

Das Selenoprotein Glutathionperoxidase-2

**Physiologische Funktion und
Einfluss auf die entzündungsassoziierte Colonkarzinogenese**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

„doctor rerum naturalium“

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin "Biochemie der Ernährung"

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Potsdam

von

Susanne Krehl

geboren am 22.08.1980 in Blankenburg am Harz

Potsdam, im August 2010

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

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

Gutachter/innen:

Prof. Dr. Regina Brigelius-Flohé
Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke
Abteilung Biochemie der Mikronährstoffe

PD Dr. Holger Steinbrenner
Universitätsklinikum Düsseldorf
Institut für Biochemie und Molekularbiologie I

Prof. Dr. Michael Scheurlen
Klinikum der Universität Würzburg
Medizinische Klinik und Poliklinik II

Tag der mündlichen Prüfung: 05.01.2011

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2011/5022/>
URN <urn:nbn:de:kobv:517-opus-50220>
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-50220>

**ALLES WISSEN UND ALLES VERMEHREN UNSERES WISSENS ENDET NICHT MIT EINEM
SCHLUSSPUNKT, SONDERN MIT EINEM FRAGEZEICHEN**

HERMANN HESSE

Inhaltsverzeichnis	Seite
Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	10
1. EINLEITUNG	
1.1. Selenhistorie	11
1.2. Selenoproteine	12
1.2.1. Selenoproteinbiosynthese	13
1.2.2. Regulation der Selenoproteinbiosynthese	15
1.2.3. Glutathionperoxidasen	16
1.2.3.1. Glutathionperoxidase 1	16
1.2.3.2. Glutathionperoxidase 2	17
1.3. Morphologie des Colons	18
1.4. Entzündung und Krebs	19
1.5. Selen und Krebs	21
1.6. Zielsetzung	24
2. METHODEN	
2.1. Tierversuche	25
2.1.1. Tierversuch in Abhängigkeit vom Alter	25
2.1.2. Model für entzündungsassoziierten Dickdarmkrebs	26
2.2. Genotypisierung	27
2.3. Histologie und indirekte Immunhistochemie	28
2.3.1. Analyse des Entzündungsstatus	28
2.3.2. Quantifizierung von Tumoren und ACF	29
2.3.3. Quantifizierung von Apoptosen/Mitosen	30
2.3.4. Gewebeaufarbeitung für Immunfärbung	30
2.3.5. Hämatoxilinfärbung	31
2.3.6. Immunhistochemie	32
2.4. Herstellung von Proteinlysaten aus Organen	33
2.5. Proteinbestimmung nach Bradford	33
2.6. SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) und Western Blot	33
2.7. Glutathion-Peroxidase (GPx) Aktivitätsmessung	35
2.8. Bestimmung des Selengehalts	35
2.9. Statistik	36

3. ERGEBNISSE

3.1. Physiologische Rolle der GPx2	37
3.1.1. Enzymexpression im Colon in Abhängigkeit vom Alter	37
3.1.2. Charakterisierung des GPx2-Knockout	38
3.1.2.1. Gewichtsverlauf	38
3.1.2.2. GPx-Expression im Colon in Abhängigkeit vom Genotyp	39
3.1.2.2.1. Seleneffekt im Wildtyp	39
3.1.2.2.2. Effekt des Genotyps	43
3.1.2.3. Morphologische Charakterisierung des Colons	45
3.2. Einfluss von GPx2 auf die Entzündungsassoziierte Colonkarzinogenese	48
3.2.1 Entzündungsstatus des Colons	48
3.2.2. Kanzerogenese im Colon	49

4. DISKUSSION

4.1. Physiologische Funktion der GPx2	54
4.1.1. Enzymexpression im Colon in Abhängigkeit vom Alter	54
4.1.2. Veränderte Enzymexpression im Colon im GPx2-Knockout	55
4.1.3. Veränderte Morphologie des Colons im GPx2-Knockout	57
4.2. Einfluss von GPx2 auf die Entzündungsassoziierte Colonkarzinogenese	59
4.3. Ausblick	63

