivo* Tumorsituation besser als beispielsweise in der adhärennten Zellkultur nachgebildet [212]. Es zeigte sich, dass signifikant mehr Kolonien (HT29: 2,5-3,5x mehr; Caco2: 6,5-7,5x mehr) durch die Klone mit verminderter SELENOH-Expression gebildet wurden (Abb. 21 A). Auch der durchschnittliche Koloniedurchmesser im KD war um mindestens 50% gegenüber der jeweiligen SCR-Kontrolle vergrößert (Abb. 21 B). Interessanterweise bildeten HT29-Zellen fast drei Mal so große Kolonien wie Caco2-Zellen aus.

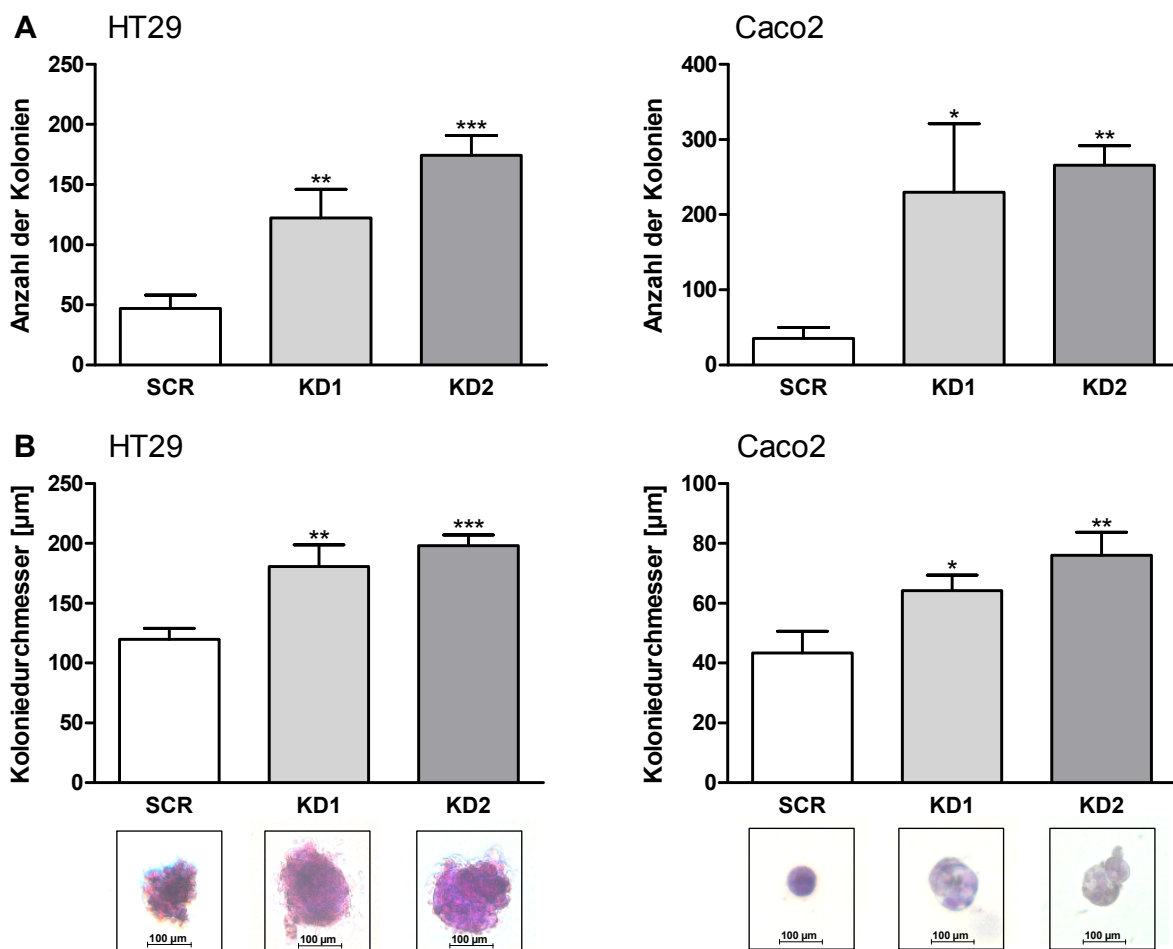


Abbildung 21: Verankerungsunabhängiges Wachstum des SELENOH-KDs im Soft Agar.

HT29- und Caco2-Zellen mit shRNA-vermitteltem SELENOH-KD wuchsen 14 Tage lang mit 50 nM Selenit im Soft Agar und wurden anschließend mit Kristallviolett gefärbt. **(A)** Die Anzahl der Kolonien wurde densitometrisch mithilfe der Bio-Rad Quantity One Software ermittelt. **(B)** Zur Bestimmung der durchschnittlichen Koloniegöße wurden pro Experiment 100 Kolonien jedes Zellklons mikroskopisch vermessen. Repräsentative Bilder zeigen je eine Kolonie des jeweiligen SCR- oder KD-Klons. Mittelwerte + Standardabweichung (n = 3). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 versus SCR mittels One-Way ANOVA und Bonferroni's Posttest.

Sowohl das verankerungsunabhängige Wachstum im Soft Agar als auch die Untersuchungen zur Proliferations- und Migrationsfähigkeit im scratch-Assay liefern generell Hinweise auf das tumorigene Potenzial von Zellen *in vitro*. Da diese Eigenschaften in den bisher durchgeführten Experimenten im SELENOH-KD gegenüber der SCR-Kontrolle verstärkt auftraten, wurde die Untersuchung *in vivo* fortgesetzt. Dazu bekamen männliche Crl:CD1-Foxn1^{nu}-Nacktmäuse HT29 SCR- und SELENOH-KD2-Zellen subkutan in den jeweils rechten oder linken Hinterlauf injiziert. Nach drei Wochen ließen sich für alle Mäuse mit injiziertem SELENOH-KD2 und für sieben von neun SCR-Tieren Xenografts nachweisen. In sechs Fällen waren die aus den KD2-Zellen gewachsenen Tumore um mehr als 50 %

schwerer als die aus SCR-Zellen gewachsenen Exemplare (Abb. 22 A). Bei zwei Mäusen war das Tumorgewicht vergleichbar zwischen SCR-Kontrolle und KD2.

Ein Tumor aus SCR-Zellen war dagegen schwerer als das Vergleichsobjekt aus dem KD2. In den Tumoren mit SELENOH-KD2 waren weiterhin signifikant niedrigere SELENOH-Proteinlevel im Vergleich zum SCR detektierbar (Abb. 22 B).

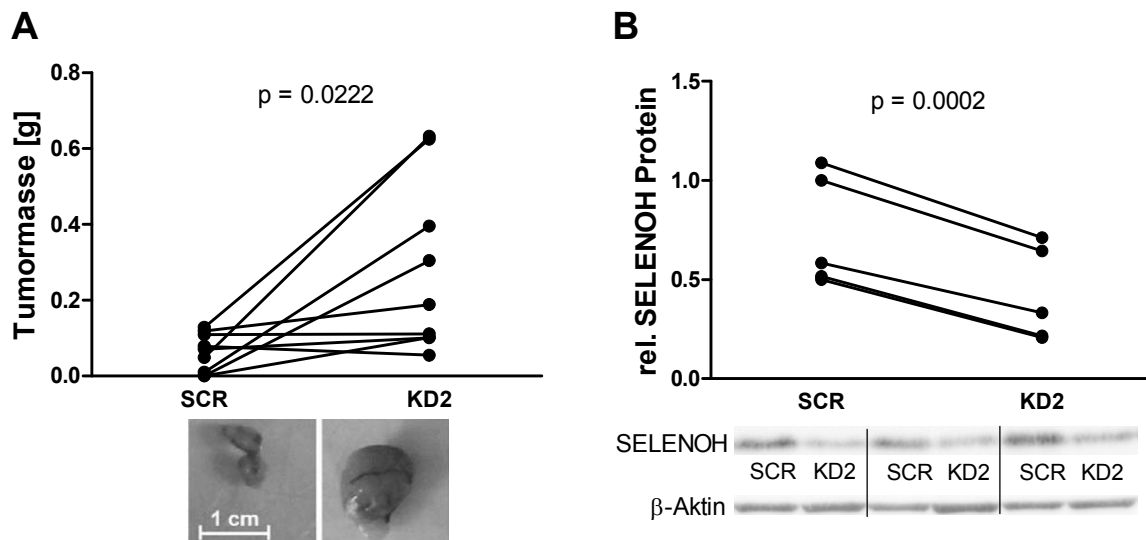


Abbildung 22: Der SELENOH-KD im Nacktmausversuch.

Männlichen Nacktmäusen wurden SCR oder SELENOH-KD2 HT29-Zellen subkutan in die Hinterläufe injiziert. Die Tiere wurden vier Wochen später getötet und die gebildeten Tumore wurden entnommen und gewogen. **(A)** Gezeigt sind die ermittelten Tumormassen ($n = 9$) und repräsentative Tumore. **(B)** Die SELENOH-Proteinexpression wurde mittels Western Blot detektiert ($n = 5$) und auf das Referenzprotein β -Aktin normalisiert. Dargestellt sind repräsentative Blotbilder. Alle Analysen mittels gepaartem Student's t-Test.

Zusammenfassend zeigten die bisherigen Untersuchungen eine starke Expression von SELENOH in humanen Adenokarzinomen des Kolons sowie in präkanzerösem Gewebe von APC^{min/+}-Mäusen. Das Fehlen des Selenoproteins erhöhte weiterhin das tumorigene Potenzial von Darmkrebszellen *in vitro* und *in vivo*.

3.2.4 Regulation des Zellzyklus im SELENOH-KD

Eine abnormale Zellproliferation hängt häufig mit einer Deregulation des Zellzyklus zusammen [213]. Um zu prüfen, ob sich Kontroll- und KD-Zellen hinsichtlich ihrer Zellzyklusregulation unterscheiden, wurde im HT29-Modell eine G₀/G₁-Synchronisierung mittels Serumentzug hervorgerufen [214]. Nach erneuter Serumsupplementation erfolgte die Analyse der Zellverteilung in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen mittels Durchfluszytometrie. Zum Zeitpunkt 0 h (am Ende des Serumentzugs) befand sich mit etwa 70 % ein Großteil der Zellen aller drei Klone in der G₀/G₁-Phase (Abb. 23 A). Sechs Stunden nach erneuter Serumgabe war kein Unterschied in der Zellverteilung zum Zeitpunkt 0 h messbar (Abb. 23 B). Ein Tag nach Beginn des Experiments konnte ein signifikant höherer

Anteil an KD-Zellen in der S-Phase gefunden werden (Abb. 23 C). Diese Verschiebung der Zellpopulationen war auch nach 48 h noch im KD1 signifikant, im KD2 tendenziell erkennbar. Zudem kam es zu diesem Zeitpunkt in der G_0/G_1 -Phase zu einer signifikanten Verringerung des Anteils an KD-, nicht aber SCR-Zellen (Abb. 23 D).

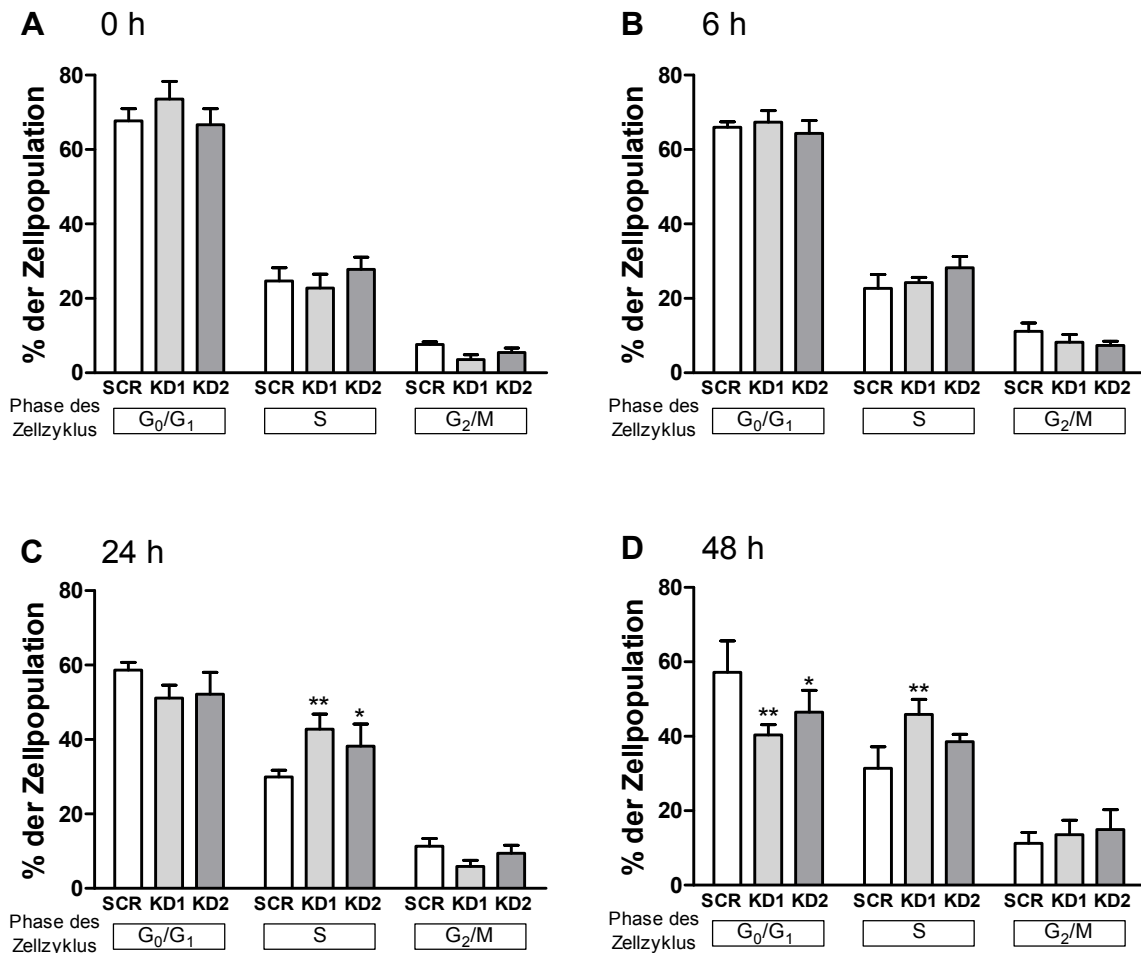


Abbildung 23: Zellverteilung des SELENOH-KD während der Phasen des Zellzyklus.

HT29-Zellen mit shRNA-vermitteltem SELENOH-KD wurden nach drei Tagen Wachstum mit 50 nM Selenit mittels 48-stündigem Serumentzug in der G_0/G_1 -Phase synchronisiert. Ein Wiedereintritt in den Zellzyklus wurde durch Gabe von FCS-haltigem Serum für (A) 0 h, (B) 6 h, (C) 24 h oder (D) 48 h induziert. Die geernteten Zellen wurden anschließend fixiert, mit Propidiumiodid inkubiert und auf ihre Verteilung in den verschiedenen Zellzyklusphasen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Mittelwerte + Standardabweichung (n = 3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ versus jeweiligem SCR mittels Two-Way ANOVA und Bonferroni's Posttest.

Die Analyse von Zellzyklusmarkern sollte anschließend Aussagen über die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Zellzyklusdysregulation ermöglichen. Für p21, auch bekannt als Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase 1, zeigte sich im Western Blot in beiden KD-Klonen eine schneller eintretende Verringerung des Proteingehalts über den Verlauf der Zeit, wobei dieser Effekt im KD2 stärker ausgeprägt war (Abb. 24 A). Für Cyclin E1 (CCNE1) konnte 6 h nach erneuter Serumgabe eine stärkere Induktion der mRNA-Expression in den SELENOH-KDs im Vergleich zum SCR gemessen werden (Abb. 24 B).

Die Transkripte weiterer untersuchte Cycline (CCNA2, CCNB1, CCNB2, CCND1) und Cyclin-abhängiger Kinasen (CDK1, CDK2, CDK4, CDK6) waren dagegen nicht im SELENOH-KD beeinflusst und wurden daher nicht gezeigt.

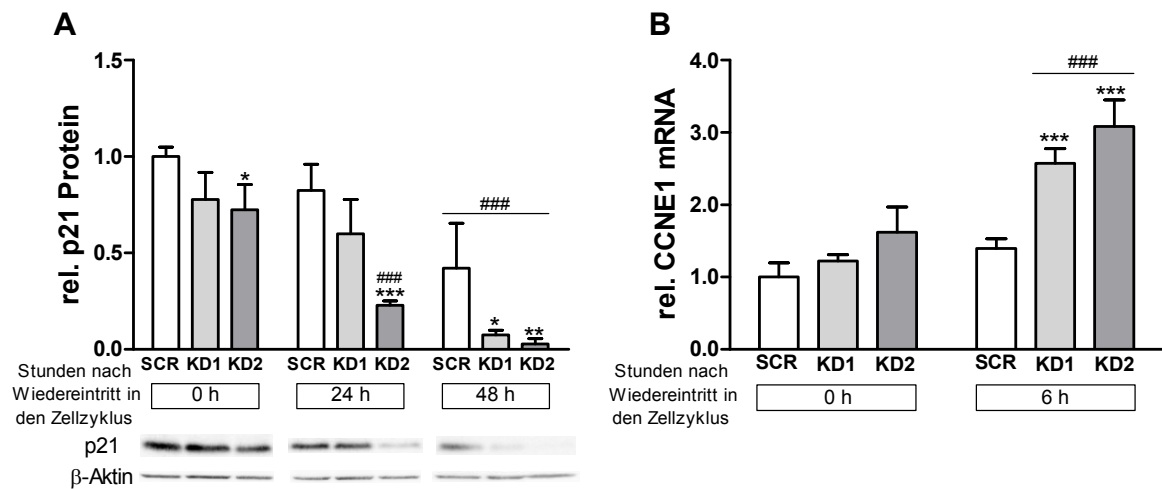


Abbildung 24: Expression von Zellzyklusmarkern im SELENOH-KD.

HT29-Zellen mit shRNA-vermitteltem SELENOH-KD wurden nach drei Tagen Wachstum mit 50 nM Selenit mittels 48-stündigem Serumentzug in der G₀/G₁-Phase synchronisiert. Ein Wiedereintritt in den Zellzyklus wurde durch Gabe von FCS-haltigem Serum induziert. **(A)** Die p21-Proteinexpression wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Serumgabe mittels Western Blot detektiert und auf das Referenzprotein β -Aktin normalisiert. **(B)** Die mRNA-Expression von CCNE1 wurde mittels qPCR detektiert und auf einen Referenzfaktor (GAPDH, OAZ1 und RPL13a) normalisiert. Mittelwerte + Standardabweichung (n = 3). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 versus SCR des jeweiligen Zeitpunktes; ####p<0,001 versus entsprechendem Klon bei 0 h mittels Two-Way ANOVA und Bonferroni's Posttest.

3.2.5 Die Rolle von SELENOH in der Zelldifferenzierung

Von p21 ist neben seiner Rolle im Zellzyklus auch ein Mitwirken an der Differenzierung von Enterozyten bekannt [215]. Ein möglicher Einfluss von SELENOH auf den Differenzierungsprozess wurde daher weitergehend an den zwei Darmkrebszelllinien HT29 und Caco2 untersucht. Beide Linien besitzen neben Ihrem Modellcharakter für das humane Darmepithel auch eine gut beschriebene Differenzierungsfähigkeit [216]. In HT29-Zellen wurde in dieser Arbeit eine Zelldifferenzierung mittels Butyrat-Behandlung induziert. Caco2-Zellen hingegen differenzierten ohne zusätzliche Stimulation nach Erreichen der Konfluenz.

Die Effizienz der Differenzierung wurde einerseits anhand der Expression des intestinalen Stammzellmarkers LGR5 überprüft. Dessen mRNA-Transkriptgehalt war sowohl im HT29-Modell nach eintägiger Inkubation mit 4 mM Butyrat als auch in Caco2-Zellen nach sieben und 14 Tagen post-konfluenten Wachstums in allen Klonen stark vermindert (Abb. 25 A+B). In beiden Zelllinien zeigten die SELENOH-KDs basal weiterhin eine signifikant gesteigerte LGR5-Expression gegenüber den jeweiligen SCR-Kontrollen, wogegen diese Unterschiede nach der Zelldifferenzierung verschwanden.

Neben LGR5 wurde die Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) als etablierter Marker für die Differenzierung von Enterozyten herangezogen [217, 218]. Die Behandlung von HT29-Zellen mit Butyrat und auch das post-konfluente Wachstum im Caco2-Modell sorgten in allen Klonen für einen graduellen Anstieg der ALP-Aktivität (Abb. 25 C+D). Interessanterweise war die durch die Differenzierung induzierte Hochregulation der ALP im SELENOH-KD zwei und drei Tage nach Butyratgabe (HT29) sowie sieben und 14 Tage nach Erreichen der Konfluenz (Caco2) im Vergleich zur SCR signifikant vermindert. Das bereits im Zuge der Zellzyklusanalyse untersuchte p21 (siehe 3.2.4) wurde ebenfalls im Western Blot vor und nach Induktion der Differenzierung analysiert. In unbehandelten Zellen konnten in keinem der beiden Kulturmodelle Unterschiede zwischen den verschiedenen Klonen detektiert werden. Ursächlich dafür war vermutlich die sehr geringe basale Proteinexpression. Nach Induktion der Differenzierung kam es in allen Klonen zu einer starken p21-Hochregulation. Ähnlich wie bei der ALP war der Expressionsanstieg von p21 in den KDs beider Zelllinien jedoch signifikant gegenüber dem SCR geringer (Abb. 25 E+F).

Diese Ergebnisse deuten daraufhin hin, dass ein KD von SELENOH möglicherweise die Differenzierungsfähigkeit von kolorektalen Tumorzellen beeinflusst. Nun sollte geprüft werden, ob SELENOH selbst ebenfalls durch den Differenzierungsprozess reguliert wird und ob dieser Prozess von der Selenzufuhr abhängig ist. Dazu wurden unbehandelte sowie differenzierte SCR-Kontrollen der HT29- und Caco2-Zellen untersucht. Ohne Selensupplementation zeigte sich in beiden Zelllinien eine differenzierungsbedingte Verringerung von SELENOH auf mRNA-Ebene, nicht jedoch im Proteingehalt (Abb. 26 A-D). In selen-supplementierten Zellen war dagegen sowohl die Menge an SELENOH-mRNA als auch -Protein im Zuge der Differenzierung signifikant geringer.