5. ZUSAMMENFASSUNG 65**6. LITERATUR** 67**7. DANKSAGUNG** 80

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACF	aberrant Crypt Foci - aberranter Krypt Focus
AOM	Azoxymethan
APC	adenomatöse Polyposis Coli
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Bcl-2	B-Zell-Lymphoma-2
BMP-2	Bone-Morphogenetisches-Protein-2
BSA	Rinderserumalbumin
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
COX2	Cyclooxygenase-2
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAN	2,3-Diaminonaphthalen
Dio	Deiodinase
DSS	Dextran-Natriumsulfat
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
ER	endoplasmatisches Retikulum
GR	Glutathionreduktase
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
GSSR	Glutathion-gemischtes Disulfid
HET	Heterozygot
IVC	Individually Ventilated Cages – einzelbelüftete Käfige
MC	Morbus Crohn
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NFκB	nukleärer Faktor κB
Nrf2	NF-E2 related factor 2
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction – Polymerase Ketten Reaktion
PGE2	Prostaglandin-E2
RBD	RNA-Bindedomäne
SBP2	SECIS-Binde-Protein 2
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	Selenocystein
SECIS	Selenocystein-Insertions-Sequenz

SID	Sec-Inkorporationsdomäne
SPF	spezifisch Pathogen frei
TBS	Tris-gepuffete Kochsalzlösung
TTBS	Tween-TBS
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TrxR	Thioredoxinreduktase
UC	Colitis Ulcerosa
UTR	untranslatierte Region
Wnt	Wingless Int-1
WT	Wildtyp

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb.1.1.	Selenoproteinbiosynthese_____	14
Abb.1.2.	Model der Selenocysteininkorporation_____	15
Abb.1.3.	Redoxzyklus der Glutathionperoxidase_____	16
Abb.1.4.	Aufbau einer Colonkrypte_____	19
Abb.1.5.	Model der Entstehung von Colonkrebs_____	20
Abb.2.1.	Konstruktion des GPx2-Knockout_____	25
Abb.2.2.	Experimentelles Design des Tierversuchs für entzündungsassoziierten Dickdarmkrebs_____	27
Abb.2.3.	Aufteilung des Colons für Analyse des Entzündungsstatus und Enzymexpression_____	28
Abb.2.4.	Aufteilung des Colons zur Analyse von ACF, Tumoren, Mitosen und Apoptosen_____	29
Abb.2.5.	Darstellung einer Colonkrypte_____	30
Abb.3.1.	Selenstatus und Enzymexpression von männlichen Wildtyp-Tieren in Abhängigkeit vom Alter_____	37
Abb.3.2.	Gewichtsverlauf von Wildtyp (WT) und GPx2-Knockout (KO) im Alter von 8 bis 21 Wochen_____	39
Abb.3.3.	Selenstatus im Vergleich zwischen Wildtyp und GPx2-Knockout_____	40
Abb.3.4.	GPx-Aktivität im Vergleich zwischen Wildtyp und GPx2-Knockout_____	40
Abb.3.5.	Enzymexpression im distalen Colon im Wildtyp in Abhängigkeit vom Selenstatus_____	41
Abb.3.6.	GPx2- und GPx1-Proteinexpression entlang des Colons im Wildtyp in Abhängigkeit vom Selenstatus_____	42
Abb.3.7.	GPx1-Expression im WT und GPx2-Knockout im distalen Colon in Abhängigkeit vom Selenstatus_____	43
Abb.3.8.	Auswertung der GPx1-Expression im Wildtyp und GPx2-Knockout im distalen Colon in Abhängigkeit vom Selenstaus_____	44
Abb.3.9.	Repräsentative histologische Färbung des Colons zur Darstellung von Apoptosen und Mitosen_____	45
Abb.3.10.	Quantifizierung von Apoptosen im Colon_____	46
Abb.3.11.	Quantifizierung von Mitosen im Colon_____	47
Abb.3.12.	Messung der Länge von Colonkrypten im Wildtyp (WT) und GPx2-Knockout (KO)_____	47
Abb.3.13.	Histologische Charakterisierung der Entzündung im Colon_____	48
Abb.3.14.	Entzündungsscore des Colons_____	49
Abb.3.15.	Exemplarische Darstellung von ACF und Adenomen_____	50

Abb.3.16.	ACF-Anzahl mit Anzahl der Krypten pro Focus im Wildtyp und GPx2-Knockout	51
Abb.3.17.	Tumoranzahl im Colon im Wildtyp (WT) und GPx2-Knockout (KO)	52
Abb.3.18.	Korrelation zwischen Inflammation und Tumoranzahl	52
Abb.3.19.	Tumorverteilung entlang des Colons	53
Abb.3.20.	Größe der Colontumore im Wildtyp (WT) und GPx2-Knockout (KO)	53