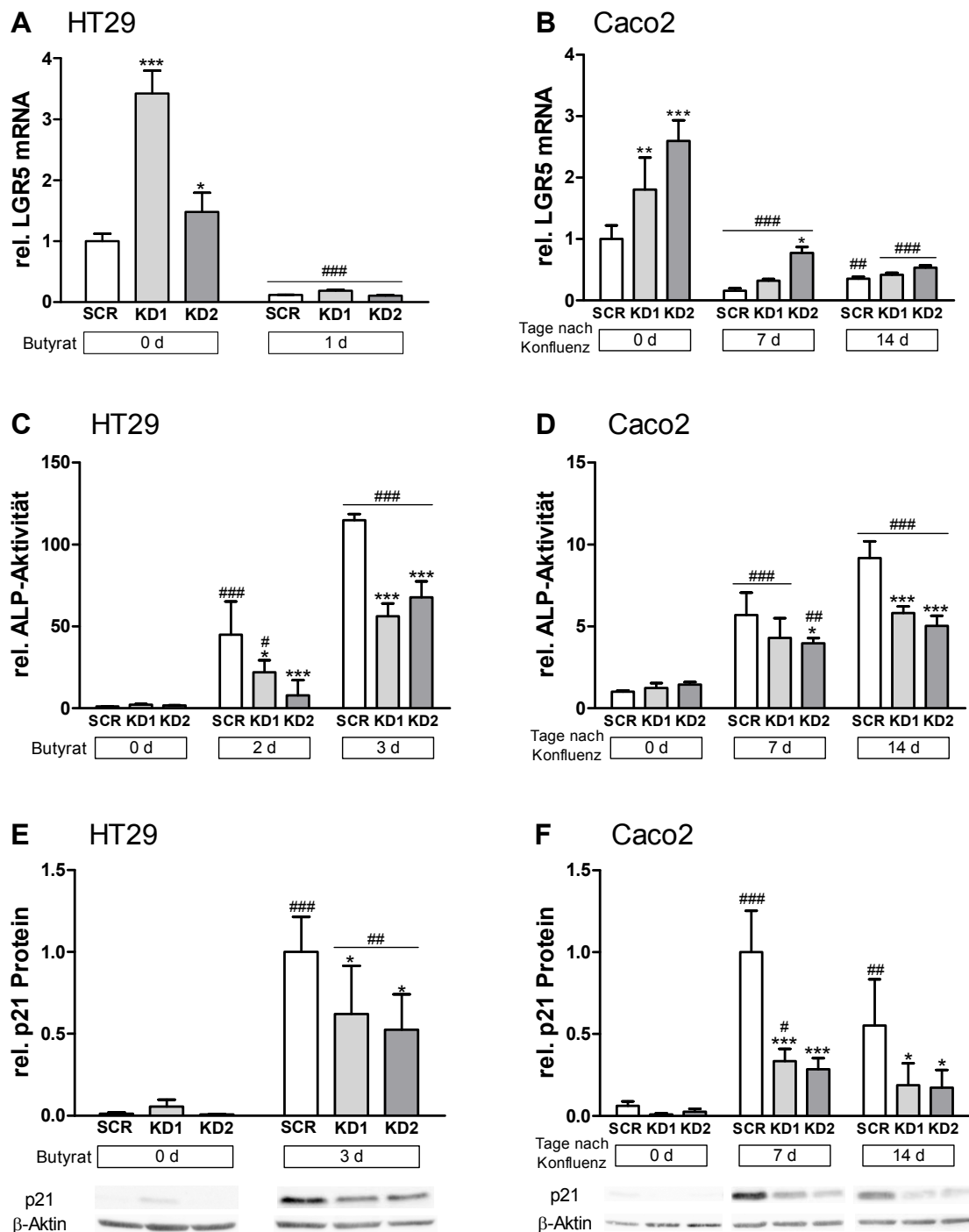


Abbildung 25: Expression von Differenzierungsmarkern im SELENOH-KD.

HT29-Zellen mit shRNA-vermitteltem SELENOH-KD wurden drei Tage nach der Aussaat für die angegebene Anzahl an Tagen mit 4 mM Butyrat behandelt und erhielten die gesamte Versuchsdauer über 50 nM Selenit. Caco2-KD-Zellen wurden direkt nach dem Erreichen der Konfluenz (0 Tage) oder 7 bzw. 14 Tage danach geerntet. Die Gabe von 50 nM Selenit erfolgte jeweils für die letzten drei Tage vor der Zellernte. **(A, B)** Die mRNA-Expression von LGR5 wurde mittels qPCR detektiert und auf einen Referenzfaktor (GAPDH, OAZ1 und RPL13a) normalisiert. **(C, D)** Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde photometrisch gemessen und auf den Proteingehalt der Zellen bezogen. **(E, F)** Die p21-Proteinexpression wurde mittels Western Blot detektiert und auf das Referenzprotein β -Aktin normalisiert. Mittelwerte + Standardabweichung (n = 3). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 versus SCR; #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 versus entsprechendem Klon bei 0 d mittels Two-Way ANOVA und Bonferroni's Posttest.

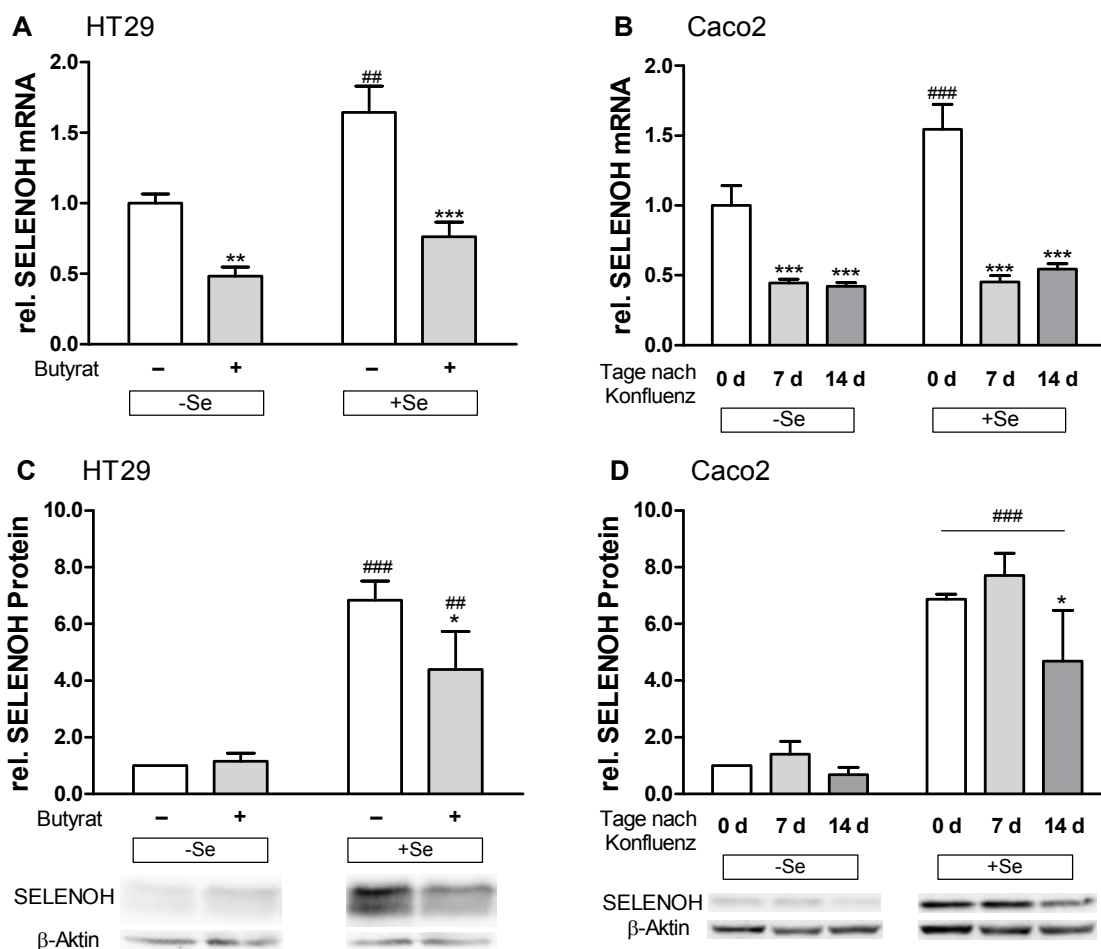


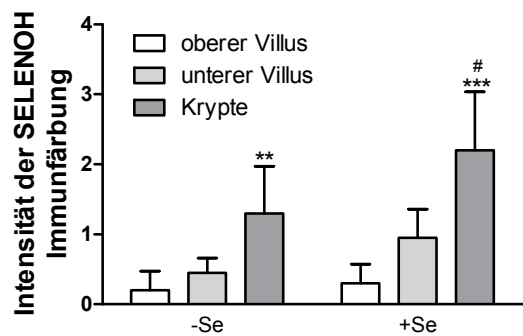
Abbildung 26: SELENOH-Expression während der Differenzierung von Darmkrebszelllinien.

Ohne (-Se) bzw. mit Selen (+Se) versorgte HT29-Zellen wurden für 1 Tag (mRNA) bzw. 7 Tage (Protein) ohne (-) bzw. mit 4 mM Butyrat (+) behandelt, während Caco2-Zellen 0, 7 oder 14 Tage lang nach Erreichen der Konfluenz wuchsen. Die Versorgung der Zellen mit 50 nM (HT29) bzw. 100 nM Selenit (Caco2) fand dabei über die gesamte Dauer des Versuchs statt. In den Zellen wurde anschließend die (A, B) SELENOH-mRNA mittels qPCR gemessen und auf einen Referenzfaktor (GAPDH, OAZ1 und RPL13a) normalisiert. (C, D) Die SELENOH-Proteinexpression wurde mittels Western Blot detektiert und auf das Referenzprotein β -Aktin normalisiert. Mittelwerte + Standardabweichung (n = 3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus -Butyrat bzw. 0 d; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ versus jeweiligem Klon bei -Se mittels Two-Way ANOVA und Bonferroni's Posttest.

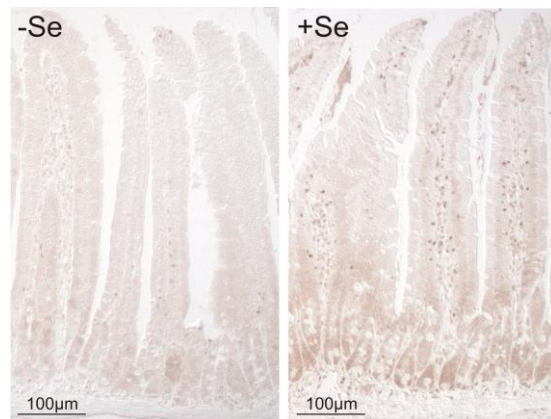
Die untersuchten *in vitro* Modelle zeigten eine deutliche Abhängigkeit der SELENOH-Expression vom Differenzierungsstatus sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Ob diese Beobachtung auch *in vivo* zutrifft, sollten Untersuchungen am Darm von Mäusen mit marginal selen-defizienter (-Se) oder selen-adäquater (+Se) Fütterung zeigen. Dazu wurde das Protein immunhistochemisch in Gewebeschnitten des distalen Jejunums nachgewiesen. Dabei war für beide Diäten eine signifikant stärkere Färbung für SELENOH in der Kryptenregion nachweisbar (Abb. 27 A+B). Dieses im Dünndarm beobachtete Expressionsmuster konnte auch für das distale Kolon bestätigt werden.

Während marginal selendefiziente Mäuse hier generell kein SELENOH aufwiesen, war die Expression des Proteins im Kryptengrund bei +Se-Mäusen signifikant höher als an der Kryptenspitze (Abb. 27 C+D).

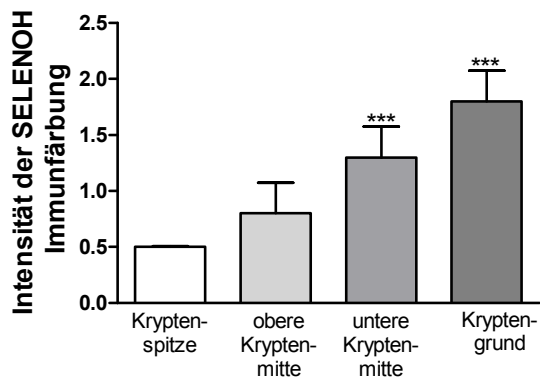
A Distales Jejunum



B Distales Jejunum



C Kolon (+Se)



D Kolon

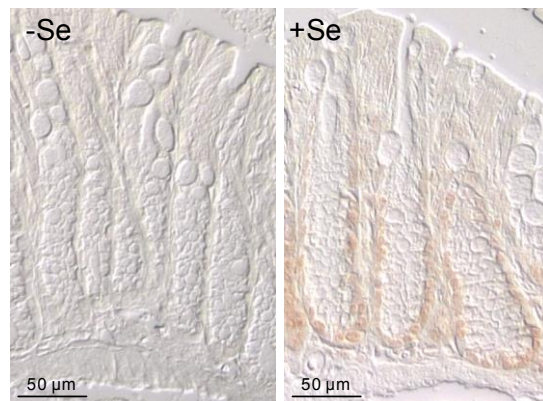


Abbildung 27: Expression von SELENOH im murinen Dün- und Dickdarm.

Schnitte aus dem **(A+B)** distalen Jejunum und **(C+D)** dem distalen Kolon marginal-defizienter (-Se) und adäquat (+Se) mit Selen versorgter Wildtyp-Mäuse wurden immunhistologisch für SELENOH angefärbt. Die mikroskopische Auswertung erfolgte anhand einer Punkteskala. Mittelwerte + Standardabweichung (n = 5); **p<0,01; ***p<0,001 versus oberer Villus (A) bzw. Kryptenspitze (C); #p<0,05 versus -Se mittels Two-Way (A) oder One-Way ANOVA (C) und Bonferroni's Posttest. Dargestellt sind zwei repräsentative SELENOH-Färbungen.

4. Diskussion

4.1 Die Glutathionperoxiden 1 und 2

Im Dickdarm ist das Risiko einer Krebsentstehung insbesondere durch die kontinuierliche Erneuerung des Epithels im Zuge der Proliferation von Stammzellen erhöht [219]. Eine Fehlregulation der Balance zwischen stark proliferierenden und hochdifferenzierten Zellen entlang der Krypten kann dabei zu Hyperplasien, gutartigen Polypen oder schlimmstenfalls bösartigen Tumoren führen [220]. Selen wird eine schützende Rolle bei der Entstehung von Krebs zugesprochen [26]. Protektive Wirkungen des Spurenelements vermitteln dabei vor allem Selenoproteine [221]. Aus früheren Untersuchungen ist eine Expression diverser Selenoproteine in verschiedenen Bereichen des menschlichen und tierischen Verdauungstrakts sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene bekannt [222, 223]. Der GPX2 wird aufgrund ihres vom Kryptengrund zu den oberen Kryptenregionen abnehmenden Expressionsmusters eine besondere Rolle bei CRC nachgesagt [141]. Das Protein zeigt dabei in Abhängigkeit von der Art und Phase der Karzinogenese entweder pro- oder antitumorigene Eigenschaften [224]. Allen bisherigen Untersuchungen gemein ist die hohe Expression der GPX2 in transformierten Zellen, sei es in kolorektalen Adenomen und Karzinomen [152, 225] oder in anderen nicht-intestinalen Tumoren epithelialer Herkunft (zusammengefasst in [102]).

4.1.1 Keine Beeinflussung weiterer Isoformen durch den GPX1- oder GPX2-KD

Der mögliche Einfluss der GPX2 auf die kolorektale Karzinogenese wurde in dieser Arbeit anhand stabil-transfizierter KD-Klone des Proteins in HT29-Zellen untersucht. Da die GPX2 in Bezug auf Sequenzhomologie und Substratspektrum stark der GPX1 ähnelt, kam in den meisten Untersuchungen auch ein HT29-Zellklon mit GPX1-KD zum Einsatz, um spezifische Effekte der jeweiligen Isoform im direkten Vergleich untersuchen zu können. Im Zuge der Charakterisierung dieser transfizierten Zellen konnte zunächst, unabhängig vom Selenstatus der Zellen, eine signifikante Verringerung der Proteinexpression der GPX2 in den GPX2-KDs sowie der GPX1 im GPX1-KD nachgewiesen werden (Abb. 5 A+B). Die Ergebnisse bestätigten die hohe Effizienz des KD-Systems, wie sie bereits aus früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe bekannt war [226]. Weiterhin wurde kein Einfluss des GPX1- bzw. GPX2-KDs auf die Proteinexpression anderer untersuchter GPX-Isoformen festgestellt.

Während der in diesen Experimenten verwendete GPX1-KD bisher kaum anderweitig charakterisiert wurde, wiesen auch Caco2-Zellen mit siRNA-vermitteltem GPX1-KD keine Beeinflussung der GPX2- und GPX4-Expression auf [227]. Da die GPX2-KD-Klone der Arbeitsgruppe bereits länger zur Verfügung standen, konnten Banning et al. schon früher in diesen Zellen feststellen, dass die Herunterregulation der GPX2 die Expression von GPX1-mRNA und -Protein nicht beeinflusst [150]. Intestinale Zellen von GPX2-KO-Mäusen waren

dagegen durch eine erhöhte GPX1-Expression und erhöhte Gesamt-GPX-Aktivität sowie durch eine Lokalisation der GPX1 hin zum Kryptengrund gekennzeichnet [228]. Diese kompensatorische Regulation findet auf Translationsebene statt und konnte in keinem der Experimente mit den KD-Zellen beobachtet werden. Ein GPX1-KO in Mäusen hatte weiterhin keine veränderten Transkriptmengen und Enzymaktivitäten von GPX3 und GPX4 zur Folge [229]. Die typischerweise im Plasma zu findende GPX3 konnte nicht detektiert werden. Auf die Analyse der GPX6 wurde verzichtet, da für diese Isoform bisher nur eine Expression im Embryo sowie im adulten, olfaktorischen Epithel beschrieben ist [158]. Die GPX5, GPX7 und GPX8 wurden ebenfalls nicht untersucht, da sie aufgrund des Cys im katalytischen Zentrum keine Selenoproteine darstellen.

Obwohl die Detektion von GPX-Isoformen mittels Western Blot allgemein als zuverlässig gilt, entspricht der Proteingehalt nicht immer der Menge an aktivem Enzym [174]. Daher wurde die Gesamt-GPX-Aktivität der in dieser Arbeit verwendeten GPX1- und GPX2-KD-Zellen gegenüber verschiedenen Substraten auch im Rahmen einer Bachelorarbeit innerhalb der Arbeitsgruppe überprüft. Es konnte eine entsprechende Verringerung der Aktivitäten in den jeweiligen KDs, vergleichbar mit den Ergebnissen des Western Blots, bestätigt werden [230]. Daher war davon auszugehen, dass die KDs keinen Einfluss auf andere GPX-Isoformen hatten und daher als geeignetes Testsystem für die durchgeführten Untersuchungen angesehen werden konnten.

4.1.2 Spezifische Effekte der GPX-KDs auf das zelluläre Wachstumsverhalten

Die folgende Analyse der beiden KD-Linien mittels PCR-Array ergab eine Regulation von 18 der 84 untersuchten Gene verschiedener Signaltransduktionswege (Abb. 6 A+B). Die betreffenden Gene sind vor allem relevant in Signalwegen des (Tumor-)Zellwachstums. Generell zu beachten ist jedoch, dass ein Teil der untersuchten Gene für Proteinkinasen kodieren. Eine mögliche post-translationale Regulation wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht untersucht. Acht der regulierten Gene lassen sich dem ERK-Signalweg zuordnen. MAP-Kinasen dieser Familie wurden als wichtige Faktoren in der Kontrolle von Proliferation, Differenzierung und dem Überleben von Zellen beschrieben und sind häufig in humanen Tumoren hochreguliert [231]. Sieben der ERK-zugeordneten Gene könnten möglicherweise mit PEDF interagieren. Dieser bei der Differenzierung von Retinastammzellen wichtige Faktor [232] ist für seine stark antiangiogenetische und antitumorigene Aktivität bekannt [233]. Eine Überlappung der Signalwege von ERK und PEDF ist naheliegend, antagonistische Interaktionen in beispielsweise Brustkrebszellen wurden bereits beschrieben [234]. Weiterhin sind vier der ERK- und PEDF-zugeordneten Gene im Signalling von G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren (GPCRs) involviert. GPCRs stellen mit über 800 Mitgliedern die größte Gruppe an Zelloberflächenmolekülen dar und werden in verschiedenen Krebsarten überexprimiert. Zumeist geht eine Aktivierung dabei mit

einem gesteigerten Tumorwachstum einher [235]. Auch für PAK, zu deren Signalwegen sieben der in den KDs regulierten Gene gezählt werden, wurde eine erhöhte Expression in verschiedenen Krebsarten mit positiver Korrelation in Bezug auf die Progression sowie die Sterbewahrscheinlichkeit beschrieben [236]. Vermutlich fördern diese Kinasen dabei die Autonomie, Metastasierung und das Überleben von Krebszellen. Die Rolle des TNF-Signallings im Krebsgeschehen ist weniger eindeutig als die von beispielsweise ERK und PAK, da sowohl pro- als auch antitumorigene Effekte dieses bei der Entzündung und Apoptose relevanten Signalwegs bekannt sind [237].

Einen ersten Hinweis auf ein möglicherweise verändertes Zellwachstum bei Fehlen der GPX2 gab die Messung der Zellproliferation mittels Neutralrot-Assay. Hierbei waren nach sechs Tagen in Kultur signifikant weniger lebende Zellen vorhanden und somit eine verringerte Proliferation des GPX2-KDs nachweisbar (Abb. 7 A). Da dies auch auf die Zellen mit fehlender GPX1 zutraf, könnten die im PCR-Array in beiden KDs gleichermaßen regulierten Gene eine Rolle spielen. Die CA9 beispielsweise spielt eine wichtige Rolle beim Aufrechterhalten des zellulären Säure-Basen-Haushalts, da sie bei physiologischem pH-Wert Bicarbonat aus Kohlenstoffdioxid bildet [238]. Diese Funktion ist auch für Krebszellen relevant, da diese aufgrund ihres anaerob glykolytischen Stoffwechsels und unzureichender vaskulärer Versorgung häufig in einem sauren extrazellulären Milieu wachsen müssen [239]. Zudem förderte das Protein unabhängig von der Regulierung des pH-Werts die Krebszellmigration durch Destabilisierung der Zell-Zell-Kontakte [240, 241]. Dementsprechend wiesen eine Vielzahl von Tumoren eine ektopische CA9-Expression auf, obwohl das Enzym im gesunden Gewebe fast ausschließlich im Epithel des GITs exprimiert wird [242]. In Patienten mit Gebärmutterhals-, Brust-, Lungen-, Gehirn- und Rektaltumoren war eine hohe CA9-Expression zudem mit einem schlechten klinischen Outcome assoziiert. [243–247]. Die gegenüber dem SCR erniedrigte CA9-Expression in beiden KDs könnte daher die Ursache für die geringere Proliferation dieser Zellen sein, ähnlich wie es für die Hemmung der enzymatischen CA9-Aktivität in Zervix- und Nierenkrebszellen bereits gezeigt wurde [248]. Das geringere Wachstumspotenzial der beiden KD-Linien könnte aber ebenso auf die herunterregulierte Expression von JAG1 oder VEGFA zurückzuführen sein. KDs eben dieser Proteine hatten in verschiedenen Darmkrebszellen eine verringerte Proliferation und Invasivität zur Folge [249, 250]. Die im Vergleich zur Kontrolle reduzierte Zellzahl des GPX2-KDs im NRU-Assay könnte aber auch durch eine verstärkte Apoptose bedingt sein, wie sie aus Untersuchungen im Darm von GPX2-KO-Mäusen bekannt ist [228]. GPX1-KO-Mäuse wiesen, zumindest unter bestimmten Stressbedingungen, ebenfalls einen Anstieg der Apoptoserate in verschiedenen Geweben auf [251, 252]. Die geringe ALP-Aktivität nach Butyratbehandlung im GPX1- bzw. GPX2-KD deutet weiterhin auf einen geringeren Differenzierungsstatus dieser Zellen hin (Abb. 7 B), vergleichbar mit früheren Befunden in

Spheroïden von CRC-Patienten [156]. Eine erhöhte Genexpression verschiedener Differenzierungsmarker inklusive der ALP und damit ein stärker differenzierter Phänotyp wurde in Caco2-Zellen auch schon infolge der Unterbrechung des β -Catenin-Signalwegs nachgewiesen [253]. Interessanterweise aktiviert β -Catenin auch den GPX2-Promotor [142]. Bis zu 80 % aller sporadischen CRC-Fälle weisen eine Mutation im APC-Gen und dadurch bedingt eine verstärkte β -Catenin-Aktivierung auf [254]. Eine damit potenziell einhergehende verstärkte GPX2-Expression kann daher Krebszellen effektiver vor oxidationsbedingter Apoptose schützen und das Tumorstadium fördern [156]. Der Proliferationsmarker PCNA war in den KD-Klonen dagegen nicht oder nur geringfügig verringert exprimiert im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 8 A+9 A). Da sich auch die mRNA-Level von Ki-67 nicht zwischen den verschiedenen Klonen unterschieden (Daten nicht gezeigt), scheint der Proliferationsstatus der HT29-Zellen mit GPX1- bzw. GPX2-KD nicht beeinflusst zu sein. Die DPP4, welche laut Darmoul et al. akkurat den Differenzierungsstatus von HT29- und Caco2-Zellen widerspiegelt [181], bestätigte wiederum das Ergebnis der ALP-Messung. Sowohl in Zellen mit und ohne differenzierende Butyratbehandlung (Abb. 8 B) als auch im Spheroïdmodell (Abb. 9 B) war in allen KD-Klonen weniger Transkript nachweisbar. Welche Rolle die DPP4 tatsächlich in der Tumorbiologie spielt, ist zumindest für CRC bisher ungeklärt [255]. Neuerdings wird eine erhöhte DPP4-Expression mit klinisch-pathologischen Faktoren wie einem fortgeschrittenen Tumorstadium assoziiert und die plasmatische Enzymaktivität gilt als unabhängiger prognostischer Faktor für die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit [256, 257]. Zudem scheint die DPP4 ein wichtiger Marker für bestimmte kolorektale Krebsstammzellen (CSCs; engl.: *cancer stem cells*) zu sein, die Metastasen bilden können [258]. Deren Vorläufer, die intestinalen Stammzellen, werden durch ihr großes Transformationspotenzial als einer der Ausgangspunkte für die kolorektale Karzinogenese diskutiert [259]. Mit LGR5 und ASCL2 wurden in den letzten Jahren zwei gut charakterisierte Marker für intestinale Stammzellen etabliert [260]. Die LGR5-Expression war, mit Ausnahme des GPX1-KDs im Spheroïdmodell, in den KDs verglichen zur Kontrolle tendenziell erniedrigt (Abb. 8 C+9 C). In beiden Modellen war weiterhin signifikant weniger ASCL2 bei Fehlen der GPX1 bzw. GPX2 messbar (Abb. 8 D+9 D). In *in vitro* Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen reduzierte ein KD von LGR5 wie auch ASCL2 die Fähigkeit von HT29-Zellen zur Proliferation, Migration und Koloniebildung [185, 261]. Die geringere Expression dieser beiden Marker in den KD-Klonen deutet daher auf deren geringere Tumorigenität hin. Wichtige Mediatoren bei der Erlangung von CSC-typischen Eigenschaften sind EMT-Transkriptionsfaktoren wie die ZEB-Proteine. So geht zum Beispiel die erhöhte Migrationsfähigkeit von Zellen mit einer gesteigerten ZEB1-Expression einher [262]. Neben dem Klon mit GPX1-KD wies auch der GPX2-KD vermehrt ZEB1-Transkript verglichen mit dem SCR auf (Abb. 8 E+9 E). Passend dazu sorgte das Fehlen der GPX2 in früheren Experimenten für eine stärkere Migration im scratch-Assay.

Dieses Phänomen wurde mit dem erhöhten Aufkommen an Hydroperoxiden, einer damit einhergehenden Steigerung der COX2-Aktivität und der folglich erhöhten PGE₂-Produktion begründet [150]. Mechanistisch wäre daher denkbar, dass die im GPX2-KD erhöhte COX2 mittels PGE₂ zur ZEB1-Transkription führt, wie es bereits ähnlich in Lungenkrebszellen beobachtet wurde [263]. Eine weitere Ursache für die hohe Migrationsfähigkeit von HT29-Zellen mit GPX2-KD könnte die hier nachgewiesene erniedrigte Expression von CDH3 sein (Abb. 8 F+9 F). Ein KD dieses Proteins in der gleichen Zelllinie hatte den Abbau von Zell-Zell-Verbindungen zur Folge und führte auf lange Sicht zu einem invasiven Phänotyp [264]. Da der GPX1-KD das gleiche Expressionsmuster der untersuchten Marker wie die GPX2-KD-Klone zeigte, kann von einem ähnlichen Mechanismus ausgegangen werden, der vermutlich die Reduktion von Hydroperoxiden durch beide Isoformen umfasst. Weitergehende Untersuchungen dazu stehen jedoch noch aus.

4.1.3 Mögliche Interaktionen der GPX1 und GPX2 mit dem NFκB-Signalweg

Anhand des PCR-Arrays fanden sich mehrere im GPX1- und GPX2-KD-regulierte Gene, die dem NFκB-nahen TNF-Signalweg zuzuordnen sind. Eine Ursache für die beobachtete Erhöhung der SERPINE1-Synthese im basalen Zustand (Abb. 10 A) könnte beispielsweise eine in den GPX1- und GPX2-KDs erhöhte H₂O₂-Konzentration und dadurch bedingte NFκB-Aktivierung sein. Aus Studien mit Endothelzellen ist bekannt, dass die SERPINE1-Expression abhängig von redox-regulierten Mechanismen ist [265, 266]. Das Protein gehört zur Familie der Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren und hemmt physiologisch die Auflösung von Blutgerinnseln. In Krebszellen korreliert die Expression von SERPINE1 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* positiv mit deren Proliferation und ist damit ein möglicher Marker für die Aggressivität und Invasivität von Tumoren [267]. In allen KD-Zellen war weiterhin die basale Expression von SOCS3, CSF1 und COX2 erhöht (Abb. 10 B-D), die alle ebenfalls durch TNFα induziert werden [268–270]. Ob die hier verwendeten KD-Zellen tatsächlich durch höhere TNFα-Gehalte im Vergleich zur Kontrolle gekennzeichnet sind, ist unklar. In früheren Untersuchungen lag die basale Zytokinkonzentration im Kulturmedium bzw. auf mRNA-Ebene im GPX2-KD teilweise unterhalb der Detektionsgrenze [196]. Im Mausmodell wies der GPX2-KO dagegen signifikant höhere TNFα-Plasmagehalte im Vergleich zum Wildtyp auf [193], ebenso wie GPX1-KO-Mäuse in einem Modell des akuten Leberversagens [271].

Die Aktivierung der zuvor genannten Gene kann dabei stets über NFκB erfolgen. Da das Fehlen von GPX1 und GPX2 eine signifikante Reduktion der IκBα-Proteinkonzentration nach Stimulation mit IL1β zur Folge hatte (Abb. 11 A), kann eine verstärkt induzierte Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern angenommen werden. Dass die Kontrolle dagegen kaum auf den Zytokin-Stimulus reagiert, ist auf die bereits bekannte Resistenz von HT29-Zellen gegenüber dem IL1β-induzierten IκBα-Abbau zurückzuführen [272]. Verantwortlich für die Degradierung von IκBα im kanonischen Signalweg ist eine Phosphorylierung durch den

IKK-Komplex, bestehend aus den IKK-Isoformen α und β sowie der regulatorischen Untereinheit NEMO. IKK α/β wiesen in Zellen mit GPX2-KD, nicht aber im GPX1-KD und der Kontrolle eine verstärkte Phosphorylierung an Ser176/Ser177 auf (Abb. 11 B). Die Phosphorylierung dieser Aminosäuren sowie von Ser180/Ser181 sind nötig für die Kinasefunktion des Komplexes [273]. Frühere Experimente mit MEFs aus IKK α -KO-Mäusen deuten darauf hin, dass IKK β allein in Verbindung mit NEMO zur Aktivierung des kanonischen, durch Entzündungssignale-getriebenen NF κ B-Signalwegs ausreichend ist [274]. Die Rolle der IKK β ist jedoch im Kontext von Zelltyp und Stimulus zu sehen und zumindest nach IL1 β -Stimulation kann die Funktion dieser Isoform durch die IKK α ersetzt werden [275]. Im GPX1-KD wäre eine blockierte IKK-Aktivierung aufgrund der IL1 β -induzierten ROS-Produktion und der damit einhergehenden höheren oxidativen Belastung denkbar. Untersuchungen in Fibroblasten zufolge kann eine Vorbehandlung mit 200 μ M H₂O₂ effektiv die TNF α -induzierte IKK-Aktivierung verhindern [276]. Der in dieser Arbeit verwendete GPX1-KD-Klon wies lediglich 32 % GPX-Aktivität gegenüber dem Substrat H₂O₂ im Vergleich zur SCR-Kontrolle auf [230]. Die GPX2-KD-Klone hatten in diesen Experimenten dagegen gemittelt noch 74 % der Gesamt-GPX-Aktivität der Kontrolle und somit einen vermutlich besseren Schutz vor H₂O₂ sowie weiteren Hydroperoxiden. Die Degradierung von I κ B α im GPX1-KD könnte wiederum auf IKK-unabhängige Weise geschehen. Aus Experimenten mit HeLa-Zellen nach Hypoxie/Reoxygenierung ist bekannt, dass die c-Src, eine redox-abhängige I κ B α -Kinase, bei GPX1-Überexpression signifikant vermindert ist [277]. Im Umkehrschluss ließe sich bei Annahme einer verstärkten c-Src-Aktivität im GPX1-KD der in diesem Klon gesteigerte I κ B α -Abbau nach IL1 β -Stimulation erklären. Zur Klärung bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen zum Einfluss der GPX1 auf die Aktivität von c-Src. Generell stellt die mögliche Regulation der NF κ B-Aktivität bei der klinischen Behandlung von CRC eine vielversprechende Anwendung dar. Zu den Substanzen mit nachgewiesener regulierender Wirkung gehört Selen schon seit längerem. Das Element zeigte dabei in Form von organischen und anorganischen Verbindungen direkt oder durch die gesteigerte Bildung von Selenoproteinen zumindest in Prostatakrebszellen bereits eine NF κ B-hemmende Funktion [278–280].

Parallel zur Beeinflussung von NF κ B-aktivierenden Signalwegskomponenten wurde auch ein erhöhter Phosphorylierungsgrad der beiden MAPK-Kinasen ERK1 und ERK2 in den GPX1- und GPX2-KD-Klonen nach Stimulation mit IL1 β detektiert (Abb. 11 C+D). Der ERK-MAPK-Signalweg ist durch seine Rolle bei der Zellproliferation nicht nur wichtig für die Differenzierung des intestinalen Epithels [281], sondern stellt auch ein mögliches Ziel bei der Behandlung von CRC dar [282]. Laut Untersuchungen an humanen Melanomzellen können die beiden Kinasen upstream von NF κ B dessen Aktivität beeinflussen [283]. Ursächlich für die ERK-Phosphorylierung könnte eine durch IL1 β ausgelöste gesteigerte Hydroperoxid-

Produktion sein [284, 285], der durch das Fehlen von entweder GPX1- oder GPX2 möglicherweise nicht entsprechend entgegengewirkt werden kann (Abb. 28). Ein in HT29-Zellen direkt durch ERK reguliertes Gen ist dabei die COX2 [286]. Die Gabe von NAC bzw. des MEK/ERK-spezifischen Inhibitors PD98059 konnte die nach IL1 β -Gabe gesteigerte COX2-Expression jedenfalls auf das basale Niveau reduzieren (Abb. 12 A+B). Dies deckt sich mit früheren Studien [287, 288] und deutet auf eine oxidative Modifikation von ERK hin. Dazu passend ließ sich in Experimenten mit dendritischen Immunzellen nach Gabe von 2,4-Dinitro-1-Fluorbenzol die ERK-Aktivierung durch gleichzeitige Inkubation mit GSH, nicht aber Vitamin E, aufheben [289]. Laut dieser Untersuchung ist dabei tatsächlich die Oxidation der MAPK-Kinasen wichtig für deren Aktivierung. Von der GPX1 wiederum ist bekannt, dass diese die Oxidation der Protein Tyrosin Phosphatase 1B (PTP1B) verhindern kann, was nachfolgend die Aktivierung der Protein Phosphatase 2A (PP2A) ermöglicht [290]. Bei genauerer Untersuchung stellte sich zudem heraus, dass nicht nur die antioxidative Funktion der GPX1, sondern auch deren spezifische Bindungsaffinität zur PTP1B dabei von Bedeutung war. Eine GPX-abhängige Regulation von ERK (oder upstream liegender Kinasen) aufgrund solch einer spezifischen Bindungsaffinität könnte daher auch erklären, warum die basal bestehende Hochregulation der COX2 in den GPX1- und GPX2-KD-Klonen nicht durch die Behandlung mit NAC bzw. PD98059 aufgehoben werden konnte. Alternativ zu dieser Hypothese könnte auch die bei Fehlen der GPXen inaktivierte PP2A für die erhöhte ERK-Phosphorylierung nach IL1 β -Stimulation verantwortlich sein. Yu et al. wiesen bereits 2004 in HT29-Zellen nach, dass die Phosphatase sowohl MEK1/2 als auch ERK1/2 komplett dephosphorylieren und damit inaktivieren kann [291]. Eine direkt oder indirekt hemmende Funktion von GPX1 und/oder GPX2 auf MAPK-Kinasen wie ERK wäre jedenfalls eine Erklärung für den anscheinend geringeren Differenzierungsstatus der KDs (siehe 4.1.2). So führte die PD98059-induzierte ERK-Hemmung zur terminalen Differenzierung von HT29-N2-Zellen [292].

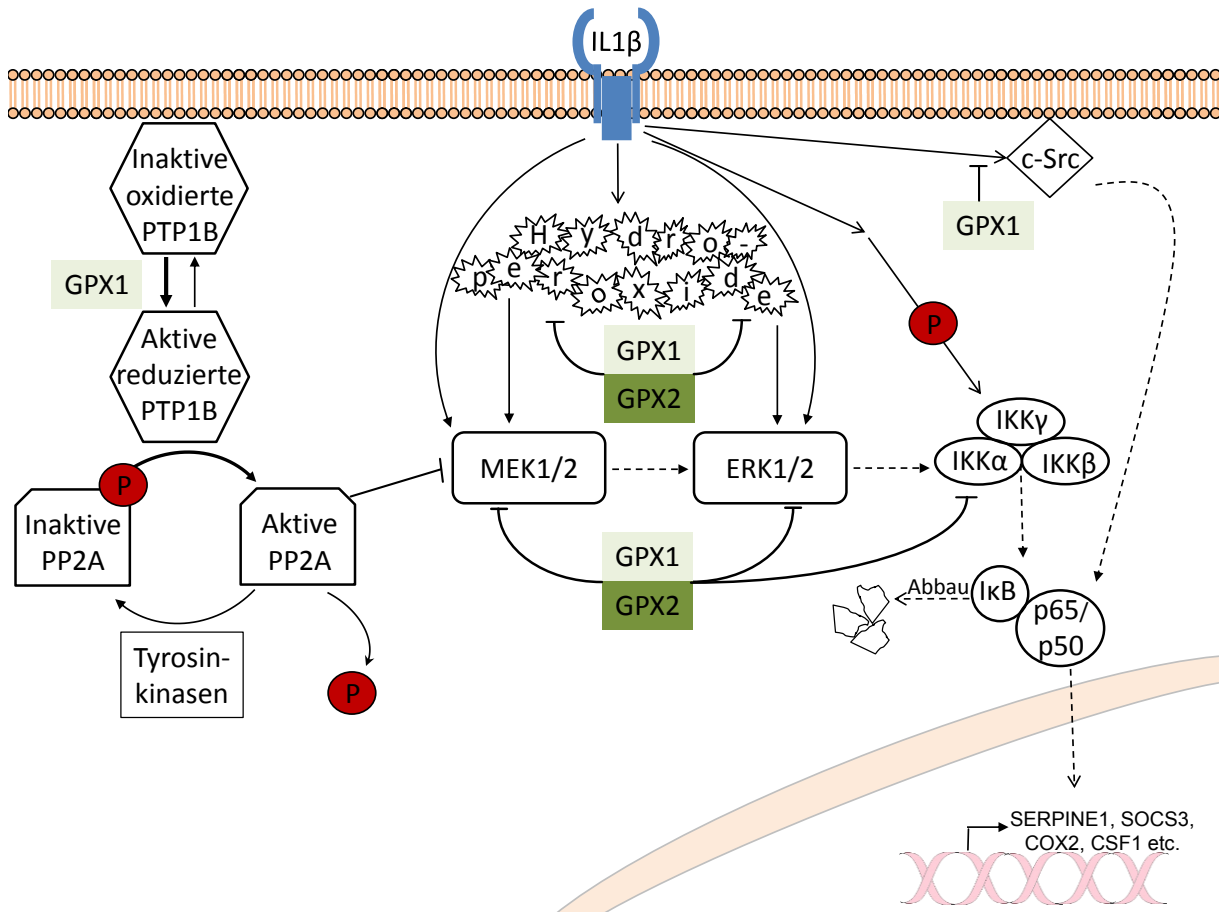


Abbildung 28: Mögliche GPX1- und GPX2-Funktionen in HT29-Zellen nach IL1β-Stimulation.

4.1.4 Rolle der GPX2-Substratspezifität beim Schutz vor Apoptose

Wie in 4.1.3 beschrieben ist die Aktivierung von NFκB und ERK, zwei eng mit der Entstehung von CRC-verbundenen Signalwegen, bei Fehlen von GPX1 oder GPX2 nach vorheriger IL1β-Stimulation möglicherweise abhängig vom Hydroperoxidtonus. Störungen der gastrointestinalen Redoxhomöostase können dabei zu oxidativem Stress mit Folgen für die kolorektale Karzinogenese führen. Einerseits konnte oxidativer Stress während der Tumorentstehung zum Beispiel mit dem Entstehen von Mikrosatelliteninstabilität aufgrund fehlerhafter DNA-Reparaturmechanismen in Verbindung gebracht werden [293]. Bei bestehendem CRC förderten ROS zudem neben der Proliferation eine Reihe weiterer prokarzinogener zellulärer Eigenschaften und damit die Tumorprogression [294, 295]. Andererseits induzieren ROS die Induktion verschiedener proapoptotischer Signalwege und verhindern dadurch das Wachstum und die Ausbreitung von Tumoren [296]. Die GPX2 ist ebenfalls durch pro- oder antitumorogene Eigenschaften gekennzeichnet, welche abhängig vom Stadium und der Art der Karzinogenese sind [224]. Vor allem die antioxidative Funktion des Enzyms dürfte dabei für den Schutz der Zelle gegenüber Hydroperoxiden verantwortlich sein. So zeigten auch in dieser Arbeit HT29-Zellen mit GPX2-KD nach Behandlung mit verschiedenen Hydroperoxiden einen zumindest tendenziell erhöhten Oxidationsstatus gegenüber der SCR-Kontrolle (Abb. 13). Ob die Funktion der GPX2 relevant beim Schutz

von Tumorzellen vor Hydroperoxid-bedingter Apoptose ist, wurde anschließend in HCT116-Zellen untersucht. Diese Zelllinie weist einerseits fast keinerlei detektierbare endogene GPX2-Expression auf [297]. Andererseits exprimieren die Zellen ein Wildtyp p53-Protein [298]. Dessen Aktivierung bei oxidativem Stress wird durch die GPX2 beeinflusst [299], was relevant für das zelluläre Verhalten während der Apoptose ist. Neben einem GPX2-Überexprimierer (YFP-GPX2) und der YFP-transfizierten Kontrolle (YFP) sollte ein Klon mit vorhandener, aber inaktiver GPX2 (YFP-GPX2 U40S) die Relevanz der enzymatischen Aktivität bei der Reduktion verschiedener Hydroperoxide klären. Dass die Transfektion der GPX2 keine Änderung der Expression weiterer GPX-Isoformen hervorruft, war dabei die Voraussetzung der Experimente und konnte bestätigt werden (Abb. 14 A-C). Einen ersten Hinweis zur Bedeutung der GPX2 bei der Umsetzung der getesteten Hydroperoxide lieferte die Messung der Gesamt-GPX-Aktivität. Diese dient einerseits als Indikator der zellulären Selenversorgung, kann alternativ aber auch zur Bestimmung der Substratspezifität genutzt werden [300]. Bei Verwendung von H_2O_2 machte die GPX2 dabei in den untersuchten HCT116-Zellen etwa ein Drittel der Gesamt-GPX-Aktivität aus (Abb. 15 A). Experimente in GPX2-KDs der HT29-Zelllinie, die normalerweise eine hohe endogene Expression des Enzyms aufweist, ergab vergleichbare Ergebnisse [230]. Ein Vergleich mit Kolonzellen aus GPX2-KO-Mäusen ist dagegen nicht möglich, da es hier zu einer kompensatorischen Hochregulation der GPX1 und damit einhergehend zur Steigerung der GPX-Aktivität kommt [228]. Wie wichtig die effektive Beseitigung von H_2O_2 in Krebszellen ist, muss letztendlich aufgrund der dualen Rolle dieses Hydroperoxids noch geklärt werden. Signalwege, die das Wachstum sowie die Überlebensfähigkeit von Tumorzellen regeln, werden durch geringe Konzentrationen dieses sekundären Messengers positiv beeinflusst. Hohe H_2O_2 -Level rufen dagegen einen Zellzyklusarrest oder sogar Apoptose hervor [301].

Die weiteren Substrate *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP), HPODE und HPETE wurden bei inaktiver GPX2 vergleichbar gut wie durch die YFP-Kontrolle umgesetzt (Abb 15 B-D). Dass für TBHP in den Zellen mit GPX2-Überexpression die höchste absolute GPX-Aktivität messbar ist, hängt möglicherweise mit der höheren Stabilität der Substanz im Vergleich zu H_2O_2 zusammen [302]. HPODE und HPETE hatten in den YFP-GPX2-Zellen eine doppelt so hohe Umsatzrate wie in der YFP-Kontrolle (Abb. 15 C+D). Frühere Experimente in MCF7-Brustkrebszellen, die mit humaner cDNA der GPX2 transfiziert wurden, zeigten bereits die höhere relative Reaktivität des Enzyms gegenüber solchen organischen Hydroperoxiden im Vergleich zur GPX1 [134]. In der Tat war auch nach Gabe höherer Konzentrationen dieser beiden Substanzen im NRU-Assay die Lebensfähigkeit der YFP-Kontrollzellen, nicht aber die der GPX2-Überexprimierer, signifikant verringert (Abb. 16 C+D). HPODE und HPETE selbst werden auch endogen aus Linol- bzw. Arachidonsäure durch mehrere Vertreter der LOX-Familie sowie durch nicht enzymatische Oxidation gebildet [303]. Abhängig vom

Reaktionsmilieu und der LOX-Isoform können dabei verschiedene regio-, stereo und enantiospezifische Isomere der beiden Hydroperoxide entstehen. Von diesen sowie der daraus durch Reduktion entstehenden Hydroxyoctadecadiensäure bzw. Hydroxyeicosatetraensäure geht eine Vielzahl biologischer und auch toxischer Effekte aus [304]. Physiologisch sind Lipidhydroperoxide in Plasma, Blut und Geweben in Konzentrationen von wenigen μM zu finden [305]. Daher ist anzunehmen, dass die für die signifikante Abnahme der Zellviabilität verantwortlichen $400 \mu\text{M}$ HPODE bzw. $100 \mu\text{M}$ HPETE die antioxidativen Schutzsysteme der HCT116-Zellen überforderten. Bereits geringe HPODE-Konzentrationen im einstelligen μM -Bereich hemmen zudem die COX2 sowie in geringerem Maße auch die COX1 [306]. Den Autoren dieser Studie zufolge stellt diese Inhibition einen möglichen Schutzmechanismus infolge einer exzessiven Prostaglandinsynthese dar. Nachgewiesenermaßen steigert die COX2 die Proliferation verschiedener Darmkrebszelllinien bzw. das Wachstum kolorektaler Tumoren und wirkt gleichzeitig der Apoptose transformierter Zellen entgegen [307]. Die erhöhte Viabilität der HCT116-Klone mit GPX2-Überexpression könnte daher eine Folge der verstärkten HPODE- sowie HPETE-Umsetzung sein und damit eine geringere COX2-Hemmung, verglichen mit der YFP-Kontrolle, bedingen. Dies würde sich wiederum positiv auf das Überleben dieser Zellen auswirken. HT29-Zellen mit fehlender GPX2 dagegen weisen eine gesteigerte COX2-Expression auf (Abb. 10 D+12), die vermutlich durch die erhöhte Hydroperoxidkonzentration im KD bedingt ist [150]. Ob die HCT116-Zellen mit überexprimierter GPX2 im Umkehrschluss jedoch weniger COX2 exprimieren, sollte durch zukünftige Untersuchungen geklärt werden. Die einstündige Stimulation mit je 2 mM H_2O_2 bzw. TBHP hatte in den beiden getesteten HCT116-Klonen eine Restviabilität von über 75% zur Folge (Abb. 16 A+B).