TABELLENVERZEICHNIS

Tab.1.1.	Humane GPx, Dio und Trx und ihre Funktion	12
Tab.1.2.	Humane Selenoproteine und ihre Funktion	13
Tab.1.3.	Interventionsstudien zu Selensupplementation und Krebs	22
Tab.2.1.	Einteilung der Versuchsgruppen	26
Tab.2.2.	Ansatz für die Gewebelyse	27
Tab.2.3.	PCR-Ansatz für die Genotypisierung	28
Tab.2.4.	Parameter des Entzündungsscores	29
Tab.2.5.	Dehydrierung der Gewebe	31
Tab.2.6.	Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte	31
Tab.2.7.	Dehydrierung der Gewebeschnitte	32
Tab.2.8.	Zusammensetzung der Polyacrylamidgele	34
Tab.2.9.	Verwendete Western Blot Antikörper	34
Tab.3.1.	Auswertung ACF-Inzidenz und -Anzahl, Tumor-Inzidenz	50

1. EINLEITUNG

1.1. Selenhistorie

Bei der Analyse von Bleikammerschlamm, welcher bei der Schwefelsäureherstellung entsteht, entdeckte Jöns Jakob Berzelius im Jahr 1817 das Element Selen und benannte es nach der griechischen Mondgöttin Selene [1]. Selen ist ein seltenes Element in der Erdkruste [2]. Dennoch gibt es Gebiete, z.B. in den USA und China mit stark selenhaltigen Böden. In die Nahrungskette gelangt Selen, indem es von Pflanzen in anorganischer Form aus dem Boden aufgenommen und in organische Verbindungen eingebaut wird [3]. Die Wirkung von Selen auf den Organismus wurde von Beginn an kontrovers diskutiert. Zunächst wurde das Element als toxisch eingestuft. Die Begründung dafür lag in Berichten über den Zusammenhang von verschiedenen Krankheiten, wie z.B. Alkalikrankheit und Blind Stagger (Muskelschwäche), welche insbesondere bei der Viehzucht in Verbindung mit stark selenhaltigen Pflanzen und Böden in den „Great Plains“ in den USA auftraten [4]. Des Weiteren wurde in Versuchen, bei denen Selen erfolgreich als Insektizid Verwendung fand, und bei der Verabreichung von Selen an Ratten die toxische Wirkung bestätigt [5, 6]. Die Zelltoxizität von Selen wurde seit der Mitte des 18. Jahrhunderts genutzt, indem Selen in Form von Selen-Schwefel-Injektionen zur Krebstherapie eingesetzt wurde [7]. Parallel wurde Selen als essentielles Spurenelement diskutiert, da gezeigt wurde, dass Selen für Pflanzen essentiell ist [8]. Die Hypothese wurde in den 1950er Jahren durch Experimente unterstützt, in denen verschiedene Selenkomponenten einen protektiven Effekt gegen nekrotische Leberdegeneration aufwiesen und Selen eine antiinflammatorische Wirkung ausübte [9, 10]. Ein weiterer Fakt, der eher auf eine positive Funktion von Selen für den Organismus hinweist, ist, dass Selenmangel Krankheiten hervorrufen kann. Die Weißmuskelkrankheit bei Jungtieren von Wiederkäuern ist eine Muskeldystrophie, deren Auftreten mit selenarmen Böden assoziiert wurde [11]. Das Auftreten der Keshan-Krankheit und der Kashin-Beck-Krankheit ist ebenfalls auf einen Selenmangel im Boden zurückzuführen. Eine Prävention der Keshan-Krankheit, deren Symptome einer Kardiomyopathie entsprechen, wird durch Natriumselenitsupplementation bewirkt [12]. In neueren Untersuchungen wiesen die Betroffenen oftmals eine Coxsackievirusinfektion auf. In *in vitro* Studien inhibierte Selen die Virusreplikation [13]. Inzwischen wurde Selen als essentielles Spurenelement anerkannt und die empfohlene Selendosis für den Menschen beträgt zwischen 30 und 70 µg/Tag in Deutschland [14].