KillerTRAIL, eine rekombinante und stabilere Version des Proteins „Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand“ (TRAIL; engl.: *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*) konnte dagegen bereits ab 50 ng/mL signifikant die Zellviabilität der beiden Klone verringern (Abb. 16 E). TRAIL gehört zur TNF/TNFR-Superfamilie und ihren mehr als 40 Liganden sowie Rezeptoren [308, 309]. Das ubiquitär vorkommende Cytokin induziert insbesondere in transformierten Zellen extrinsisch die Apoptose durch Bindung an die Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2. Dies hat die Bildung des sogenannten DISC-Komplexes (engl.: *death-inducing signaling complex*) mit anschließender Aktivierung einer Caspasekaskade zur Folge [310]. Aufgrund dieser Eigenschaften gilt die Substanz als vielversprechendes Krebstherapeutikum, trotz möglicher hepatotoxischer Effekte [311]. *In vitro*-Tests ergaben weiterhin, dass manche Krebszelllinien wie beispielsweise HCT116-Zellen sensitiv auf TRAIL reagieren, wogegen andere wie z. B. HT29-Zellen eine gewisse Resistenz gegenüber dem Protein zeigen [312]. Zusätzlich zur signifikanten Abnahme der Viabilität im NRU-Assay verursachte KillerTRAIL auch eine

sichtbare DNA-Fragmentierung in allen HCT116-Klonen (Abb. 17 E). Die beobachteten Effekte waren im Vergleich zur Stimulation mit den verschiedenen Hydroperoxiden am stärksten und decken sich in Anbetracht der verwendeten Konzentrationen mit den Ergebnissen zur NRU-Untersuchung (Abb. 16). Das DNA-Laddering erfasst generell DNA-Fragmente, die aufgrund Caspase-aktivierter DNasen im späten Verlauf der Apoptose entstehen [313]. Die YFP-Kontrolle, der GPX2-Überexprimierer und der Klon mit inaktiver GPX2 unterschieden sich jedoch nicht im Ausmaß der induzierten Apoptose voneinander. Es ist daher anzunehmen, dass der durch KillerTRAIL-vermittelte Zelltod unabhängig von der GPX2 eintritt.

Die Stimulation mit H_2O_2 löste im GPX2 U40S-Klon interessanterweise eine erhöhte DNA-Fragmentierung verglichen mit der Kontrolle und dem GPX2-Überexprimierer aus (Abb. 17 A). Möglicherweise verursachte die Expression der GPX2, trotz inaktiver katalytischer Funktion, in den HCT116-Zellen eine Herunterregulation anderer Proteine mit H_2O_2 -reduzierender Funktion. Für solch einen Feedback-Mechanismus spricht die Hochregulation antioxidativer Enzyme bei Fehlen der GPX2 zur Erhaltung der Redox-Homöostase [314]. Ob es sich dabei um Selenoproteine handelt, bedarf weiterer Klärung. Zumindest dürfte eine verringerte Selenverfügbarkeit aufgrund der starken GPX2-Expression der U40S-Variante (Abb. 14 A) nicht ursächlich sein. Immerhin wird auch die GPX1 in diesem Klon exprimiert (Abb. 14 B), welche bekanntermaßen niedrig in der Hierarchie der Selenoproteine steht. Der Effekt einer TBHP-Behandlung auf die DNA-Fragmentierung scheint wiederum wenig durch die Expression einer aktiven und auch mutierten GPX2 beeinflusst zu werden. In beiden Klonen sind zwar tendenziell weniger DNA-Fragmente im Vergleich zur YFP-Kontrolle zu beobachten (Abb. 17 B), das Ausmaß der induzierten Apoptose unterscheidet sich jedoch kaum zu den unbehandelten Zellen (Abb. 17 F). Mechanistisch scheint die Substanz dabei, anders als H_2O_2 , kaum direkte DNA-Schäden zu verursachen, sondern eher die Integrität der Zellmembran zu stören [315]. Die Relevanz von TBHP als mögliches endogenes Substrat für die GPX2 bleibt zudem letztlich unklar, da die Verbindung offenbar nicht natürlicherweise im Körper vorkommt [316]. Eine Aktivierung des GPX2-Promotors in HepG2-Zellen konnte für TBHP als einziges der getesteten Substrate jedenfalls nicht nachgewiesen werden [230]. Die Behandlung mit HPODE hatte im YFP-GPX2-Klon dagegen tendenziell weniger DNA-Fragmente zur Folge (Abb. 17 C) und für HPETE war dieser Effekt sogar statistisch signifikant (Abb. 17 D). Für alle Experimente gilt abschließend zu bedenken, dass die HCT116-Zellen stets mit Selen kultiviert wurden. Dies hatte eine hohe GPX1-Expression zur Folge, sodass einige der beobachteten Effekte unter Umständen durch die Anwesenheit dieses Proteins beeinflusst wurden.

Zusammengefasst waren sowohl im GPX1-KD als auch in den verschiedenen Klonen mit modifizierter GPX2 diverse zelluläre Veränderungen messbar. Es ließ sich ein verminderter Differenzierungsstatus, einhergehend mit der geringeren Viabilität von Zellen mit fehlender GPX1 bzw. GPX2, nachweisen. Im Zuge einer proinflammatorischen IL1 β -Stimulation waren zudem nicht nur NF κ B-Komponenten, sondern auch die MAP-Kinasen ERK1/2 verstärkt in diesen Zellen aktiviert. Untersuchungen zum Substratspektrum der GPX2 sowie dessen Auswirkung auf die zelluläre Apoptose ergaben zudem eine mögliche Präferenz des Enzyms für die Lipidhydroperoxide HPODE und HPETE.

4.2 Selenoprotein H

Die GPX2 zeigt bekanntermaßen eine abnormale Expression während der kolorektalen Karzinogenese [225]. Da sie einen hohen Rang in der Expressionshierarchie der Selenoproteine einnimmt, reagiert sie dementsprechend wenig empfindlich auf eine Beschränkung der Selenzufuhr. Ein niedriger Selenstatus ist laut der EPIC-Studie jedoch mit dem Risiko, im Laufe des Lebens an CRC zu erkranken, assoziiert [114]. SELENOH dagegen ist eines der am stärksten durch einen Selenmangel in der Expression beeinflussten Selenoproteine [91, 211]. Das Protein ist weiterhin möglicherweise aufgrund seines enthaltenen CxxU-Motifs an der zellulären Redox-Homöostase beteiligt [160]. Da redox-sensitive Signalwege in vielen tumor-relevanten Prozessen involviert sind [317], ist eine Funktion von SELENOH bei CRC denkbar. Eine Untersuchung der Tumorzelllinien HT-1080, HepG2, MCF7, A-172, Hela und DU-145 zeigte stark erhöhte mRNA-Level von SELENOH in diesen Zellen auf, zumindest verglichen mit anderen bisher unzureichend charakterisierten Selenoproteinen wie SELENOS und SELENOV [169]. Auch in humanen Prostatakrebs- und in murinen Lungenkrebszellen war mehr SELENOH-Transkript als in nicht-transformierten Zelllinien nachweisbar [160]. Zusätzlich dazu konnte in dieser Arbeit erstmalig eine erhöhte SELENOH-Expression in Gewebeschnitten von CRC-Patienten (Abb. 18 A) und in präkanzerösen Läsionen von APC^{min/+}-Mäusen (Abb. 18 B-D) gezeigt werden.

Die Gründe der erhöhten SELENOH-Expression in Tumoren und eine damit möglicherweise einhergehende Rolle des Proteins während bei CRC wurde anhand eines shRNA-vermittelten knock down-Systems untersucht. Die mRNA-Expression in den beiden KD-Klonen betrug dabei in HT29-Zellen weniger als ein Fünftel und in Caco2-Zellen weniger als ein Drittel der SCR-Kontrolle (Abb. 19 A+B). Auf Proteinebene waren in beiden Zelllinien in den KDs ebenfalls maximal 20 % der Ausgangsmenge des SCR detektierbar (Abb. 19 C+D). Eine derart hohe KD-Effektivität ist auch von ebenfalls in dieser Arbeit genutzten HT29-GPX2-KD-Klonen bekannt (siehe 3.1.1), welche selbst nach Selensupplementation keine wesentliche GPX2-Expression mehr aufwiesen [150].

4.2.1 Protumorigene Eigenschaften durch Knockdown von SELENOH

Verankerungsunabhängiges Wachstum ist ein fundamentales Merkmal von Krebszellen. In unseren Untersuchungen bildeten die HT29-Zellen mit SELENOH-KD nicht nur mehr als doppelt so viele Kolonien wie der SCR im Soft Agar, die durchschnittliche Größe dieser Kolonien war zudem um 50 % erhöht (Abb. 20 A+B). Auch in Caco2-Zellen waren mehr und größere Kolonien bei Fehlen von SELENOH zu beobachten. Da derartige Eigenschaften eng mit der Malignität von Krebszellen *in vivo* verknüpft sind [318], geben diese Funde einen ersten Hinweis auf eine möglicherweise antitumorigene Funktion von SELENOH. KDs anderer Selenoproteine in kolorektalen Krebszellen wie der GPX2 (HT29) [155], SELENOF (HT29 und HCT116) [319] und TXNRD1 (CT26 und HCT116) [320, 321] resultierten dagegen in jeweils weniger Kolonien und unterstreichen die potenziell prokarzinogenen Eigenschaften dieser Selenoproteine.

Auch die Fähigkeit zur Migration, einem wichtigen Aspekt bei der Metastasierung von Tumorzellen [322], war *in vitro* bei Fehlen von SELENOH gesteigert. Eine zugefügte Wunde im Zellrasen war in beiden KD-Klonen sowohl nach 48 als auch 72 h signifikant stärker als im SCR geschlossen (Abb. 21 A-C). Möglicherweise spielt bei dieser Untersuchung auch das Proliferationspotenzial der Zellen eine Rolle, da dieses nicht separat durch Substanzen wie beispielsweise den Mitosehemmer Mitomycin C unterbunden wurde [323]. Da die Proliferation aber vor allem in langsam migrierenden Zellen die Untersuchungsergebnisse beeinflussen kann und die getesteten HT29-Zellen generell bereits nach 24 h ein hohes Migrationspotenzial zeigten, ist dieser Faktor unter Umständen zu vernachlässigen. Zwar sind zur genaueren Untersuchungen der Migrationsdynamik spezielle Verfahren wie die Echtzeit-Fluoreszenzmikroskopie im Zeitraffer nötig [324], der hier verwendete scratch-Assay kann jedoch zumindest als Anhaltspunkt für die erhöhte Migrationsfähigkeit von Zellen mit SELENOH-KD dienen. Auch SELENOK, ein im endoplasmatischen Retikulum an der Proteolyse sowie Ca^{2+} -Homöostase beteiligtes Selenoprotein [325], zeigt derartige migrationshemmende Eigenschaften. Humane Magenkrebs- sowie Chorionkarzinomzellen waren bei Überexpression von SELENOK unter anderem durch eine reduzierte Adhäsions- und Migrationsfähigkeit gekennzeichnet [326, 327]. Auch die GPX2 wies in HT29-Zellen eine migrationshemmende Wirkung auf. Die Migrationsfähigkeit eines KDs war in diesem Fall invers abhängig von der Expression der COX2 und konnte durch eine Behandlung mit dem COX2-Hemmer Celecoxib normalisiert werden [155]. Generell hatte die Gabe unterschiedlicher selen-haltiger Verbindungen in einer Vielzahl von Studien *in vitro* und *in vivo* die effektive Reduktion der Migration von Krebszellen zur Folge [328]. Da SELENOH weitaus sensitiver auf mögliche Selenquellen als andere bisher in diesem Kontext untersuchte Selenoproteine reagiert, könnte das Protein daher eine wichtige Rolle bei der Hemmung der Zellmobilität und damit möglicherweise Metastasierungsfähigkeit von

Tumoren einnehmen. Die *in vitro* gesteigerte Tumorigenität der HT29-Zellen bei Fehlen von SELENOH ließ sich nachfolgend auch im Xenograftmodell in CrI:CD1-*Foxn1*^{nu}-Nacktmäusen bestätigen. Die Mehrzahl der aus dem SELENOH-KD entstandenen Tumore wies ein signifikant höheres Gewicht auf (Abb. 22 A). In ähnlicher Weise sorgten die Überexpression der GPX1 bzw. GPX3 in verschiedenen Xenografts von Prostatakrebszellen für ein verringertes Tumorwachstum [128, 329]. Eine hohe SELENOH-Expression könnte daher möglicherweise, ähnlich wie für die GPX1 und GPX3 beobachtet, eine antikarzinogene Wirkung *in vivo* haben. Gegensätzlich dazu zeigten sowohl die TXNRD1 als auch die GPX2 in Xenograft-Modellen tumorfördernde Eigenschaften [155, 330]. Die SELENOH-Proteinexpression selbst war in den aus den KD-Zellen hervorgegangenen Tumoren wie erwartet signifikant niedriger als in den SCR-Kontrolltumoren (Abb. 22 B). Dies ist bemerkenswert, da das shRNA-exprimierende Vektorsystem in HT29-Zellen in den Nacktmäusen, anders als in der Zellkultur, aufgrund des Antibiotikums Geneticin, keinem Selektionsdruck mehr unterlag. Im LCC1-Xenograft des TXNRD-KDs hatte das Fehlen von Hygromycin B dagegen einen teilweisen Verlust des Zielvektors zur Folge, was zur Bildung von Tumoren trotz eines eigentlich protektiven KDs dieses Selenoproteins beitrug [330].

4.2.2 Dysregulation des Zellzyklus bei Fehlen von SELENOH

Als mögliche Ursache für die tumorigenen Effekte des SELENOH-KDs wurde eine Fehlregulation in der Zellzykluskontrolle vermutet. Anhand der Zellzyklusanalyse konnte tatsächlich ein verstärkter Übergang der Zellen von der G₁- in die S-Phase bei Fehlen des Selenoproteins gezeigt werden. Die KDs wiesen dabei im Anschluß an die Zellsynchronisierung eine größere Zellfraktion in der S-Phase und damit einhergehend weniger Zellen im G₀/G₁-Zustand auf (Abb. 23 A-D). Der Übergang zwischen diesen beiden Phasen wird durch verschiedene Signalwege und -moleküle reguliert. Hierzu gehört unter anderem die sogenannte p53/p21-Achse, welche in Reaktion auf DNA-Schäden den Übergang in die S-Phase verzögert [331]. Aufgrund von Untersuchungen durch Wu et al. ist bereits bekannt, dass SELENOH in Abhängigkeit von p53 vor DNA-Schäden infolge von oxidativem Stress schützt und somit zur Genomintegrität beiträgt [170]. Geht man von dieser Schutzfunktion durch SELENOH auch in den hier untersuchten HT29-Zellen aus, dann müsste im KD die G₀/G₁→S-Transition verringert und nicht erhöht sein. Tatsächlich trifft dies auch auf Zebrafische mit SepH-KO (ortholog zu SELENOH in Wirbeltieren) zu, wo eine Zellverteilung zugunsten der G₀-Phase beobachtet wurde [171]. Im Gegensatz zu diesem Modell verfügen die verwendeten Zelllinien HT29 und Caco2 aufgrund von Mutationen jedoch über keine native p53-Expression [332, 333], was vermutlich die Interaktion zwischen SELENOH und p53 beeinflusst. In den Zebrafischen zeigte sich im SepH-KO dann auch eine starke Hochregulation von p53-Zielgenen und ein gleichzeitiger Doppel-KO beider Proteine beschleunigte anschließend die Tumorinitiation [171]. Die oftmals bei der Tumorprogression

in transformierten Zellen beeinträchtigte p53-Funktion könnte auch für andere protumorigene Selenoproteine wie die GPX2, SELENOF und TXNRD1 deren eigentlich antitumorogene Funktion in gesunden Zellen erklären [102].

Aus einer früheren Untersuchung der Arbeitsgruppe ist in nicht-synchronisierten HT29-Zellen mit SELENOH-KD weiterhin eine Überexpression von CCND1 und CDK6 bekannt [334]. Diese Proteine treiben ebenfalls als Komplex die $G_1 \rightarrow S$ -Transition voran [335]. Im Zuge der Analyse verschiedener Zellzyklusmarker zeigten sich in dieser Arbeit dann auch CCNE1 und p21 reguliert. Während von CCNE1 in den KD-Klonen 6 h nach erneuter Serumgabe vermehrt mRNA detektierbar war (Abb. 24 A), kam es dagegen zur Herabsenkung der p21-Proteinexpression nach Wiedereintritt in den Zellzyklus (Abb. 24 B). Passenderweise sind beide Marker gegensätzlich an der Regulation des Übergangs von G_0/G_1 zur S-Phase beteiligt [336]. Dabei bindet p21, wahrscheinlich zusammen mit p27, inaktivierend an den CCNE-CDK2-Komplex und blockiert somit das Fortschreiten des Zellzyklus. Da dieser Prozess und daran beteiligte Proteine wie p21 eng mit periodischen Schwankungen des Redoxstatus verknüpft sind [337], könnte das vermutlich redox-aktive SELENOH in diesem Kontext die Rolle des bisher unbekanntes Regulators einnehmen. Ein möglicher Einfluss von SELENOH auf die Zellproliferation im Zuge einer veränderten Zellzyklusaktivität ist in Abb. 29 zusammengefasst.

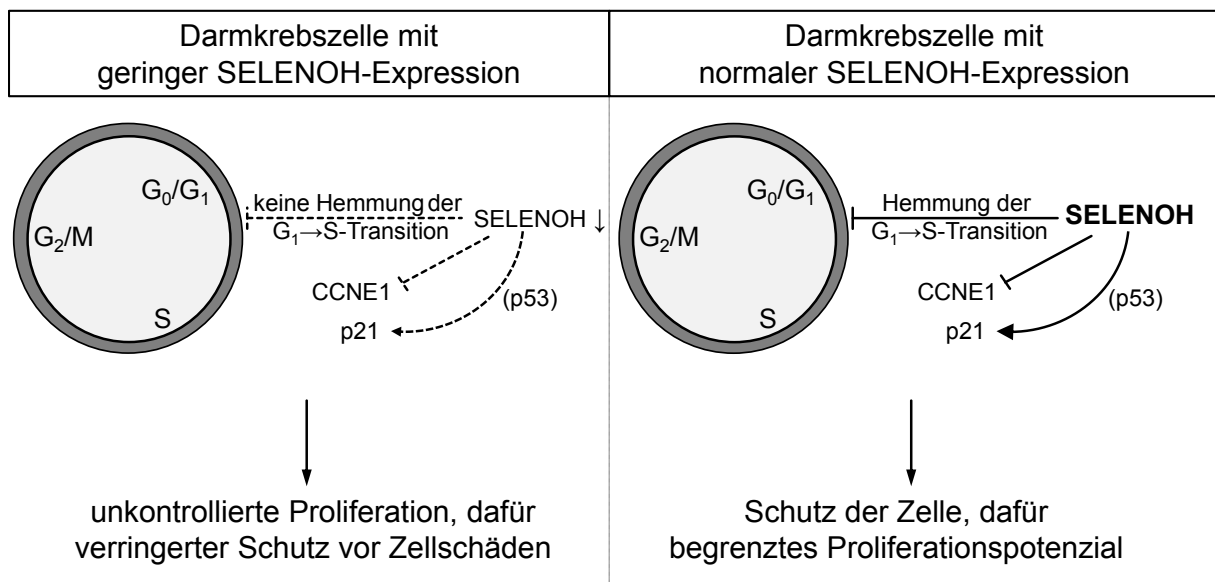


Abbildung 29: Mögliches Funktionsmodell für SELENOH in Darmkrebszellen

SELENOH beeinflusst die Expression verschiedener Zellzyklusregulatoren, hemmt dadurch die $G_1 \rightarrow S$ -Transition und begrenzt damit die Proliferation von Darmkrebszellen

4.2.3 Potenzielle Funktion von SELENOH während der Zelldifferenzierung

Aus früheren Untersuchungen weiß man, dass p21 in Darmkrebs zumeist dereguliert ist [338]. Weiterhin geht eine hohe p21-Expression häufig mit einer günstigen Überlebenswahrscheinlichkeit bei dieser Erkrankung einher [339]. In HT29- und Caco2-Zellen war nach induzierter Differenzierung weniger p21-Protein in den vermeintlich protumorigenen SELENOH-KDs nachweisbar (Abb. 25 E+F). Dieses Ergebnis passt zur beobachteten Assoziation einer p21-Induktion mit der verringerten Proliferation von kolorektalen Krebszellen [340, 341]. Ursächlich dafür war, zumindest im untersuchten Caco2-Modell, ein höherer Differenzierungsgrad der Zellen [342]. In den differenzierten SELENOH-KDs beider Zelllinien war weiterhin eine gegenüber dem SCR signifikant verringerte ALP-Aktivität messbar (Abb. 25 C+D). Die ALP ist ein anerkannter Marker für die intestinale Zelldifferenzierung und komplett differenzierte Epithelzellen weisen die höchste Konzentration dieses Enzyms auf, wogegen keine oder kaum Expression in wenig differenzierten kolorektalen Krebszellen nachweisbar ist [343]. Die signifikant erhöhte Expression von LGR5 in den undifferenzierten SELENOH-KDs in HT29- und Caco2-Zellen ist eine weitere Bestätigung der bisherigen Ergebnisse (Abb. 25 A+B). Dieses Gen wurde ursprünglich als Stammzellmarker in Dünn- und Dickdarm beschrieben [184]. Inzwischen hat sich gezeigt, dass es zusätzlich dazu häufig in CRC überexprimiert wird [344] und unter Umständen direkt an der kolorektalen Karzinogenese beteiligt ist [345]. Als vermeintlicher Marker für CSCs wird die Bedeutung von LGR5 inzwischen auch in der Krebstherapie diskutiert, da die Expression positiv mit der Metastasierung und damit invers zur Überlebenswahrscheinlichkeit korreliert [346]. Eine direkte Interaktion von LGR5 mit Selenoproteinen ist bisher nicht untersucht worden. Eine mögliche Verbindung mit SELENOH ergibt sich aus dem Befund, dass LGR5 durch den Zellzyklus reguliert wird und die höchste Expression beim Übergang von der G₁- zur S-Phase zeigt [347]. Zudem wird es bei einem G1-Arrest herunterreguliert, was sich mit den hier gezeigten niedrigen mRNA-Leveln nach der Differenzierung durch Butyratbehandlung (Abb. 25 A) bzw. konfluentem Wachstum (Abb. 25 B) deckt. Anhand der drei untersuchten Marker LGR5, p21 und der ALP lässt sich schlussfolgern, dass bei Fehlen von SELENOH die Differenzierungsfähigkeit in den untersuchten kolorektalen Krebszellen vermindert ist.

Ob SELENOH möglicherweise auch in nicht-transformiertem Gewebe eine derartige Funktion ausübt, bleibt unklar. Eine potenzielle Funktion des Proteins am Differenzierungsvorgang transit-amplifizierender Epithelzellen im gesunden Dünn- und Dickdarm deckt sich zumindest mit der vorrangigen Lokalisation von SELENOH am Kryptengrund (Abb. 27 A-D). Ein weiterer Hinweis auf solch eine Funktion ist die Beobachtung, dass die Menge an SELENOH-mRNA in den beiden Zelllinien HT29 und Caco2 nach einer induzierten Differenzierung unabhängig vom Selenstatus verringert war

(Abb. 26 A+B). Die SELENOH-Proteinexpression sank durch die Differenzierung statistisch signifikant zwar nur in den selen-supplementierten Zellen, dies war jedoch allein der geringen Proteinexpression bei Selenmangel geschuldet (Abb. 26 C+D).