1.2. Selenoproteine

Die genaue Funktion von Selen im Organismus war lange Zeit ungeklärt, bis 1973 entdeckt wurde, dass Selen ein Bestandteil der Format-Dehydrogenase im Bakterium *Clostridium thermoaceticum* ist [15]. In den folgenden Jahren wurde die Erforschung weiterer Selenoproteine vorangetrieben. Selenoproteine kommen sowohl in Pro- als auch in Eukaryonten vor [16]. Während Hefen, Pilze und höheren Pflanzen keine Selenoproteine besitzen [17, 18]. Zu den Selenoproteinen gehören fünf der sieben bekannten Glutathionperoxidasen (GPx), die Familie der Deiodinasen (Dio) und die Familie der Thioredoxinreduktasen (TrxR). Glutathionperoxidasen reduzieren mit Glutathion als Cofaktor Hydroperoxide und regulieren die Redoxhomöostase und demzufolge auch von dieser betroffene Signalwege. Die drei Deiodinasen sind sowohl an der T3-Synthese als auch am Abbau von T3 (Triiodthyronin) und T4 (Thyroxin) beteiligt. Die Thioredoxinreduktasen sind essentiell für die DNA-Synthese und demzufolge auch für das Zellwachstum bzw. die Zellteilung, da sie unter NADPH-Verbrauch oxidiertes Thioredoxin reduzieren [19]. Ein Knockout von Thioredoxinreduktase 1 (TrxR1) bzw. 2 (TrxR2) ist letal, da es im Embryo zu einer massiven Reduktion der Zellproliferation kommt [20, 21]. In den letzten Jahren wurde die Funktion von weiteren Selenoproteinen aufgeklärt. Dennoch ist von einigen Selenoproteinen häufig nicht viel mehr als die DNA-Sequenz bekannt [22].

Tab.1.1. Humane GPx, Dio und TrxR und ihre Funktion

Selenoprotein	Vorkommen	bekannte/ postulierte Funktion	Quelle
Glutathionperoxidasen			
GPx1 , cGPx	ubiquitär,	Reduktion von Hydroperoxiden	[23]
GPx2 , GIGPx	Gastrointestinaltrakt, Krebs	Barriere gegen Hydroperoxidabsorption	
GPx3 , pGPx	Plasma	Einfluss auf Entzündung/Krebs	[24, 25]
GPx4 , PHGPx	Testis	Reduktion von Hydroperoxiden,	[26, 27]
		Spermienreifung, embryonale Entwicklung	[28, 29]
GPx6	olfaktorisches Epithel	antioxidativer Schutz	[22]
Deiodinasen			
Dio1	Schilddrüse, Leber, Niere, Hypophyse, Plasmamembran	T3-Synthese, Abbau von T3 und T4	[30]
Dio2	Schilddrüse, Hypophyse, Muskel, ZNS, ER-Membran	T3-Synthese	[31]
Dio3	Placenta, ZNS, Haut, Plasmamembran	Abbau von T3 und T4	[31]
Thioredoxinreduktasen			
TrxR1	ubiquitär, Cytosol	Reduktion von Thioredoxin	[32]
TrxR2	ubiquitär, Mitochondrien	Reduktion von Thioredoxin	[33]
TrxR3	Testis	Reduktion von Thioredoxin Glutaredoxin-Reduktase	[34, 35]

Tab.1.2. Humane Selenoproteine und ihre Funktion

Selenoprotein	Vorkommen	bekannte / postulierte Funktion	Quelle
Selenophosphat-synthetase 2	ubiquitär	Selenophosphatsynthese bei der Translation von Selenoproteinen	[36, 37]
Selenoprotein 15	ubiquitär, ER	Proteinfaltung im ER, pro-apoptotisch, enthält Redoxmotif	[38]
Selenoprotein H	ubiquitär, Nucleus	Redox-responsives DNA-Bindeprotein, Genregulation bei <i>de novo</i> Glutathion-synthese und Phase II-Detoxifikation	[39]
Selenoprotein I	ubiquitär, Membranen	enthält CDP-Alkoholphosphatidyl-transferase Motif	[40]
Selenoprotein K	ubiquitär, ER	oxidativer Schutz von Kardiomyozyten, enthält Transmembrandomäne	[41]
Selenoprotein M	ubiquitär, ER	Gehirn: Schutz vor oxidativem Stress potentielle Funktion bei Calciumregulation	[42]
Selenoprotein N	ubiquitär	Muskelorganisation: myofibrilliäre Anhaftung, Sarkomerorganisation	[43]
Selenoprotein O	ubiquitär	unbekannt	[22]
Selenoprotein P	ubiquitär, Plasma	Selentransport und -homöostase	[44]
Selenoprotein S	ubiquitär, ER	Retranslokation von falsch gefalteten Proteinen, Immunabwehr	[45, 46]
Selenoprotein T	ubiquitär	Calcium-Homöostase, neuroendokrine Sekretion, Zelladhäsion	[47] [48]
Selenoprotein V	Testis, Gehirn	hohe Homologie zu SelW, Redoxmotif	[49]
Selenoprotein W	ubiquitär, Muskel	Immunabwehr, Muskel, Herz, Gehirn: Thioredoxin-verwandte Funktion	[50]
Selenoprotein X (SelR)	ubiquitär	Methionin-R-Sulfoxid Reduktase	[51]