SELENOH wird jedoch nicht nur stark in proliferierenden Darmkrypten und kolorektalen Krebszelllinien exprimiert, auch Gewebeschnitte von Patienten mit malignen Adenokarzinomen (Abb. 18 A) sowie präkanzeröse Läsionen von APC^{min/+}-Mäusen (Abb. 18 B-D) wiesen erhöhte Gehalte des Proteins auf. Eine möglicherweise proliferationshemmende Funktion scheint mit diesem Expressionsverhalten zunächst nicht vereinbar zu sein. Es gibt jedoch Hinweise dafür, dass in transformiertem Gewebe nicht die bekannte Expressionshierarchie von Selenoproteinen vorzufinden ist. So fand sich beispielsweise trotz vergleichbarer Selenversorgung eine Expression der GPX1 in Prostatakrebszellen, nicht aber in gesunden Prostataepithelzellen [348]. Zudem können sowohl Hypoxie als auch oxidativer Stress, Kennzeichen hochproliferativer Krebszellen, die Synthese von Selenoproteinen regulieren [349, 350]. Möglicherweise beeinflusst daher eher die Tumorumgebung selbst die Expression von Selenoproteinen und weniger die Selenversorgung. Krebszellen profitieren deswegen unter Umständen von einer erhöhten Expression des Proteins aufgrund dessen schützender Funktion vor oxidativem Stress und damit einhergehenden DNA-Schäden [160, 170] - dies jedoch auf Kosten des Tumorwachstums. Sollte sich diese Hypothese in zukünftigen Untersuchungen bewahrheiten, dann würde SELENOH neben der GPX2, TXNRD1 und SELENOF zur Gruppe der Selenoproteine mit dualer Funktion während der kolorektalen Karzinogenese zählen.

4.3 Fazit

Schlussendlich liegt die Vermutung nahe, dass der KD der GPX2 in den untersuchten HT29-Zellen einen weitreichenden Einfluss auf das Wachstumspotenzial dieser Tumorzellen hat. Dies zeigte sich durch die verringerten Differenzierungsmarker sowie durch die erniedrigte Viabilität der Zellen ohne GPX2. Ein ähnliches Phänomen wurde bereits für kultivierte Tumorspheroide von CRC-Patienten mit GPX2-KD gezeigt, allerdings war in der Arbeit die gleichzeitige Ausprägung der stammzellähnlichen Eigenschaften im KD stärker [156]. Da der GPX1-KD ein vergleichbares Verhalten aufwies, liegt die Ursache der Effekte eventuell in der enzymatischen Funktion beider Enzyme begründet. Die verstärkte NFκB-Aktivierung sowohl im GPX1- als auch GPX2-KD ist unter Umständen auf eine direkte oder indirekte Interaktion mit verschiedenen MAP-Kinasen zurückzuführen, was wiederum neue Einblicke in die antikarzinogene Rolle der GPX2 bei der entzündungsgetriebenen Tumorigenese gibt. Tumorzellen mit hoher oxidativer Belastung profitieren dagegen von der Anwesenheit der GPX2. Insbesondere Lipidhydroperoxide wie HPODE und HPETE scheinen dabei vom Enzym bevorzugte Substrate zu sein, da Zellen mit hoher GPX2-Expression eine höhere Lebensfähigkeit und geringere Apoptoseneigung aufwiesen. Diese Befunde bestätigen noch einmal die duale Funktion der GPX2 in der kolorektalen Karzinogenese.

Für SELENOH wurden in dieser Arbeit antikarzinogene Effekte identifiziert. Das Fehlen des Proteins hatte dabei in Tumorzellen eine erhöhte Tumorigenität *in vitro* und *in vivo* zur Folge. Vermutlich ist dies mit dem hemmenden Einfluss von SELENOH auf den Zellzyklus zu erklären. Insbesondere eine gute Selenversorgung förderte dabei die Expression und somit die Funktion des Proteins, das möglicherweise auch zur Modulation des Redox-Status beiträgt. Eine hohe Expression von SELENOH in Tumorzellen, wie sie in transformiertem Mausgewebe und humanen Adenokarzinomen gezeigt wurde, könnte dabei langfristig jedoch paradoxerweise deren Überlebenschance trotz verringertem Wachstum erhöhen.

4.4 Ausblick

Durch die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse stellen sich eine Menge anschließender Fragen. Ob beispielsweise nicht nur der Selenstatus, sondern auch SNPs zu einer veränderten GPX-Expression/-Aktivität und damit den beobachteten Erscheinungen *in vivo* in Tumorzellen führen und welche funktionalen Auswirkungen diese Polymorphismen bei CRC generell haben, bleibt kommenden Untersuchungen vorbehalten. Dies könnte möglicherweise zur besseren Charakterisierung bestimmter Tumorzellpopulationen entsprechend ihrer GPX-Expression führen. Auch könnte die offensichtlich erhöhte NF κ B-Aktivierung in den GPX-KDs relevant für die entzündungsgetriebene kolorektale Karzinogenese sein. Laut Ergebnissen unserer Experimente sind Mitglieder der MAPK-Familie in diesem Kontext vielversprechende Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen. Es sollte dabei geklärt werden, ob das Enzym direkt mit bestimmten Proteinen interagiert oder ob es seine Funktion ausschließlich über die Reduktion von Hydroperoxiden ausübt. Weiterhin offen ist die Frage nach der Substratspezifität der GPX2. Zwar wurde gezeigt, dass das Enzym Krebszellen eher vor den schädigenden Effekten hoher Konzentrationen der Fettsäure-Hydroperoxide HPODE und HPETE schützen kann. Die Relevanz dieser Substanzen in Bezug auf ihre endogene Synthese und auch ihre Zufuhr durch die Nahrung bedarf jedoch weitergehender Analysen.

Aufgrund der Ergebnisse zur Charakterisierung des SELENOH-KDs in Darmkrebszellen ergeben sich ebenfalls einige Ansatzpunkte für zukünftige Untersuchungen. Zunächst sollte geklärt werden, ob und in welchen humanen Tumoren es tatsächlich zur Hochregulation des Proteins kommt. Dies sollte insbesondere in Abhängigkeit vom Selenstatus der Patienten erfolgen. Damit ließe sich prüfen, ob die Expression von (insbesondere selensensitiven) Selenoproteinen in transformiertem Gewebe unabhängig von der Selenzufuhr reguliert wird. Dies wäre auch eine Voraussetzung für die mögliche Nutzung von SELENOH als Biomarker für die Bösartigkeit von Tumoren. Ebenfalls sollte *in vivo* untersucht werden, wie genau das Protein auf molekularer Ebene an der Regulation von Proliferations- und Differenzierungsvorgängen (im Darmepithel) beteiligt ist. Spezifische KO-Modelle in der Maus könnten unter Einbeziehung verschiedener Stressszenarien (Erhöhung der oxidativen Belastung, Gabe von DNA-schädigenden Substanzen) bisher postulierte Funktionen von SELENOH bestätigen oder sogar neue Eigenschaften des Proteins aufdecken.

5. Zusammenfassung

Kolorektalkrebs (CRC) ist die dritthäufigste Tumorerkrankung weltweit. Neben dem Alter spielt auch die Ernährung eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Krankheit. Eine vermutlich krebspräventive Wirkung wird dabei dem Spurenelement Selen zugeschrieben, das fast ausschließlich über Lebensmittel aufgenommen wird. So hängt beispielsweise ein niedriger Selenstatus mit dem Risiko, im Laufe des Lebens an CRC zu erkranken, zusammen [114]. Seine Funktionen vermittelt Selen dabei überwiegend durch Selenoproteine, in denen es in Form von Selenocystein eingebaut wird. Zu den bisher am besten untersuchten Selenoproteinen mit möglicher Funktion während CRC zählen die Glutathionperoxidasen (GPXen). Die Mitglieder dieser Familie tragen aufgrund ihrer Hydroperoxid-reduzierenden Eigenschaften entscheidend zum Schutz der Zellen vor oxidativem Stress bei. Dies kann je nach Art und Stadium des Tumors entweder krebshemmend oder -fördernd wirken, da auch transformierte Zellen von dieser Schutzfunktion profitieren.

In dieser Arbeit wurde die GPX2 in HT29-Darmkrebszellen mithilfe stabil-transfizierter shRNA herunterreguliert, um die Funktion des Enzyms vor allem in Hinblick auf regulierte Signalwege zu untersuchen. Ein Knockdowns (KD) der strukturell ähnlichen GPX1 kam ebenfalls zum Einsatz, um gezielt Isoform-spezifische Funktionen unterscheiden zu können. Anhand eines PCR-Arrays wurden Signalwege identifiziert, die auf einen Einfluss der beiden Proteine im Zellwachstum hindeuteten. Anschließende Untersuchungen ließen auf einen verminderten Differenzierungsstatus in den GPX1- und GPX2-KDs aufgrund einer geringeren Aktivität der Alkalischen Phosphatase schließen. Zudem war die Zellviabilität im Neutralrot-Assay (NRU) bei Fehlen der GPX1 bzw. GPX2 im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Die Ergebnisse des PCR-Arrays, und speziell für die GPX2 frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe, wiesen weiterhin auf eine Rolle der beiden Proteine in der entzündungsgetriebenen Karzinogenese hin. Daher wurden auch mögliche Interaktionen mit dem NF κ B-Signalweg analysiert. Eine Stimulation der Zellen mit dem proinflammatorischen Zytokin IL1 β ging mit einer verstärkten Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 in den Zellen mit GPX1- bzw. GPX2-KD einher. Die gleichzeitige Behandlung mit dem Antioxidans NAC führte nicht zur Rücknahme der Effekte in den KDs, sodass möglicherweise nicht nur die antioxidativen Eigenschaften der Enzyme bei der Interaktion mit diesen Signalwegsproteinen relevant sind.

Weiterhin wurden Analysen zum Substratspektrum der GPX2 in HCT116-Zellen mit einer Überexpression des Proteins durchgeführt. Dabei zeigte sich mittels NRU-Assay und DNA-Laddering, dass die GPX2 besonders vor den proapoptischen Effekten einer Behandlung mit den Lipidhydroperoxiden HPODE und HPETE schützt.

Im Gegensatz zur GPX2 lässt sich Selenoprotein H (SELENOH) stärker durch die alimentäre Selenzufuhr beeinflussen. Einer möglichen Nutzung als Biomarker oder gar als Ansatzpunkt bei der Prävention bzw. Behandlung von CRC steht allerdings unvollständiges Wissen über die Funktion des Proteins gegenüber. Zur genaueren Charakterisierung von SELENOH wurden daher stabil-transfizierte KD-Klone in HT29- und Caco2-Zellen hergestellt und zunächst auf ihre Tumorigenität untersucht.

Zellen mit SELENOH-KD bildeten mehr und größere Kolonien im Soft Agar und zeigten ein erhöhtes Proliferations- und Migrationspotenzial im Vergleich zur Kontrolle. Ein Xenograft in Nacktmäusen resultierte zudem in einer stärkeren Tumorbildung nach Injektion von KD-Zellen. Untersuchungen zur Beteiligung von SELENOH an der Zellzyklusregulation deuten auf eine hemmende Rolle des Proteins in der G₁/S-Phase hin.

Die weiterhin beobachtete Hochregulation von SELENOH in humanen Adenokarzinomen und präkanzerösem Mausgewebe lässt sich möglicherweise mit der postulierten Schutzfunktion vor oxidativen Zell- und DNA-Schäden erklären. In gesunden Darmepithelzellen war das Protein vorrangig am Kryptengrund lokalisiert, was zu einer potenziellen Rolle während der gastrointestinalen Differenzierung passt.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Clevers, H. C., Bevins, C. L., Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. *Annual review of physiology* 2013, 75, 289–311. doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183744.
- [2] Crosnier, C., Stamatakis, D., Lewis, J., Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nature reviews. Genetics* 2006, 7, 349–359. doi:10.1038/nrg1840.
- [3] van der Flier, Laurens G, Clevers, H., Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annual review of physiology* 2009, 71, 241–260. doi:10.1146/annurev.physiol.010908.163145.
- [4] Junqueira, L. C. U., Mayerhofer, A. (Eds.), *Histologie: Mit 500 Abbildungen in 618 Einzeldarstellungen und 17 Tabellen*, Springer Medizin, Heidelberg 2005.
- [5] Moran, G. W., Leslie, F. C., Levison, S. E., Worthington, J., McLaughlin, J. T., Enteroendocrine cells: neglected players in gastrointestinal disorders? *Therapeutic advances in gastroenterology* 2008, 1, 51–60. doi:10.1177/1756283X08093943.
- [6] Johansson, M. E. V., Sjovall, H., Hansson, G. C., The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 2013, 10, 352–361. doi:10.1038/nrgastro.2013.35.
- [7] Harris, N., IMMUNOLOGY. The enigmatic tuft cell in immunity. *Science (New York, N.Y.)* 2016, 351, 1264–1265. doi:10.1126/science.aaf5215.
- [8] Grossmann, J., Walther, K., Artinger, M., Rummele, P. et al., Induction of apoptosis before shedding of human intestinal epithelial cells. *The American journal of gastroenterology* 2002, 97, 1421–1428. doi:10.1111/j.1572-0241.2002.05787.x.
- [9] Rothenberg, M. E., Nusse, Y., Kalisky, T., Lee, J. J. et al., Identification of a cKit(+) colonic crypt base secretory cell that supports Lgr5(+) stem cells in mice. *Gastroenterology* 2012, 142, 1195–1205.e6. doi:10.1053/j.gastro.2012.02.006.
- [10] Delaunoy, T., Neczyporenko, F., Limburg, P. J., Erlichman, C., Pathogenesis and risk factors of small bowel adenocarcinoma: a colorectal cancer sibling? *The American journal of gastroenterology* 2005, 100, 703–710. doi:10.1111/j.1572-0241.2005.40605.x.
- [11] Boyle, W. J., Brenner, D. A., Molecular and cellular biology of the small intestine. *Current Opinion in Gastroenterology* 1995, 11, 121–127.
- [12] Aries, V., Crowther, J. S., Drasar, B. S., Hill, M. J., Williams, R. E., Bacteria and the aetiology of cancer of the large bowel. *Gut* 1969, 10, 334–335. doi:10.1136/gut.10.5.334.
- [13] Lowenfels, A., WHY ARE SMALL-BOWEL TUMOURS SO RARE? *The Lancet* 1973, 301, 24–26. doi:10.1016/S0140-6736(73)91228-2.
- [14] Medema, J. P., Vermeulen, L., Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature* 2011, 474, 318–326. doi:10.1038/nature10212.
- [15] Tomasetti, C., Vogelstein, B., Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science (New York, N.Y.)* 2015, 347, 78–81. doi:10.1126/science.1260825.
- [16] Blokzijl, F., Ligter, J. de, Jager, M., Sasselli, V. et al., Tissue-specific mutation accumulation in human adult stem cells during life. *Nature* 2016, 538, 260–264. doi:10.1038/nature19768.
- [17] Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I. et al., Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 2017, 66, 683–691. doi:10.1136/gutjnl-2015-310912.
- [18] Internationale Agentur für Krebsforschung, *GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012: Colorectal Cancer*, http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=colorectal (accessed December 9, 2015).
- [19] Montagnana, M., Lippi, G., iar: Current concepts and future perspectives. *Annals of translational medicine* 2017, 5, 268. doi:10.21037/atm.2017.06.20.
- [20] Hagggar, F. A., Boushey, R. P., Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clinics in colon and rectal surgery* 2009, 22, 191–197. doi:10.1055/s-0029-1242458.

- [21] Jasperson, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W., Burt, R. W., Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* 2010, *138*, 2044–2058. doi:10.1053/j.gastro.2010.01.054.
- [22] Eaden, J. A., The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: A meta-analysis. *Gut* 2001, *48*, 526–535. doi:10.1136/gut.48.4.526.
- [23] Tao, S., Hoffmeister, M., Brenner, H., Development and validation of a scoring system to identify individuals at high risk for advanced colorectal neoplasms who should undergo colonoscopy screening. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 2014, *12*, 478–485. doi:10.1016/j.cgh.2013.08.042.
- [24] Bardou, M., Barkun, A. N., Martel, M., Obesity and colorectal cancer. *Gut* 2013, *62*, 933–947. doi:10.1136/gutjnl-2013-304701.
- [25] Bouvard, V., Loomis, D., Guyton, K. Z., Grosse, Y. et al., Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *The Lancet Oncology* 2015, *16*, 1599–1600. doi:10.1016/S1470-2045(15)00444-1.
- [26] *Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: A global perspective ; [second expert report]*, AICR, Washington DC 2007.
- [27] Bailey, C. E., Hu, C.-Y., You, Y. N., Bednarski, B. K. et al., Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal cancers in the United States, 1975–2010. *JAMA surgery* 2015, *150*, 17–22. doi:10.1001/jamasurg.2014.1756.
- [28] Burt, R. W., Colon cancer screening. *Gastroenterology* 2000, *119*, 837–853. doi:10.1053/gast.2000.16508.
- [29] Pitot, H. C., The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer* 1993, *72*, 962–970.
- [30] Hanahan, D., Weinberg, R. A., The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, *100*, 57–70.
- [31] Hanahan, D., Weinberg, R. A., Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011, *144*, 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [32] Leslie, A., Carey, F. A., Pratt, N. R., Steele, R. J. C., The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *The British journal of surgery* 2002, *89*, 845–860. doi:10.1046/j.1365-2168.2002.02120.x.
- [33] Fearon, E. R., Vogelstein, B., A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990, *61*, 759–767. doi:10.1016/0092-8674(90)90186-I.
- [34] Boland, C. R., Goel, A., Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010, *138*, 2073–2087.e3. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.064.
- [35] Lane, D. P., Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992, *358*, 15–16. doi:10.1038/358015a0.
- [36] Sjoblom, T., Jones, S., Wood, L. D., Parsons, D. W. et al., The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science (New York, N.Y.)* 2006, *314*, 268–274. doi:10.1126/science.1133427.
- [37] Fodde, R., The APC gene in colorectal cancer. *European Journal of Cancer* 2002, *38*, 867–871. doi:10.1016/S0959-8049(02)00040-0.
- [38] Fearon, E. R., Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual review of pathology* 2011, *6*, 479–507. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130235.
- [39] Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J. G. et al., CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999, *96*, 8681–8686. doi:10.1073/pnas.96.15.8681.
- [40] Ehrlich, M., DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* 2009, *1*, 239–259. doi:10.2217/epi.09.33.
- [41] Trachootham, D., Alexandre, J., Huang, P., Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature reviews. Drug discovery* 2009, *8*, 579–591. doi:10.1038/nrd2803.
- [42] Schipper, H. M., Pantopoulos, K. (Eds.), *Principles of free radical biomedicine: Vol. 1*, Nova Biomedical Books, New York 2012.
- [43] Ray, P. D., Huang, B.-W., Tsuji, Y., Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling* 2012, *24*, 981–990. doi:10.1016/j.cellsig.2012.01.008.
- [44] Schieber, M., Chandel, N. S., ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology : CB* 2014, *24*, R453–62. doi:10.1016/j.cub.2014.03.034.

- [45] Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., Victor, V. M., Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016, 2016, 1245049. doi:10.1155/2016/1245049.
- [46] Reczek, C. R., Chandel, N. S., The Two Faces of Reactive Oxygen Species in Cancer. *Annu. Rev. Cancer Biol.* 2017, 1, 79–98. doi:10.1146/annurev-cancerbio-041916-065808.
- [47] Chio, I. I. C., Tuveson, D. A., ROS in Cancer: The Burning Question. *Trends in molecular medicine* 2017, 23, 411–429. doi:10.1016/j.molmed.2017.03.004.
- [48] Helfinger, V., Schröder, K., Redox control in cancer development and progression. *Molecular aspects of medicine* 2018. doi:10.1016/j.mam.2018.02.003.
- [49] Mitchell, S., Vargas, J., Hoffmann, A., Signaling via the NFκB system. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine* 2016, 8, 227–241. doi:10.1002/wsbm.1331.
- [50] Bonizzi, G., Karin, M., The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in immunology* 2004, 25, 280–288. doi:10.1016/j.it.2004.03.008.
- [51] Karin, M., How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* 1999, 18, 6867–6874. doi:10.1038/sj.onc.1203219.
- [52] Morgan, M. J., Liu, Z.-g., Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell research* 2011, 21, 103–115. doi:10.1038/cr.2010.178.
- [53] Toledano, M. B., Leonard, W. J., Modulation of transcription factor NF-kappa B binding activity by oxidation-reduction in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991, 88, 4328–4332.
- [54] Schoonbroodt, S., Ferreira, V., Best-Belpomme, M., Boelaert, J. R. et al., Crucial role of the amino-terminal tyrosine residue 42 and the carboxyl-terminal PEST domain of I kappa B alpha in NF-kappa B activation by an oxidative stress. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2000, 164, 4292–4300.
- [55] Fan, C., Li, Q., Ross, D., Engelhardt, J. F., Tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha activates NF kappa B through a redox-regulated and c-Src-dependent mechanism following hypoxia/reoxygenation. *The Journal of biological chemistry* 2003, 278, 2072–2080. doi:10.1074/jbc.M206718200.
- [56] Gloire, G., Legrand-Poels, S., Piette, J., NF-kappaB activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochemical pharmacology* 2006, 72, 1493–1505. doi:10.1016/j.bcp.2006.04.011.
- [57] Gloire, G., Piette, J., Redox regulation of nuclear post-translational modifications during NF-kappaB activation. *Antioxidants & redox signaling* 2009, 11, 2209–2222. doi:10.1089/ars.2009.2463.
- [58] Sakamoto, K., Maeda, S., Hikiba, Y., Nakagawa, H. et al., Constitutive NF-kappaB activation in colorectal carcinoma plays a key role in angiogenesis, promoting tumor growth. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009, 15, 2248–2258. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1383.
- [59] Wang, S., Liu, Z., Wang, L., Zhang, X., NF-kappaB signaling pathway, inflammation and colorectal cancer. *Cellular & molecular immunology* 2009, 6, 327–334. doi:10.1038/cmi.2009.43.
- [60] Bruttel, V. S., Wischhusen, J., Cancer stem cell immunology: Key to understanding tumorigenesis and tumor immune escape? *Frontiers in immunology* 2014, 5, 360. doi:10.3389/fimmu.2014.00360.
- [61] Garza-Treviño, E. N., Said-Fernández, S. L., Martínez-Rodríguez, H. G., Understanding the colon cancer stem cells and perspectives on treatment. *Cancer cell international* 2015, 15, 2. doi:10.1186/s12935-015-0163-7.
- [62] Papp, L. V., Lu, J., Holmgren, A., Khanna, K. K., From Selenium to Selenoproteins: Synthesis, Identity, and Their Role in Human Health. *Antioxidants & redox signaling* 2007, 9, 775–806. doi:10.1089/ars.2007.1528.
- [63] Oldfield, J. E., A brief history of selenium research: from alkali disease to prostate cancer (from poison to prevention). *Anim. Sci. Online supplement* 2002, 1–4.

- [64] Schwarz, K., Foltz, C. M., SELENIUM AS AN INTEGRAL PART OF FACTOR 3 AGAINST DIETARY NECROTIC LIVER DEGENERATION. *J. Am. Chem. Soc.* 1957, 79, 3292–3293. doi:10.1021/ja01569a087.
- [65] Hawkes, W. C., Tappel, A. L., In vitro synthesis of glutathione peroxidase from selenite Translational incorporation of selenocysteine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1983, 739, 225–234. doi:10.1016/0167-4781(83)90033-7.
- [66] Rayman, M. P., Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. *The British journal of nutrition* 2008, 100, 254–268. doi:10.1017/S0007114508939830.
- [67] Kipp, A. P., Strohm, D., Brigelius-Flohe, R., Schomburg, L. et al., Revised reference values for selenium intake. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)* 2015, 32, 195–199. doi:10.1016/j.jtemb.2015.07.005.
- [68] Rayman, M. P., Selenium and human health. *The Lancet* 2012, 379, 1256–1268. doi:10.1016/S0140-6736(11)61452-9.
- [69] Yin, X., Yuan, L. (Eds.), *Phytoremediation and Biofortification*, Springer Netherlands, Dordrecht 2012.
- [70] Roman, M., Jitaru, P., Barbante, C., Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics : integrated biometal science* 2014, 6, 25–54. doi:10.1039/c3mt00185g.
- [71] European Food Safety Authority, *Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals*, European Food Safety Authority, Parma 2006.
- [72] Vinceti, M., Filippini, T., Cilloni, S., Crespi, C. M., The Epidemiology of Selenium and Human Cancer. *Advances in cancer research* 2017, 136, 1–48. doi:10.1016/bs.acr.2017.07.001.
- [73] Combs, G. F., Biomarkers of selenium status. *Nutrients* 2015, 7, 2209–2236. doi:10.3390/nu7042209.
- [74] Vinceti, M., Filippini, T., Cilloni, S., Bargellini, A. et al., Health risk assessment of environmental selenium: Emerging evidence and challenges (Review). *Molecular medicine reports* 2017, 15, 3323–3335. doi:10.3892/mmr.2017.6377.
- [75] Lee, B. J., Worland, P. J., Davis, J. N., Stadtman, T. C., Hatfield, D. L., Identification of a selenocysteyl-tRNA(Ser) in mammalian cells that recognizes the nonsense codon, UGA. *The Journal of biological chemistry* 1989, 264, 9724–9727.
- [76] Berry, M. J., Banu, L., Harney, J. W., Larsen, P. R., Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine insertion at UGA codons. *The EMBO journal* 1993, 12, 3315–3322.
- [77] Latreche, L., Duhieu, S., Touat-Hamici, Z., Jean-Jean, O., Chavatte, L., The differential expression of glutathione peroxidase 1 and 4 depends on the nature of the SECIS element. *RNA biology* 2012, 9, 681–690. doi:10.4161/rna.20147.
- [78] Low, S. C., Grundner-Culemann, E., Harney, J. W., Berry, M. J., SECIS-SBP2 interactions dictate selenocysteine incorporation efficiency and selenoprotein hierarchy. *The EMBO journal* 2000, 19, 6882–6890. doi:10.1093/emboj/19.24.6882.
- [79] Xu, X.-M., Carlson, B. A., Mix, H., Zhang, Y. et al., la. *PLoS biology* 2007, 5, e4. doi:10.1371/journal.pbio.0050004.
- [80] Copeland, P. R., Stepanik, V. A., Driscoll, D. M., Insight into mammalian selenocysteine insertion: domain structure and ribosome binding properties of Sec insertion sequence binding protein 2. *Molecular and cellular biology* 2001, 21, 1491–1498. doi:10.1128/MCB.21.5.1491-1498.2001.
- [81] Zavacki, A. M., Mansell, J. B., Chung, M., Klimovitsky, B. et al., Coupled tRNA^{Sec}-Dependent Assembly of the Selenocysteine Decoding Apparatus. *Molecular Cell* 2003, 11, 773–781. doi:10.1016/S1097-2765(03)00064-9.
- [82] Tujebajeva, R. M., Copeland, P. R., Xu, X.-M., Carlson, B. A. et al., Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion. *EMBO reports* 2000, 1, 158–163. doi:10.1093/embo-reports/kvd033.
- [83] Fagegaltier, D., Hubert, N., Yamada, K., Mizutani, T. et al., Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation. *The EMBO journal* 2000, 19, 4796–4805. doi:10.1093/emboj/19.17.4796.

- [84] Chavatte, L., Brown, B. A., Driscoll, D. M., Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes. *Nature structural & molecular biology* 2005, 12, 408–416. doi:10.1038/nsmb922.
- [85] Burk, R. F., Hill, K. E., Regulation of Selenium Metabolism and Transport. *Annual review of nutrition* 2015, 35, 109–134. doi:10.1146/annurev-nutr-071714-034250.
- [86] Diamond, A. M., Choi, I. S., Crain, P. F., Hashizume, T. et al., Dietary selenium affects methylation of the wobble nucleoside in the anticodon of selenocysteine tRNA(SerSec). *The Journal of biological chemistry* 1993, 268, 14215–14223.
- [87] Carlson, B. A., Xu, X.-M., Gladyshev, V. N., Hatfield, D. L., Selective rescue of selenoprotein expression in mice lacking a highly specialized methyl group in selenocysteine tRNA. *The Journal of biological chemistry* 2005, 280, 5542–5548. doi:10.1074/jbc.M411725200.
- [88] Carlson, B. A., Moustafa, M. E., Sengupta, A., Schweizer, U. et al., Selective restoration of the selenoprotein population in a mouse hepatocyte selenoproteinless background with different mutant selenocysteine tRNAs lacking Um34. *The Journal of biological chemistry* 2007, 282, 32591–32602. doi:10.1074/jbc.M707036200.
- [89] Seyedali, A., Berry, M. J., Nonsense-mediated decay factors are involved in the regulation of selenoprotein mRNA levels during selenium deficiency. *RNA (New York, N.Y.)* 2014, 20, 1248–1256. doi:10.1261/rna.043463.113.
- [90] Squires, J. E., Stoytchev, I., Forry, E. P., Berry, M. J., SBP2 binding affinity is a major determinant in differential selenoprotein mRNA translation and sensitivity to nonsense-mediated decay. *Molecular and cellular biology* 2007, 27, 7848–7855. doi:10.1128/MCB.00793-07.
- [91] Howard, M. T., Carlson, B. A., Anderson, C. B., Hatfield, D. L., Translational redefinition of UGA codons is regulated by selenium availability. *The Journal of biological chemistry* 2013, 288, 19401–19413. doi:10.1074/jbc.M113.481051.
- [92] Budiman, M. E., Bubenik, J. L., Miniard, A. C., Middleton, L. M. et al., Eukaryotic initiation factor 4a3 is a selenium-regulated RNA-binding protein that selectively inhibits selenocysteine incorporation. *Molecular Cell* 2009, 35, 479–489. doi:10.1016/j.molcel.2009.06.026.
- [93] Miniard, A. C., Middleton, L. M., Budiman, M. E., Gerber, C. A., Driscoll, D. M., Nucleolin binds to a subset of selenoprotein mRNAs and regulates their expression. *Nucleic acids research* 2010, 38, 4807–4820. doi:10.1093/nar/gkq247.
- [94] DING, F., GRABOWSKI, P. J., Identification of a protein component of a mammalian tRNA^{Sec} complex implicated in the decoding of UGA as selenocysteine. *RNA* 1999, 5, 1561–1569. doi:10.1017/S1355838299991598.
- [95] Xu, X.-M., Mix, H., Carlson, B. A., GRABOWSKI, P. J. et al., Evidence for direct roles of two additional factors, SECp43 and soluble liver antigen, in the selenoprotein synthesis machinery. *The Journal of biological chemistry* 2005, 280, 41568–41575. doi:10.1074/jbc.M506696200.
- [96] Vindry, C., Ohlmann, T., Chavatte, L., Translation regulation of mammalian selenoproteins. *Biochimica et biophysica acta* 2018. doi:10.1016/j.bbagen.2018.05.010.
- [97] Renko, K., Hofmann, P. J., Stoedter, M., Hollenbach, B. et al., Down-regulation of the hepatic selenoprotein biosynthesis machinery impairs selenium metabolism during the acute phase response in mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2009, 23, 1758–1765. doi:10.1096/fj.08-119370.
- [98] Touat-Hamici, Z., Legrain, Y., Bulteau, A.-L., Chavatte, L., Selective up-regulation of human selenoproteins in response to oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* 2014, 289, 14750–14761. doi:10.1074/jbc.M114.551994.
- [99] Stoytcheva, Z. R., Berry, M. J., Transcriptional regulation of mammalian selenoprotein expression. *Biochimica et biophysica acta* 2009, 1790, 1429–1440. doi:10.1016/j.bbagen.2009.05.012.
- [100] Dubey, A., Copeland, P. R., The Selenocysteine-Specific Elongation Factor Contains Unique Sequences That Are Required for Both Nuclear Export and Selenocysteine Incorporation. *PLoS one* 2016, 11, e0165642. doi:10.1371/journal.pone.0165642.

- [101] Gladyshev, V. N., Arner, E. S., Berry, M. J., Brigelius-Flohe, R. et al., Selenoprotein Gene Nomenclature. *The Journal of biological chemistry* 2016. doi:10.1074/jbc.M116.756155.
- [102] Brigelius-Flohe, R., Maiorino, M., Glutathione peroxidases. *Biochimica et biophysica acta* 2013, 1830, 3289–3303. doi:10.1016/j.bbagen.2012.11.020.
- [103] Flemer, S., Selenol protecting groups in organic chemistry: Special emphasis on selenocysteine Se-protection in solid phase peptide synthesis. *Molecules (Basel, Switzerland)* 2011, 16, 3232–3251. doi:10.3390/molecules16043232.
- [104] Stadtman, T. C., Selenocysteine. *Annual review of biochemistry* 1996, 65, 83–100. doi:10.1146/annurev.bi.65.070196.000503.
- [105] Arner, E. S. J., Selenoproteins-What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? *Experimental cell research* 2010, 316, 1296–1303. doi:10.1016/j.yexcr.2010.02.032.
- [106] Jakupoglu, C., Przemec, G. K. H., Schneider, M., Moreno, S. G. et al., Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development. *Molecular and cellular biology* 2005, 25, 1980–1988. doi:10.1128/MCB.25.5.1980-1988.2005.
- [107] Imai, H., Hirao, F., Sakamoto, T., Sekine, K. et al., Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene. *Biochemical and biophysical research communications* 2003, 305, 278–286.
- [108] Medina, D., Mechanisms of selenium inhibition of tumorigenesis. *Advances in experimental medicine and biology* 1986, 206, 465–472.
- [109] Combs, G., Chemopreventive Agents Selenium. *Pharmacology & Therapeutics* 1998, 79, 179–192. doi:10.1016/S0163-7258(98)00014-X.
- [110] Combs, G. F., JR, Current evidence and research needs to support a health claim for selenium and cancer prevention. *The Journal of nutrition* 2005, 135, 343–347.
- [111] World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research, *Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: A global perspective*, http://www.aicr.org/assets/docs/pdf/reports/Second_Expert_Report.pdf.
- [112] World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research, *Diet, nutrition, physical activity and cancer: A global perspective*, <https://www.wcrf.org/dietandcancer/contents>.
- [113] Vinceti, M., Dennert, G., Crespi, C. M., Zwahlen, M. et al., Selenium for preventing cancer. *The Cochrane database of systematic reviews* 2014, CD005195. doi:10.1002/14651858.CD005195.pub3.
- [114] Hughes, D. J., Fedirko, V., Jenab, M., Schomburg, L. et al., Selenium status is associated with colorectal cancer risk in the European prospective investigation of cancer and nutrition cohort. *International journal of cancer* 2015, 136, 1149–1161. doi:10.1002/ijc.29071.
- [115] Méplan, C., Hesketh, J., The influence of selenium and selenoprotein gene variants on colorectal cancer risk. *Mutagenesis* 2012, 27, 177–186. doi:10.1093/mutage/ger058.
- [116] KOGATA, M., KOBAYASHI, M., YAMAMURA, M., HIOKI, K., YAMAMOTO, M., Selenium Levels in Malignant and Normal Tissues of Gastrointestinal Cancer Patients. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 1988, 5, 93–101. doi:10.3164/jcbs.5.93.
- [117] Charalabopoulos, K., Kotsalos, A., Batistatou, A., Charalabopoulos, A. et al., Serum and tissue selenium levels in gastric cancer patients and correlation with CEA. *Anticancer research* 2009, 29, 3465–3467.
- [118] Short, S. P., Williams, C. S., Selenoproteins in Tumorigenesis and Cancer Progression. *Advances in cancer research* 2017, 136, 49–83. doi:10.1016/bs.acr.2017.08.002.
- [119] Flohe, L., Günzler, W. A., Schock, H. H., Glutathione peroxidase: A selenoenzyme. *FEBS Letters* 1973, 32, 132–134. doi:10.1016/0014-5793(73)80755-0.
- [120] Flohé, L., SCHLEGEL, W., Glutathion-Peroxidase, IV 1–3, Intrazelluläre Verteilung des Glutathion-Peroxidase-Systems in der Rattenleber. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 1971, 352, 1401–1410. doi:10.1515/bchm2.1971.352.2.1401.

- [121] Esworthy, R. S., Ho, Y. S., Chu, F. F., The Gpx1 gene encodes mitochondrial glutathione peroxidase in the mouse liver. *Archives of biochemistry and biophysics* 1997, *340*, 59–63. doi:10.1006/abbi.1997.9901.
- [122] Singh, A. K., Dhaunsi, G. S., Gupta, M. P., Orak, J. K. et al., Demonstration of glutathione peroxidase in rat liver peroxisomes and its intraorganellar distribution. *Archives of biochemistry and biophysics* 1994, *315*, 331–338. doi:10.1006/abbi.1994.1508.
- [123] Flohé, L., Toppo, S., Cozza, G., Ursini, F., A comparison of thiol peroxidase mechanisms. *Antioxidants & redox signaling* 2011, *15*, 763–780. doi:10.1089/ars.2010.3397.
- [124] Ramos Martínez, J. I., Díaz García, R., Galarza, A. M., The kinetic mechanism of glutathione peroxidase from human platelets. *Thrombosis Research* 1982, *27*, 197–203. doi:10.1016/0049-3848(82)90199-2.
- [125] Marinho, H.S., Antunes, F., Pinto, R. E., Role of Glutathione Peroxidase and Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase in the Reduction of Lysophospholipid Hydroperoxides. *Free Radical Biology and Medicine* 1997, *22*, 871–883. doi:10.1016/S0891-5849(96)00468-6.
- [126] Barnes, K. M., Evenson, J. K., Raines, A. M., Sunde, R. A., Transcript analysis of the selenoproteome indicates that dietary selenium requirements of rats based on selenium-regulated selenoprotein mRNA levels are uniformly less than those based on glutathione peroxidase activity. *The Journal of nutrition* 2009, *139*, 199–206. doi:10.3945/jn.108.098624.
- [127] Baliga, M. S., Wang, H., Zhuo, P., Schwartz, J. L., Diamond, A. M., Selenium and GPx-1 overexpression protect mammalian cells against UV-induced DNA damage. *Biological trace element research* 2007, *115*, 227–242. doi:10.1007/BF02685998.
- [128] Liu, J., Hinkhouse, M. M., Sun, W., Weydert, C. J. et al., Redox regulation of pancreatic cancer cell growth: Role of glutathione peroxidase in the suppression of the malignant phenotype. *Human gene therapy* 2004, *15*, 239–250. doi:10.1089/104303404322886093.
- [129] Min, S. Y., Kim, H. S., Jung, E. J., Jung, E. J. et al., Prognostic significance of glutathione peroxidase 1 (GPX1) down-regulation and correlation with aberrant promoter methylation in human gastric cancer. *Anticancer Res* 2012, *32*, 3169–3175.
- [130] Jin, L., Li, D., Alesi, G. N., Fan, J. et al., Glutamate dehydrogenase 1 signals through antioxidant glutathione peroxidase 1 to regulate redox homeostasis and tumor growth. *Cancer cell* 2015, *27*, 257–270. doi:10.1016/j.ccell.2014.12.006.
- [131] Li, S., Yan, T., Yang, J. Q., Oberley, T. D., Oberley, L. W., The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer research* 2000, *60*, 3927–3939.
- [132] Lu, Y. P., Lou, Y. R., Yen, P., Newmark, H. L. et al., Enhanced skin carcinogenesis in transgenic mice with high expression of glutathione peroxidase or both glutathione peroxidase and superoxide dismutase. *Cancer research* 1997, *57*, 1468–1474.
- [133] Méplan, C., Hesketh, J., Selenium and cancer: A story that should not be forgotten—insights from genomics. *Cancer treatment and research* 2014, *159*, 145–166. doi:10.1007/978-3-642-38007-5_9.
- [134] Chu, F. F., Doroshov, J. H., Esworthy, R. S., Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *The Journal of biological chemistry* 1993, *268*, 2571–2576.
- [135] Brigelius-Flohé, R., Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free radical biology & medicine* 1999, *27*, 951–965.
- [136] Wingler, K., Böcher, M., Flohé, L., Kollmus, H., Brigelius-Flohé, R., mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of $\frac{1}{2}$ selenoproteins. *Eur J Biochem* 1999, *259*, 149–157. doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00012.x.
- [137] Wingler, K., Müller, C., Schmehl, K., Florian, S., Brigelius-Flohé, R., Gastrointestinal glutathione peroxidase prevents transport of lipid hydroperoxides in CaCo-2 cells. *Gastroenterology* 2000, *119*, 420–430.

- [138] Komatsu, H., Okayasu, I., Mitomi, H., Imai, H. et al., Immunohistochemical detection of human gastrointestinal glutathione peroxidase in normal tissues and cultured cells with novel mouse monoclonal antibodies. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 2001, 49, 759–766. doi:10.1177/002215540104900609.
- [139] Chu, F. F., Esworthy, R. S., Lee, L., Wilczynski, S., Retinoic acid induces Gpx2 gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *The Journal of nutrition* 1999, 129, 1846–1854.
- [140] Singh, A., Rangasamy, T., Thimmulappa, R. K., Lee, H. et al., Glutathione peroxidase 2, the major cigarette smoke-inducible isoform of GPX in lungs, is regulated by Nrf2. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2006, 35, 639–650. doi:10.1165/rcmb.2005-0325OC.
- [141] Florian, S., Wingler, K., Schmehl, K., Jacobasch, G. et al., Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue. *Free Radical Research* 2001, 35, 655–663.
- [142] Kipp, A., Banning, A., Brigelius-Flohé, R., Activation of the glutathione peroxidase 2 (GPx2) promoter by beta-catenin. *Biological chemistry* 2007, 388, 1027–1033. doi:10.1515/BC.2007.137.
- [143] Kipp, A. P., Muller, M. F., Goken, E. M., Deubel, S., Brigelius-Flohe, R., The selenoproteins GPx2, TrxR2 and TrxR3 are regulated by Wnt signalling in the intestinal epithelium. *Biochimica et biophysica acta* 2012, 1820, 1588–1596. doi:10.1016/j.bbagen.2012.05.016.
- [144] Mah, A. T., Yan, K. S., Kuo, C. J., Wnt pathway regulation of intestinal stem cells. *The Journal of physiology* 2016, 594, 4837–4847. doi:10.1113/JP271754.
- [145] Dannenmann, B., Lehle, S., Hildebrand, D. G., Kübler, A. et al., High glutathione and glutathione peroxidase-2 levels mediate cell-type-specific DNA damage protection in human induced pluripotent stem cells. *Stem cell reports* 2015, 4, 886–898. doi:10.1016/j.stemcr.2015.04.004.
- [146] Baek, I.-J., Yon, J.-M., Lee, S.-R., Kim, M.-R. et al., Differential expression of gastrointestinal glutathione peroxidase (GI-GPx) gene during mouse organogenesis. *Anatomia, histologia, embryologia* 2011, 40, 210–218. doi:10.1111/j.1439-0264.2010.01061.x.
- [147] Te Velde, A. A., Pronk, I., Kort, F. de, Stokkers, P. C. F., Glutathione peroxidase 2 and aquaporin 8 as new markers for colonic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases: An important role for H₂O₂? *European journal of gastroenterology & hepatology* 2008, 20, 555–560. doi:10.1097/MEG.0b013e3282f45751.
- [148] Esworthy, R. S., Aranda, R., Martin, M. G., Doroshov, J. H. et al., Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 2001, 281, G848-55.
- [149] Esworthy, R. S., Yang, L., Frankel, P. H., Chu, F.-F., Epithelium-specific glutathione peroxidase, Gpx2, is involved in the prevention of intestinal inflammation in selenium-deficient mice. *The Journal of nutrition* 2005, 135, 740–745.
- [150] Banning, A., Florian, S., Deubel, S., Thalmann, S. et al., GPx2 counteracts PGE₂ production by dampening COX-2 and mPGES-1 expression in human colon cancer cells. *Antioxidants & redox signaling* 2008, 10, 1491–1500. doi:10.1089/ars.2008.2047.
- [151] Serewko, M. M., Popa, C., Dahler, A. L., Smith, L. et al., Alterations in gene expression and activity during squamous cell carcinoma development. *Cancer research* 2002, 62, 3759–3765.
- [152] Mork, H., al-Taie, O. H., Bahr, K., Zierer, A. et al., Inverse mRNA expression of the selenocysteine-containing proteins GI-GPx and SeP in colorectal adenomas compared with adjacent normal mucosa. *Nutrition and cancer* 2000, 37, 108–116. doi:10.1207/S15327914NC3701_14.
- [153] Krehl, S., Loewinger, M., Florian, S., Kipp, A. P. et al., Glutathione peroxidase-2 and selenium decreased inflammation and tumors in a mouse model of inflammation-associated carcinogenesis whereas sulforaphane effects differed with selenium supply. *Carcinogenesis* 2012, 33, 620–628. doi:10.1093/carcin/bgr288.

- [154] Müller, M. F., Florian, S., Pommer, S., Osterhoff, M. et al., Deletion of glutathione peroxidase-2 inhibits azoxymethane-induced colon cancer development. *PLoS one* 2013, 8, e72055. doi:10.1371/journal.pone.0072055.
- [155] Banning, A., Kipp, A., Schmitmeier, S., Löwinger, M. et al., Glutathione Peroxidase 2 Inhibits Cyclooxygenase-2-Mediated Migration and Invasion of HT-29 Adenocarcinoma Cells but Supports Their Growth as Tumors in Nude Mice. *Cancer research* 2008, 68, 9746–9753. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1321.
- [156] Emmink, B. L., Laoukili, J., Kipp, A. P., Koster, J. et al., GPx2 suppression of H₂O₂ stress links the formation of differentiated tumor mass to metastatic capacity in colorectal cancer. *Cancer research* 2014, 74, 6717–6730. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1645.
- [157] Sousa E Melo, F. de, Wang, X., Jansen, M., Fessler, E. et al., Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nature medicine* 2013, 19, 614–618. doi:10.1038/nm.3174.
- [158] Kryukov, G. V., Castellano, S., Novoselov, S. V., Lobanov, A. V. et al., Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science (New York, N.Y.)* 2003, 300, 1439–1443. doi:10.1126/science.1083516.
- [159] Dikiy, A., Novoselov, S. V., Fomenko, D. E., Sengupta, 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, 6871–6882. doi:10.1021/bi602462q.
- [160] Novoselov, S. V., Kryukov, G. V., Xu, X.-M., Carlson, B. A. et al., Selenoprotein H is a nucleolar thioredoxin-like protein with a unique expression pattern. *The Journal of biological chemistry* 2007, 282, 11960–11968. doi:10.1074/jbc.M701605200.
- [161] Kipp, A., Banning, A., van Schothorst, E. M., Meplan, C. et al., Four selenoproteins, protein biosynthesis, and Wnt signalling are particularly sensitive to limited selenium intake in mouse colon. *Molecular nutrition & food research* 2009, 53, 1561–1572. doi:10.1002/mnfr.200900105.
- [162] Kipp, A. P., Frombach, J., Deubel, S., Brigelius-Flohe, R., Selenoprotein W as biomarker for the efficacy of selenium compounds to act as source for selenoprotein biosynthesis. *Methods in enzymology* 2013, 527, 87–112. doi:10.1016/B978-0-12-405882-8.00005-2.
- [163] Morozova, N., Forry, E. P., Shahid, E., Zavacki, A. M. et al., Antioxidant function of a novel selenoprotein in *Drosophila melanogaster*. *Genes Cells* 2003, 8, 963–971. doi:10.1046/j.1365-2443.2003.00687.x.
- [164] Ben Jilani, K. E., Overexpression of Selenoprotein H Reduces Ht22 Neuronal Cell Death after UVB Irradiation by Preventing Superoxide Formation. *Int. J. Biol. Sci.* 2007, 198–204. doi:10.7150/ijbs.3.198.
- [165] Mendeleev, N., Witherspoon, S., Li, P. A., Overexpression of human selenoprotein H in neuronal cells ameliorates ultraviolet irradiation-induced damage by modulating cell signaling pathways. *Experimental neurology* 2009, 220, 328–334. doi:10.1016/j.expneurol.2009.09.008.
- [166] Mendeleev, N., Mehta, S. L., Witherspoon, S., He, Q. et al., Upregulation of human selenoprotein H in murine hippocampal neuronal cells promotes mitochondrial biogenesis and functional performance. *Mitochondrion* 2011, 11, 76–82. doi:10.1016/j.mito.2010.07.007.
- [167] Mehta, S. L., Mendeleev, N., Kumari, S., Andy Li, P., Overexpression of human selenoprotein H in neuronal cells enhances mitochondrial biogenesis and function through activation of protein kinase A, protein kinase B, and cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein pathway. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2013, 45, 604–611. doi:10.1016/j.biocel.2012.11.022.
- [168] Panee, J., Stoytcheva, Z. R., Liu, W., Berry, M. J., 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. *The Journal of biological chemistry* 2007, 282, 23759–23765. doi:10.1074/jbc.M702267200.
- [169] Varlamova, E. G., Goltyaev, M. V., Fesenko, E. E., Expression of human selenoprotein genes selh, selk, selm, sels, selv, and gpx-6 in various tumor cell lines. *Doklady. Biochemistry and biophysics* 2016, 468, 203–205. doi:10.1134/S1607672916030121.

- [170] Wu, R. T. Y., Cao, L., Chen, B. P. C., Cheng, W.-H., Selenoprotein H suppresses cellular senescence through genome maintenance and redox regulation. *The Journal of biological chemistry* 2014, 289, 34378–34388. doi:10.1074/jbc.M114.611970.
- [171] Cox, A. G., Tsomides, A., Kim, A. J., Saunders, D. et al., Selenoprotein H is an essential regulator of redox homeostasis that cooperates with p53 in development and tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2016, 113, E5562–71. doi:10.1073/pnas.1600204113.
- [172] Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976, 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [173] Bocher, M., Boldicke, T., Kiess, M., Bilitewski, U., Synthesis of mono- and bifunctional peptide-dextran conjugates for the immobilization of peptide antigens on ELISA plates: properties and application. *Journal of immunological methods* 1997, 208, 191–202.
- [174] Brigelius-Flohe, R., Winkler, K., Muller, C., Estimation of individual types of glutathione peroxidases. *Methods in enzymology* 2002, 347, 101–112.
- [175] Emmink, B. L., van Houdt, W. J., Vries, R. G., Hoogwater, F. J. H. et al., Differentiated human colorectal cancer cells protect tumor-initiating cells from irinotecan. *Gastroenterology* 2011, 141, 269–278. doi:10.1053/j.gastro.2011.03.052.
- [176] Marshall, O. J., PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2004, 20, 2471–2472. doi:10.1093/bioinformatics/bth254.
- [177] Borenfreund, E., Puerner, J. A., Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology letters* 1985, 24, 119–124.
- [178] Brigelius-Flohe, R., Kipp, A., Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis. *Biochimica et biophysica acta* 2009, 1790, 1555–1568. doi:10.1016/j.bbagen.2009.03.006.
- [179] Kull, F. C., JR, Cuatrecasas, P., Estimation of cell number by neutral red content. Applications for proliferative and survival assays. *Applied biochemistry and biotechnology* 1983, 8, 97–103.
- [180] Lowik, C.W.G.M., Alblas, M. J., Vanderuit, M., Papapoulos, S. E., Vanderpluijm, G., Quantification of Adherent and Nonadherent Cells Cultured in 96-Well Plates Using the Supravital Stain Neutral Red. *Analytical Biochemistry* 1993, 213, 426–433. doi:10.1006/abio.1993.1442.
- [181] Darmoul, D., Lacasa, M., Baricault, L., Marguet, D. et al., Dipeptidyl peptidase IV (CD 26) gene expression in enterocyte-like colon cancer cell lines HT-29 and Caco-2. Cloning of the complete human coding sequence and changes of dipeptidyl peptidase IV mRNA levels during cell differentiation. *The Journal of biological chemistry* 1992, 267, 4824–4833.
- [182] Schlieve, C. R., Mojica, S. G., Holoyda, K. A., Hou, X. et al., Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Bioavailability Regulates Angiogenesis and Intestinal Stem and Progenitor Cell Proliferation during Postnatal Small Intestinal Development. *PLoS ONE* 2016, 11, e0151396. doi:10.1371/journal.pone.0151396.
- [183] Takahashi, H., Suzuki, Y., Nishimura, J., Haraguchi, N. et al., Characteristics of carbonic anhydrase 9 expressing cells in human intestinal crypt base. *International journal of oncology* 2016, 48, 115–122. doi:10.3892/ijo.2015.3260.
- [184] Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P. et al., Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 2007, 449, 1003–1007. doi:10.1038/nature06196.
- [185] Hirsch, D., Barker, N., McNeil, N., Hu, Y. et al., LGR5 positivity defines stem-like cells in colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2014, 35, 849–858. doi:10.1093/carcin/bgt377.
- [186] van der Flier, Laurens G, van Gijn, M. E., Hatzis, P., Kujala, P. et al., Transcription factor achaete scute-like 2 controls intestinal stem cell fate. *Cell* 2009, 136, 903–912. doi:10.1016/j.cell.2009.01.031.
- [187] Mani, S. A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E. N. et al., The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008, 133, 704–715. doi:10.1016/j.cell.2008.03.027.

- [188] Bae, Y. H., Mrsny, R. J., Park, K. (Eds.), *Cancer Targeted Drug Delivery: An Elusive Dream*, Springer New York, New York, NY, s.l. 2013.
- [189] Takeyama, Y., Sato, M., Horio, M., Hase, T. et al., Knockdown of ZEB1, a master epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) gene, suppresses anchorage-independent cell growth of lung cancer cells. *Cancer letters* 2010, 296, 216–224. doi:10.1016/j.canlet.2010.04.008.
- [190] Hardy, R. G., Tselepis, C., Hoyland, J., Wallis, Y. et al., Aberrant P-cadherin expression is an early event in hyperplastic and dysplastic transformation in the colon. *Gut* 2002, 50, 513–519.
- [191] Sun, L., Hu, H., Peng, L., Zhou, Z. et al., P-cadherin promotes liver metastasis and is associated with poor prognosis in colon cancer. *The American journal of pathology* 2011, 179, 380–390. doi:10.1016/j.ajpath.2011.03.046.
- [192] Zeuner, A., Todaro, M., Stassi, G., De Maria, R., Colorectal Cancer Stem Cells: From the Crypt to the Clinic. *Cell Stem Cell* 2014, 15, 692–705. doi:10.1016/j.stem.2014.11.012.
- [193] Müller, M.-F., *Die Glutathionperoxidase 2: Physiologische Funktion und Rolle in der Azoxymethan-induzierten Colonkanzerogenese*. Dissertation 2013.
- [194] Li, H., Lin, X., Positive and negative signaling components involved in TNFalpha-induced NF-kappaB activation. *Cytokine* 2008, 41, 1–8. doi:10.1016/j.cyto.2007.09.016.
- [195] Wu, Y., Zhou, B. P., TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *British journal of cancer* 2010, 102, 639–644. doi:10.1038/sj.bjc.6605530.
- [196] Manuel Modräger, *Charakterisierung eines siRNA-vermittelten knock downs der gastrointestinalen Glutathionperoxidase in HT29-Zellen*. Masterarbeit 2014.
- [197] Lubos, E., Kelly, N. J., Oldebeken, S. R., Leopold, J. A. et al., Glutathione peroxidase-1 deficiency augments proinflammatory cytokine-induced redox signaling and human endothelial cell activation. *The Journal of biological chemistry* 2011, 286, 35407–35417. doi:10.1074/jbc.M110.205708.
- [198] Hou, B., Eren, M., Painter, C. A., Covington, J. W. et al., Tumor necrosis factor alpha activates the human plasminogen activator inhibitor-1 gene through a distal nuclear factor kappaB site. *The Journal of biological chemistry* 2004, 279, 18127–18136. doi:10.1074/jbc.M310438200.
- [199] McFarland, B. C., Gray, G. K., Nozell, S. E., Hong, S. W., Benveniste, E. N., Activation of the NF- B Pathway by the STAT3 Inhibitor JSI-124 in Human Glioblastoma Cells. *Molecular Cancer Research* 2013, 11, 494–505. doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0528.
- [200] Yamada, H., Iwase, S., Mohri, M., Kufe, D., Involvement of a nuclear factor-kappa B-like protein in induction of the macrophage colony-stimulating factor gene by tumor necrosis factor. *Blood* 1991, 78, 1988–1995.
- [201] Kaltschmidt, B., Linker, R. A., Deng, J., Kaltschmidt, C., Cyclooxygenase-2 is a neuronal target gene of NF-kappaB. *BMC molecular biology* 2002, 3, 16.
- [202] Ackerman, W. E., Summerfield, T. L. S., Vandre, D. D., Robinson, J. M., Kniss, D. A., Nuclear factor-kappa B regulates inducible prostaglandin E synthase expression in human amnion mesenchymal cells. *Biology of reproduction* 2008, 78, 68–76. doi:10.1095/biolreprod.107.061663.
- [203] Hay, R. T., Vuillard, L., Desterro, J. M. P., Rodriguez, M. S., Control of NF- B transcriptional activation by signal induced proteolysis of I B. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 1999, 354, 1601–1609. doi:10.1098/rstb.1999.0504.
- [204] Lee, F. S., Peters, R. T., Dang, L. C., Maniatis, T., MEKK1 activates both IkappaB kinase alpha and IkappaB kinase beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, 95, 9319–9324.
- [205] Son, Y., Kim, S., Chung, H.-T., Pae, H.-O., Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases. *Methods in enzymology* 2013, 528, 27–48. doi:10.1016/B978-0-12-405881-1.00002-1.
- [206] Li, Q., Sanlioglu, S., Li, S., Ritchie, T. et al., GPx-1 gene delivery modulates NFkappaB activation following diverse environmental injuries through a specific subunit of the IKK complex. *Antioxidants & redox signaling* 2001, 3, 415–432. doi:10.1089/15230860152409068.

- [207] Brigelius-Flohé, R., Overexpression of the Selenoenzyme PHGPX Demonstrates the Involvement of Hydroperoxides in the IL-1-Mediated Activation of NFκB. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* 1998, 136, 321–325. doi:10.1080/10426509808545958.
- [208] Perse, M., Oxidative stress in the pathogenesis of colorectal cancer: cause or consequence? *BioMed research international* 2013, 2013, 725710. doi:10.1155/2013/725710.
- [209] Ashkenazi, A., Pai, R. C., Fong, S., Leung, S. et al., Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *The Journal of clinical investigation* 1999, 104, 155–162. doi:10.1172/JCI6926.
- [210] Yeung, M. C., Accelerated apoptotic DNA laddering protocol. *BioTechniques* 2002, 33, 734, 736.
- [211] Zupanic, A., Meplan, C., Huguenin, G. V. B., Hesketh, J. E., Shanley, D. P., Modeling and gene knockdown to assess the contribution of nonsense-mediated decay, premature termination, and selenocysteine insertion to the selenoprotein hierarchy. *RNA (New York, N.Y.)* 2016, 22, 1076–1084. doi:10.1261/rna.055749.115.
- [212] Horibata, S., Vo, T. V., Subramanian, V., Thompson, P. R., Coonrod, S. A., Utilization of the Soft Agar Colony Formation Assay to Identify Inhibitors of Tumorigenicity in Breast Cancer Cells. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2015, e52727. doi:10.3791/52727.
- [213] Gerard, C., Goldbeter, A., The balance between cell cycle arrest and cell proliferation: control by the extracellular matrix and by contact inhibition. *Interface focus* 2014, 4, 20130075. doi:10.1098/rsfs.2013.0075.
- [214] Iacomino, G., Medici, M. C., Napoli, D., Russo, G. L., Effects of histone deacetylase inhibitors on p53/Cdc20 expression in HT29 cell line. *Journal of cellular biochemistry* 2006, 99, 1122–1131. doi:10.1002/jcb.21014.
- [215] Archer, S. Y., Johnson, J. J., Kim, H. J., Hodin, R. A., p21 gene regulation during enterocyte differentiation. *The Journal of surgical research* 2001, 98, 4–8. doi:10.1006/jsre.2001.6147.
- [216] Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C. et al., *The Impact of Food Bioactives on Health*, Springer International Publishing, Cham 2015.
- [217] Gum, J. R., Kam, W. K., Byrd, J. C., Hicks, J. W. et al., Effects of sodium butyrate on human colonic adenocarcinoma cells. Induction of placental-like alkaline phosphatase. *The Journal of biological chemistry* 1987, 262, 1092–1097.
- [218] Matsumoto, H., Erickson, R. H., Gum, J. R., Yoshioka, M. et al., Biosynthesis of alkaline phosphatase during differentiation of the human colon cancer cell line Caco-2. *Gastroenterology* 1990, 98, 1199–1207.
- [219] Massague, J., G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 2004, 432, 298–306. doi:10.1038/nature03094.
- [220] Yang, B., Cao, L., Liu, B., McCaig, C. D., Pu, J., The transition from proliferation to differentiation in colorectal cancer is regulated by the calcium activated chloride channel A1. *PloS one* 2013, 8, e60861. doi:10.1371/journal.pone.0060861.
- [221] Irons, R., Carlson, B. A., Hatfield, D. L., Davis, C. D., Both selenoproteins and low molecular weight selenocompounds reduce colon cancer risk in mice with genetically impaired selenoprotein expression. *The Journal of nutrition* 2006, 136, 1311–1317.
- [222] Hoffmann, P. R., Hoge, S. C., Li, P. A., Hoffmann, F. W. et al., The selenoproteome exhibits widely varying, tissue-specific dependence on selenoprotein P for selenium supply. *Nucleic acids research* 2007, 35, 3963–3973. doi:10.1093/nar/gkm355.
- [223] Mork, H., Lex, B., Scheurlen, M., Dreher, I. et al., Expression pattern of gastrointestinal selenoproteins--targets for selenium supplementation. *Nutrition and cancer* 1998, 32, 64–70. doi:10.1080/01635589809514720.
- [224] Kipp, Anna P. and Müller, Mike F., in: Brigelius-Flohe, R., Sies, H. (Eds.), *Diversity of selenium functions in health and disease* 2016, pp. 189–202.
- [225] Murawaki, Y., Tsuchiya, H., Kanbe, T., Harada, K. et al., Aberrant expression of selenoproteins in the progression of colorectal cancer. *Cancer letters* 2008, 259, 218–230. doi:10.1016/j.canlet.2007.10.019.

- [226] Thalmann, S., *Funktionsanalyse der gastrointestinalen Glutathionperoxidase durch einen siRNA-vermittelten Knockdown: Regulation der COX-2 Expression in HT-29 Zellen*. Diplomarbeit 2006.
- [227] Gong, G., Méplan, C., Gautrey, H., Hall, J., Hesketh, J. E., Differential effects of selenium and knock-down of glutathione peroxidases on TNF α and flagellin inflammatory responses in gut epithelial cells. *Genes & nutrition* 2012, 7, 167–178. doi:10.1007/s12263-011-0256-4.
- [228] Florian, S., Krehl, S., Loewinger, M., Kipp, A. et al., Loss of GPx2 increases apoptosis, mitosis, and GPx1 expression in the intestine of mice. *Free radical biology & medicine* 2010, 49, 1694–1702. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.029.
- [229] Cheng, W. H., Ho, Y. S., Ross, D. A., Valentine, B. A. et al., Cellular glutathione peroxidase knockout mice express normal levels of selenium-dependent plasma and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases in various tissues. *The Journal of nutrition* 1997, 127, 1445–1450.
- [230] Schröder, M. K., *Substratspezifität und Regulation der selenabhängigen Glutathionperoxidasen GPx1 und GPx2*. Bachelorarbeit 2014.
- [231] Kohno, M., Pouyssegur, J., Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy. *Annals of medicine* 2006, 38, 200–211. doi:10.1080/07853890600551037.
- [232] Tombran-Tink, J., Chader, G. G., Johnson, L. V., PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Experimental eye research* 1991, 53, 411–414.
- [233] Becerra, S. P., Notario, V., The effects of PEDF on cancer biology: mechanisms of action and therapeutic potential. *Nature reviews. Cancer* 2013, 13, 258–271. doi:10.1038/nrc3484.
- [234] Hong, H., Zhou, T., Fang, S., Jia, M. et al., Pigment epithelium-derived factor (PEDF) inhibits breast cancer metastasis by down-regulating fibronectin. *Breast cancer research and treatment* 2014, 148, 61–72. doi:10.1007/s10549-014-3154-9.
- [235] Dorsam, R. T., Gutkind, J. S., G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature reviews. Cancer* 2007, 7, 79–94. doi:10.1038/nrc2069.
- [236] Radu, M., Semenova, G., Kosoff, R., Chernoff, J., Pak Signaling in the Development and Progression of Cancer. *Nature reviews. Cancer* 2014, 14, 13–25.
- [237] Balkwill, F., Tumour necrosis factor and cancer. *Nature reviews. Cancer* 2009, 9, 361–371. doi:10.1038/nrc2628.
- [238] Hilvo, M., Baranauskiene, L., Salzano, A. M., Scaloni, A. et al., Biochemical characterization of CA IX, one of the most active carbonic anhydrase isozymes. *The Journal of biological chemistry* 2008, 283, 27799–27809. doi:10.1074/jbc.M800938200.
- [239] Chiche, J., Ilc, K., Laferriere, J., Trottier, E. et al., Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer research* 2009, 69, 358–368. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2470.
- [240] Svastova, E., Zilka, N., Zat'ovicova, M., Gibadulinova, A. et al., Carbonic anhydrase IX reduces E-cadherin-mediated adhesion of MDCK cells via interaction with beta-catenin. *Experimental cell research* 2003, 290, 332–345.
- [241] Svastova, E., Witariski, W., Csaderova, L., Kosik, I. et al., Carbonic anhydrase IX interacts with bicarbonate transporters in lamellipodia and increases cell migration via its catalytic domain. *The Journal of biological chemistry* 2012, 287, 3392–3402. doi:10.1074/jbc.M111.286062.
- [242] Benej, M., Pastorekova, S., Pastorek, J., Carbonic anhydrase IX: regulation and role in cancer. *Sub-cellular biochemistry* 2014, 75, 199–219. doi:10.1007/978-94-007-7359-2_11.
- [243] Liao, S.-Y., Darcy, K. M., Randall, L. M., Tian, C. et al., Prognostic relevance of carbonic anhydrase-IX in high-risk, early-stage cervical cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic oncology* 2010, 116, 452–458. doi:10.1016/j.ygyno.2009.10.062.
- [244] Hussain, S. A., Ganesan, R., Reynolds, G., Gross, L. et al., Hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX expression is associated with poor survival in patients with invasive breast cancer. *British journal of cancer* 2007, 96, 104–109. doi:10.1038/sj.bjc.6603530.

- [245] Simi, L., Venturini, G., Malentacchi, F., Gelmini, S. et al., Quantitative analysis of carbonic anhydrase IX mRNA in human non-small cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2006, 52, 59–66. doi:10.1016/j.lungcan.2005.11.017.
- [246] Jarvela, S., Parkkila, S., Bragge, H., Kahkonen, M. et al., Carbonic anhydrase IX in oligodendroglial brain tumors. *BMC cancer* 2008, 8, 1. doi:10.1186/1471-2407-8-1.
- [247] Korkeila, E., Talvinen, K., Jaakkola, P. M., Minn, H. et al., Expression of carbonic anhydrase IX suggests poor outcome in rectal cancer. *British journal of cancer* 2009, 100, 874–880. doi:10.1038/sj.bjc.6604949.
- [248] Cianchi, F., Vinci, M. C., Supuran, C. T., Peruzzi, B. et al., Selective Inhibition of Carbonic Anhydrase IX Decreases Cell Proliferation and Induces Ceramide-Mediated Apoptosis in Human Cancer Cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2010, 334, 710–719. doi:10.1124/jpet.110.167270.
- [249] Dai, Y., Wilson, G., Huang, B., Peng, M. et al., Silencing of Jagged1 inhibits cell growth and invasion in colorectal cancer. *Cell death & disease* 2014, 5, e1170. doi:10.1038/cddis.2014.137.
- [250] Qiu, J.-F., Zhang, Z.-Q., Wang, Y., You, J., Lentivirus-mediated RNAi knockdown of VEGFA in RKO colorectal cancer cells decreases tumor formation and growth in vitro and in vivo. *International journal of clinical and experimental pathology* 2012, 5, 290–298.
- [251] Crack, P. J., Taylor, J. M., Flentjar, N. J., Haan, J. de et al., Increased infarct size and exacerbated apoptosis in the glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) knockout mouse brain in response to ischemia/reperfusion injury. *Journal of Neurochemistry* 2001, 78, 1389–1399. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00535.x.
- [252] Fu, Y., Sies, H., Lei, X. G., Opposite roles of selenium-dependent glutathione peroxidase-1 in superoxide generator diquat- and peroxynitrite-induced apoptosis and signaling. *The Journal of biological chemistry* 2001, 276, 43004–43009. doi:10.1074/jbc.M106946200.
- [253] Mariadason, J. M., Bordonaro, M., Aslam, F., Shi, L. et al., Down-regulation of beta-catenin TCF signaling is linked to colonic epithelial cell differentiation. *Cancer research* 2001, 61, 3465–3471.
- [254] Schneikert, J., Behrens, J., The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development. *Gut* 2007, 56, 417–425. doi:10.1136/gut.2006.093310.
- [255] Havre, P. A., Abe, M., Urasaki, Y., Ohnuma, K. et al., The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2008, 13, 1634–1645.
- [256] Lam, C. S.-C., Cheung, A. H.-K., Wong, S. K.-M., Wan, T. M.-H. et al., Prognostic significance of CD26 in patients with colorectal cancer. *PloS one* 2014, 9, e98582. doi:10.1371/journal.pone.0098582.
- [257] Larrinaga, G., Perez, I., Sanz, B., Beitia, M. et al., Dipeptidyl-peptidase IV activity is correlated with colorectal cancer prognosis. *PloS one* 2015, 10, e0119436. doi:10.1371/journal.pone.0119436.
- [258] Pang, R., Law, W. L., Chu, A. C. Y., Poon, J. T. et al., A subpopulation of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. *Cell Stem Cell* 2010, 6, 603–615. doi:10.1016/j.stem.2010.04.001.
- [259] Huels, D. J., Sansom, O. J., Stem vs non-stem cell origin of colorectal cancer. *British journal of cancer* 2015, 113, 1–5. doi:10.1038/bjc.2015.214.
- [260] Barker, N., Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2014, 15, 19–33. doi:10.1038/nrm3721.
- [261] Zhu, R., Yang, Y., Tian, Y., Bai, J. et al., Ascl2 knockdown results in tumor growth arrest by miRNA-302b-related inhibition of colon cancer progenitor cells. *PloS one* 2012, 7, e32170. doi:10.1371/journal.pone.0032170.
- [262] Fabregat, I., Malfettone, A., Soukupova, J., New Insights into the Crossroads between EMT and Stemness in the Context of Cancer. *Journal of clinical medicine* 2016, 5. doi:10.3390/jcm5030037.
- [263] Dohadwala, M., Yang, S.-C., Luo, J., Sharma, S. et al., Cyclooxygenase-2-dependent regulation of E-cadherin: prostaglandin E(2) induces transcriptional repressors ZEB1 and

- snail in non-small cell lung cancer. *Cancer research* 2006, 66, 5338–5345. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3635.
- [264] van Marck, V., Stove, C., Jacobs, K., van den Eynden, G., Bracke, M., P-cadherin in adhesion and invasion: opposite roles in colon and bladder carcinoma. *International journal of cancer* 2011, 128, 1031–1044. doi:10.1002/ijc.25427.
- [265] Okada, H., Woodcock-Mitchell, J., Mitchell, J., Sakamoto, T. et al., Induction of plasminogen activator inhibitor type 1 and type 1 collagen expression in rat cardiac microvascular endothelial cells by interleukin-1 and its dependence on oxygen-centered free radicals. *Circulation* 1998, 97, 2175–2182.
- [266] Swiatkowska, M., Szemraj, J., Cierniewski, C. S., Induction of PAI-1 expression by tumor necrosis factor alpha in endothelial cells is mediated by its responsive element located in the 4G/5G site. *The FEBS journal* 2005, 272, 5821–5831. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04979.x.
- [267] Mazzocchi, G., Pazienza, V., Panza, A., Valvano, M. R. et al., ARNTL2 and SERPINE1: Potential biomarkers for tumor aggressiveness in colorectal cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2012, 138, 501–511. doi:10.1007/s00432-011-1126-6.
- [268] Ehltling, C., Lai, W. S., Schaper, F., Brenndorfer, E. D. et al., Regulation of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA stability by TNF-alpha involves activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 cascade. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2007, 178, 2813–2826.
- [269] Yamamoto, K., Arakawa, T., Ueda, N., Yamamoto, S., Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. *The Journal of biological chemistry* 1995, 270, 31315–31320.
- [270] Perrot-Applanat, M., Vacher, S., Toullec, A., Pelaez, I. et al., Similar NF-kappaB gene signatures in TNF-alpha treated human endothelial cells and breast tumor biopsies. *PloS one* 2011, 6, e21589. doi:10.1371/journal.pone.0021589.
- [271] Jaeschke, H., Ho, Y. S., Fisher, M. A., Lawson, J. A., Farhood, A., Glutathione peroxidase-deficient mice are more susceptible to neutrophil-mediated hepatic parenchymal cell injury during endotoxemia: importance of an intracellular oxidant stress. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 1999, 29, 443–450. doi:10.1002/hep.510290222.
- [272] Jobin, C., Haskill, S., Mayer, L., Panja, A., Sartor, R. B., Evidence for altered regulation of I kappa B alpha degradation in human colonic epithelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 1997, 158, 226–234.
- [273] Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B. W., Shevchenko, A. et al., IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I kappa B kinases essential for NF-kappaB activation. *Science (New York, N.Y.)* 1997, 278, 860–866.
- [274] Li, Z. W., Chu, W., Hu, Y., Delhase, M. et al., The IKKbeta subunit of I kappa B kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *The Journal of experimental medicine* 1999, 189, 1839–1845.
- [275] Solt, L. A., Madge, L. A., Orange, J. S., May, M. J., Interleukin-1-induced NF-kappaB activation is NEMO-dependent but does not require IKKbeta. *The Journal of biological chemistry* 2007, 282, 8724–8733. doi:10.1074/jbc.M609613200.
- [276] Herscovitch, M., Comb, W., Ennis, T., Coleman, K. et al., Intermolecular disulfide bond formation in the NEMO dimer requires Cys54 and Cys347. *Biochemical and biophysical research communications* 2008, 367, 103–108. doi:10.1016/j.bbrc.2007.12.123.
- [277] Li, Q., Zhang, Y., Marden, J. J., Banfi, B., Engelhardt, J. F., Endosomal NADPH oxidase regulates c-Src activation following hypoxia/reoxygenation injury. *The Biochemical journal* 2008, 411, 531–541. doi:10.1042/BJ20071534.
- [278] Gasparian, A. V., Yao, Y. J., Lü, J., Yemelyanov, A. Y. et al., Selenium compounds inhibit I kappa B kinase (IKK) and nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) in prostate cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* 2002, 1, 1079–1087.
- [279] Christensen, M. J., Nartey, E. T., Hada, A. L., Legg, R. L., Barzee, B. R., High selenium reduces NF-kappaB-regulated gene expression in uninduced human prostate cancer cells. *Nutrition and cancer* 2007, 58, 197–204. doi:10.1080/01635580701328701.

- [280] Kretz-Remy, C., Arrigo, A.-P., Selenium: A key element that controls NF- κ B activation and I κ B α half life. *BioFactors* 2001, 14, 117–125. doi:10.1002/biof.5520140116.
- [281] Kim, E. K., Choi, E.-J., Compromised MAPK signaling in human diseases: An update. *Archives of toxicology* 2015, 89, 867–882. doi:10.1007/s00204-015-1472-2.
- [282] Frodyma, D., Neilsen, B., Costanzo-Garvey, D., Fisher, K., Lewis, R., Coordinating ERK signaling via the molecular scaffold Kinase Suppressor of Ras. *F1000Research* 2017, 6, 1621. doi:10.12688/f1000research.11895.1.
- [283] Dhawan, P., Richmond, A., A novel NF-kappa B-inducing kinase-MAPK signaling pathway up-regulates NF-kappa B activity in melanoma cells. *The Journal of biological chemistry* 2002, 277, 7920–7928. doi:10.1074/jbc.M112210200.
- [284] Lo, Y. Y., Conquer, J. A., Grinstein, S., Cruz, T. F., Interleukin-1 beta induction of c-fos and collagenase expression in articular chondrocytes: Involvement of reactive oxygen species. *Journal of cellular biochemistry* 1998, 69, 19–29.
- [285] Oliveira-Marques, V., Marinho, H. S., Cyrne, L., Antunes, F., Role of hydrogen peroxide in NF-kappaB activation: from inducer to modulator. *Antioxidants & redox signaling* 2009, 11, 2223–2243. doi:10.1089/ars.2009.2601.
- [286] Elder, D. J. E., Halton, D. E., Playle, L. C., Paraskeva, C., The MEK/ERK pathway mediates COX-2-selective NSAID-induced apoptosis and induced COX-2 protein expression in colorectal carcinoma cells. *International journal of cancer* 2002, 99, 323–327. doi:10.1002/ijc.10330.
- [287] Gurjar, M. V., Deleon, J., Sharma, R. V., Bhalla, R. C., Role of reactive oxygen species in IL-1 beta-stimulated sustained ERK activation and MMP-9 induction. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2001, 281, H2568-74.
- [288] Nieminen, R., Leinonen, S., Lahti, A., Vuolteenaho, K. et al., Inhibitors of mitogen-activated protein kinases downregulate COX-2 expression in human chondrocytes. *Mediators of inflammation* 2005, 2005, 249–255. doi:10.1155/MI.2005.249.
- [289] Matos, T. J., Duarte, C. B., Gonçalo, M., Lopes, M. C., Role of oxidative stress in ERK and p38 MAPK activation induced by the chemical sensitizer DNFB in a fetal skin dendritic cell line. *Immunology and cell biology* 2005, 83, 607–614. doi:10.1111/j.1440-1711.2005.01378.x.
- [290] Geraghty, P., Hardigan, A. A., Wallace, A. M., Mirochnitchenko, O. et al., The glutathione peroxidase 1-protein tyrosine phosphatase 1B-protein phosphatase 2A axis. A key determinant of airway inflammation and alveolar destruction. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2013, 49, 721–730. doi:10.1165/rcmb.2013-0026OC.
- [291] Yu, L.-G., Packman, L. C., Weldon, M., Hamlett, J., Rhodes, J. M., Protein phosphatase 2A, a negative regulator of the ERK signaling pathway, is activated by tyrosine phosphorylation of putative HLA class II-associated protein I (PHAPI)/pp32 in response to the antiproliferative lectin, jacalin. *The Journal of biological chemistry* 2004, 279, 41377–41383. doi:10.1074/jbc.M400017200.
- [292] Taupin, D., Podolsky, D. K., Mitogen-activated protein kinase activation regulates intestinal epithelial differentiation. *Gastroenterology* 1999, 116, 1072–1080. doi:10.1016/S0016-5085(99)70010-7.
- [293] Stone, W. L., Krishnan, K., Campbell, S. E., Palau, V. E., The role of antioxidants and pro-oxidants in colon cancer. *World journal of gastrointestinal oncology* 2014, 6, 55–66. doi:10.4251/wjgo.v6.i3.55.
- [294] Liou, G.-Y., Storz, P., Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research* 2010, 44, 479–496. doi:10.3109/10715761003667554.
- [295] Panieri, E., Santoro, M. M., ROS homeostasis and metabolism: A dangerous liason in cancer cells. *Cell death & disease* 2016, 7, e2253. doi:10.1038/cddis.2016.105.
- [296] Pérez, S., Taléns-Visconti, R., Rius-Pérez, S., Finamor, I., Sastre, J., Redox signaling in the gastrointestinal tract. *Free radical biology & medicine* 2017, 104, 75–103. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.048.
- [297] Fang, W., Goldberg, M. L., Pohl, N. M., Bi, X. et al., Functional and physical interaction between the selenium-binding protein 1 (SBP1) and the glutathione peroxidase 1 selenoprotein. *Carcinogenesis* 2010, 31, 1360–1366. doi:10.1093/carcin/bgq114.

- [298] Waldman, T., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer research* 1995, 55, 5187–5190.
- [299] Yan, W., Chen, X., GPX2, a direct target of p63, inhibits oxidative stress-induced apoptosis in a p53-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* 2006, 281, 7856–7862. doi:10.1074/jbc.M512655200.
- [300] Maiorino, M., Roveri, A., Coassin, M., Ursini, F., Kinetic mechanism and substrate specificity of glutathione peroxidase activity of ebselen (PZ51). *Biochemical pharmacology* 1988, 37, 2267–2271. doi:10.1016/0006-2952(88)90591-6.
- [301] Lennicke, C., Rahn, J., Lichtenfels, R., Wessjohann, L. A., Seliger, B., Hydrogen peroxide - production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell communication and signaling : CCS* 2015, 13, 39. doi:10.1186/s12964-015-0118-6.
- [302] Slamenova, D., Kozics, K., Hunakova, L., Melusova, M. et al., Comparison of biological processes induced in HepG2 cells by tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) and hydroperoxide (H₂O₂): The influence of carvacrol. *Mutation research* 2013, 757, 15–22. doi:10.1016/j.mrgentox.2013.03.014.
- [303] Kuhn, H., Banthiya, S., van Leyen, K., Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochimica et biophysica acta* 2015, 1851, 308–330. doi:10.1016/j.bbailip.2014.10.002.
- [304] Niki, E., Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. *Biochimica et biophysica acta* 2014, 1840, 809–817. doi:10.1016/j.bbagen.2013.03.020.
- [305] Niki, E., Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free radical biology & medicine* 2009, 47, 469–484. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.032.
- [306] Fujimoto, Y., Yonemura, T., Sakuma, S., Role of linoleic Acid hydroperoxide preformed by cyclooxygenase-1 or -2 on the regulation of prostaglandin formation from arachidonic Acid by the respective enzyme. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 2008, 43, 65–68. doi:10.3164/jcbrn.2008047.
- [307] Sobolewski, C., Cerella, C., Dicato, M., Ghibelli, L., Diederich, M., The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *International journal of cell biology* 2010, 2010, 215158. doi:10.1155/2010/215158.
- [308] Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S. et al., Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995, 3, 673–682.
- [309] Hehlhans, T., Pfeffer, K., The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: Players, rules and the games. *Immunology* 2005, 115, 1–20. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02143.x.
- [310] Lemke, J., Karstedt, S. von, Zingrebe, J., Walczak, H., Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell death and differentiation* 2014, 21, 1350–1364. doi:10.1038/cdd.2014.81.
- [311] Jo, M., Kim, T. H., Seol, D. W., Esplen, J. E. et al., Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med* 2000, 6, 564–567. doi:10.1038/75045.
- [312] Lee, S.-C., Cheong, H.-J., Kim, S.-J., Yoon, J. et al., Low-dose combinations of LBH589 and TRAIL can overcome TRAIL-resistance in colon cancer cell lines. *Anticancer Res* 2011, 31, 3385–3394.
- [313] Collins, J. A., Schandi, C. A., Young, K. K., Vesely, J., Willingham, M. C., Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 1997, 45, 923–934. doi:10.1177/002215549704500702.
- [314] Carlson, B. A., in: Brigelius-Flohe, R., Sies, H. (Eds.), *Diversity of selenium functions in health and disease* 2016, pp. 173–187.
- [315] Spector, A., Ma, W., Sun, F., Li, D., Kleiman, N. J., The Effect of H₂O₂ and Tertiary Butyl Hydroperoxide Upon a Murine Immortal Lens Epithelial Cell Line, αTN4-1. *Experimental eye research* 2002, 75, 573–582. doi:10.1006/exer.2002.2045.
- [316] Chemical Substances Bureau, *RISK ASSESSMENT: TERTIARY BUTYL HYDROPEROXIDE (TBHP): Final report, 11 October 2006* 2006.

- [317] Hornsveld, M., Dansen, T. B., The Hallmarks of Cancer from a Redox Perspective. *Antioxidants & redox signaling* 2016, 25, 300–325. doi:10.1089/ars.2015.6580.
- [318] Mori, S., Chang, J. T., Andrechek, E. R., Matsumura, N. et al., Anchorage-independent cell growth signature identifies tumors with metastatic potential. *Oncogene* 2009, 28, 2796–2805. doi:10.1038/onc.2009.139.
- [319] Tsuji, P. A., Naranjo-Suarez, S., Carlson, B. A., Tobe, R. et al., Deficiency in the 15 kDa selenoprotein inhibits human colon cancer cell growth. *Nutrients* 2011, 3, 805–817. doi:10.3390/nu3090805.
- [320] Tsuji, P. A., Carlson, B. A., Yoo, M.-H., Naranjo-Suarez, S. et al., The 15kDa selenoprotein and thioredoxin reductase 1 promote colon cancer by different pathways. *PLoS one* 2015, 10, e0124487. doi:10.1371/journal.pone.0124487.
- [321] Yoo, M.-H., Xu, X.-M., Carlson, B. A., Patterson, A. D. et al., Targeting thioredoxin reductase 1 reduction in cancer cells inhibits self-sufficient growth and DNA replication. *PLoS one* 2007, 2, e1112. doi:10.1371/journal.pone.0001112.
- [322] Bozzuto, G., Ruggieri, P., Molinari, A., Molecular aspects of tumor cell migration and invasion. *Annali dell'Istituto superiore di sanita* 2010, 46, 66–80. doi:10.4415/ANN_10_01_09.
- [323] Di, J., Huang, H., Qu, D., Tang, J. et al., Rap2B promotes proliferation, migration, and invasion of human breast cancer through calcium-related ERK1/2 signaling pathway. *Scientific reports* 2015, 5, 12363. doi:10.1038/srep12363.
- [324] Justus, C. R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., Yang, L. V., In vitro cell migration and invasion assays. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2014. doi:10.3791/51046.
- [325] Pitts, M. W., Hoffmann, P. R., Endoplasmic reticulum-resident selenoproteins as regulators of calcium signaling and homeostasis. *Cell calcium* 2017. doi:10.1016/j.ceca.2017.05.001.
- [326] Ben, S. B., Peng, B., Wang, G. C., Li, C. et al., Overexpression of Selenoprotein SelK in BGC-823 Cells Inhibits Cell Adhesion and Migration. *Biochemistry. Biokhimiia* 2015, 80, 1344–1353. doi:10.1134/S0006297915100168.
- [327] Li, M., Cheng, W., Nie, T., Lai, H. et al., Selenoprotein K Mediates the Proliferation, Migration, and Invasion of Human Choriocarcinoma Cells by Negatively Regulating Human Chorionic Gonadotropin Expression via ERK, p38 MAPK, and Akt Signaling Pathway. *Biological trace element research* 2017. doi:10.1007/s12011-017-1155-3.
- [328] Chen, Y.-C., Prabhu, K. S., Mastro, A. M., Is selenium a potential treatment for cancer metastasis? *Nutrients* 2013, 5, 1149–1168. doi:10.3390/nu5041149.
- [329] Yu, Y. P., Yu, G., Tseng, G., Cieply, K. et al., Glutathione peroxidase 3, deleted or methylated in prostate cancer, suppresses prostate cancer growth and metastasis. *Cancer research* 2007, 67, 8043–8050. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0648.
- [330] Yoo, M.-H., Xu, X.-M., Carlson, B. A., Gladyshev, V. N., Hatfield, D. L., Thioredoxin reductase 1 deficiency reverses tumor phenotype and tumorigenicity of lung carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry* 2006, 281, 13005–13008. doi:10.1074/jbc.C600012200.
- [331] Bartek, J., Lukas, J., Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Letters* 2001, 490, 117–122. doi:10.1016/S0014-5793(01)02114-7.
- [332] Ahmed, D., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Danielsen, S. A. et al., Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis* 2013, 2, e71. doi:10.1038/oncsis.2013.35.
- [333] Liu, Y., Bodmer, W. F., Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, 103, 976–981. doi:10.1073/pnas.0510146103.
- [334] Kühn, K., *Charakterisierung eines siRNA-vermittelten knock downs von Selenoprotein H*. Masterarbeit 2014.
- [335] Resnitzky, D., Reed, S. I., Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1-to-S transition. *Molecular and cellular biology* 1995, 15, 3463–3469.
- [336] Nakanishi, M., Adami, G. R., Robetorye, R. S., Noda, A. et al., Exit from G0 and entry into the cell cycle of cells expressing p21Sdi1 antisense RNA. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America* 1995, 92, 4352–4356.
doi:10.1073/pnas.92.10.4352.
- [337] Menon, S. G., Goswami, P. C., A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new. *Oncogene* 2007, 26, 1101–1109. doi:10.1038/sj.onc.1209895.
- [338] Ogino, S., Nosho, K., Shima, K., Baba, Y. et al., p21 expression in colon cancer and modifying effects of patient age and body mass index on prognosis. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2009, 18, 2513–2521. doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0451.
- [339] Zirbes, T. K., Baldus, S. E., Moenig, S. P., Nolden, S. et al., Prognostic impact of p21/waf1/cip1 in colorectal cancer. *International journal of cancer* 2000, 89, 14–18. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(20000120)89:1<14::AID-IJC3>3.0.CO;2-L.
- [340] Ravizza, R., Gariboldi, M. B., Passarelli, L., Monti, E., Role of the p53/p21 system in the response of human colon carcinoma cells to Doxorubicin. *BMC cancer* 2004, 4, 92. doi:10.1186/1471-2407-4-92.
- [341] Liu, B. P. L., Chong, E. Y. Y., Cheung, F. W. K., Duan, J.-A. et al., Tangutorine induces p21 expression and abnormal mitosis in human colon cancer HT-29 cells. *Biochemical pharmacology* 2005, 70, 287–299. doi:10.1016/j.bcp.2005.04.024.
- [342] Mariadason, J. M., Arango, D., Corner, G. A., Arañes, M. J. et al., A gene expression profile that defines colon cell maturation in vitro. *Cancer research* 2002, 62, 4791–4804.
- [343] Belkin, A., Freynd, G., Katsnelson, M., *The significance of amperometric detection of alkaline phosphatase in colorectal cancer diagnostics* 2016.
- [344] Uchida, H., Yamazaki, K., Fukuma, M., Yamada, T. et al., Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in colorectal cancer. *Cancer science* 2010, 101, 1731–1737. doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01571.x.
- [345] Takeda, K., Kinoshita, I., Shimizu, Y., Matsuno, Y. et al., Expression of LGR5, an Intestinal Stem Cell Marker, During Each Stage of Colorectal Tumorigenesis. *Anticancer Res* 2011, 31, 263–270.
- [346] Han, Y., Xue, X., Jiang, M., Guo, X. et al., LGR5, a relevant marker of cancer stem cells, indicates a poor prognosis in colorectal cancer patients: a meta-analysis. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology* 2015, 39, 267–273. doi:10.1016/j.clinre.2014.07.008.
- [347] Vieira, G. C., Chockalingam, S., Melegh, Z., Greenhough, A. et al., LGR5 regulates pro-survival MEK/ERK and proliferative Wnt/ β -catenin signalling in neuroblastoma. *Oncotarget* 2015, 6, 40053–40067. doi:10.18632/oncotarget.5548.
- [348] Rebsch, C. M., Penna, F. J., Copeland, P. R., Selenoprotein expression is regulated at multiple levels in prostate cells. *Cell research* 2006, 16, 940–948. doi:10.1038/sj.cr.7310117.
- [349] Becker, N.-P., Martitz, J., Renko, K., Stoedter, M. et al., Hypoxia reduces and redirects selenoprotein biosynthesis. *Metallomics : integrated biometal science* 2014, 6, 1079–1086. doi:10.1039/c4mt00004h.
- [350] Zahia, T.-H., Yona, L., Anne-Laure, B., Laurent, C., Selective up-regulation of human selenoproteins in response to oxidative stress. *Free radical biology & medicine* 2014, 75 Suppl 1, S25. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.745.

7. Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Anna Kipp bedanken, durch die es mir überhaupt erst möglich war, das Promotionsthema am Deutschen Institut für Ernährungsforschung zu bearbeiten. Liebe Anna, ich danke dir von Herzen für deine außergewöhnlich gute Betreuung, dein stets offenes Ohr für meine Sorgen, die nicht abbreißende Unterstützung, fruchtbare Diskussionen und vor allem für deine Geduld und deine herzliche Art.

Frau Prof. (em) Dr. Regina Brigelius-Flohé bin ich dankbar für jedwede konstruktive Kritik und dass sie mir die Möglichkeit bot, die Dissertation innerhalb ihrer Abteilung „Biochemie der Mikronährstoffe“ durchzuführen. Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Tilman Grune für die freundliche Aufnahme unserer Arbeitsgruppe in seine Abteilung „Molekulare Toxikologie“. Den Gutachtern dieser Arbeit danke ich für die Bereitschaft zur Übernahme der Gutachtertätigkeit.

Den Mitarbeitern und Kollegen des inzwischen leider nicht mehr existenten „Selen und Colonkrebs“-Teams danke ich für die zusammen verbrachte Zeit. Frau Stefanie Deubel möchte ich hierbei meinen ganz besonderen Dank aussprechen. Ihre fachliche Kompetenz, die vielen Ratschläge und ihre unermüdlichen Anstrengungen haben entscheidend zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen. Auch Frau Karolin Thies hat mich durch ihre Hilfe bei den experimentellen Arbeiten tatkräftig unterstützt. Meinen ehemaligen Kolleginnen Frau Dr. Mike-Freya Müller und Frau Dr. Franziska Hiller danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen erkenntnisreichen Diskussionen – es war schön mit euch ein Büro zu teilen. Herrn Dr. Carsten Lehmann und Frau Dr. Doris Lippmann bin ich trotz der nur kurzen gemeinsamen Zeit dankbar für die theoretische und praktische Hilfe. Besonderer Dank gilt weiterhin Manuel Modräger und Katrin Kühn – die Ergebnisse eurer Masterarbeiten tragen zum Gesamtbild dieser Dissertation bei. Frau Dr. Jeanette König danke ich zudem für die Unterstützung bei der Zellzyklusanalyse.

Für die Hilfe bei der Durchführung der Tierversuche danke ich allen beteiligten Mitarbeitern des Max-Rubner-Laboratoriums, insbesondere Frau Elisabeth Meyer, sowie dem Team von Herrn Dr. René Thierbach in Jena. Auch den anderweitig an dieser Arbeit involvierten Mitarbeitern am „Campus in Rehbrücke“ bin ich für die Gastfreundlichkeit dankbar, allen voran den DIfE-Abteilungen „Molekulare Genetik“ und „Fettzell-Entwicklung und Ernährung“ sowie dem Lehrstuhl für Lebensmittelchemie von Frau Prof. Dr. Tanja Schwerdtle an der Universität Potsdam.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Frau und allen anderen Mitgliedern meiner Familie für Ihre Unterstützung während der gesamten Zeit bedanken.

8. Erklärung

Hiermit versichere ich, diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt zu haben. Alle wörtlich oder sinngemäß übernommenen Quellen habe ich als solche gekennzeichnet. Die Dissertation wurde bisher weder in dieser noch in ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Potsdam, im Oktober 2018

Martin Bertz