1.2.1. Selenoproteinbiosynthese

Mitte der 1980er Jahre wurden die Glutathio-peroxidase-1 sequenziert, um im Anschluss den offenen Leserasterrahmen mit der daraus resultierenden Aminosäuresequenz vergleichen zu können. Es zeigte sich, dass das Codon UGA, das bis dato als eines der drei Stopcodons galt, im offenen Leserasterrahmen enthalten war und demzufolge für eine Aminosäure kodierte [52]. Die Aminosäure Selenocystein enthält anstatt des Schwefelatoms ein Selenatom. Es wird angenommen, dass der Einbau von Selenocystein einen funktionellen Vorteil für das Protein darstellt, da die Selenolgruppe, im Gegensatz zur Thiolgruppe, bei physiologischem pH in ionisierter Form vorliegt und als Nucleophil agieren kann. [53]. Des Weiteren ist Selenocystein um ein vielfaches reaktiver als Cystein [54]. Für den Einbau von Selenocystein in Proteine sind sowohl eine spezifische tRNA mit dem Anticodon ACU, als auch die cis-agierende SECIS sowie trans-agierende Proteine, wie z.B. das SECIS-Binding Protein 2 (SBP2), der Elongationsfaktor EFSec und das ribosomale Protein L30, notwendig

[55, 56, 57, 58]. Von besonderer Bedeutung bei der Selenoproteinbiosynthese ist die Selenocystein-Inserting-Sequenz (SECIS). Diese Sequenz befindet sich in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der mRNA aller eukaryontischer Selenoproteine und stellt eine Haarnadelstruktur dar, die einen vorzeitigen Kettenabbruch, welcher zum Zerfall des mRNA-ribosomalen Komplexes führen würde, verhindert [54]. Selenocystein wird direkt an der $tRNA^{[ser]sec}$ synthetisiert [59]. Die Seryl-tRNA Synthetase belädt die $tRNA^{[ser]sec}$ zunächst mit Serin, welches im Anschluss mittels der Phosphoseryl-tRNA Kinase durch Phosphorylierung modifiziert wird. Der Phosphoserylrest wird mittels der Selenocystein-synthase zu Selenocystein umgewandelt. Die Selenquelle für diesen Prozess wird durch die Selenophosphat-Synthetase 2 bereitgestellt, da diese die Reaktion von Selenit zu Monoselenphosphat katalysiert.

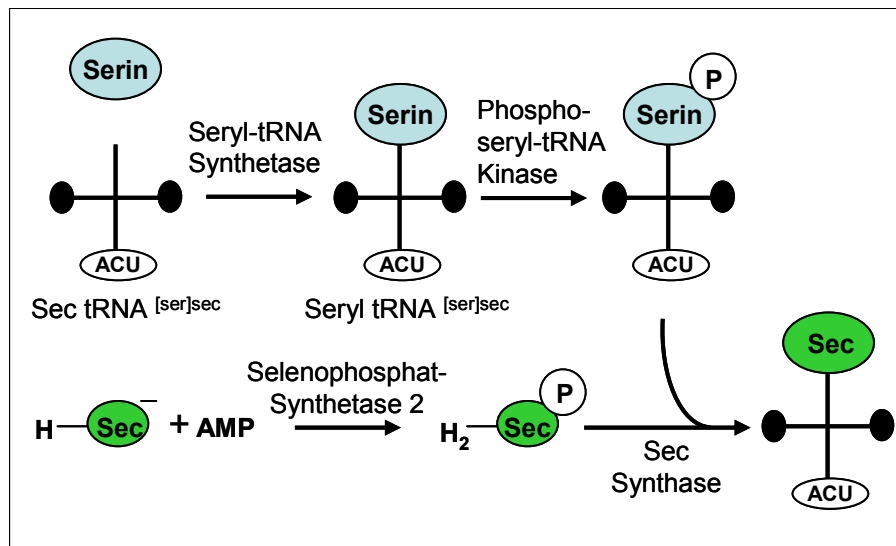


Abb.1.1. Selenoproteinbiosynthese. Sec = Selenocystein, P = Phosphatrest, AMP = Adeninmonophosphat, modifiziert nach Fig.2 in [60]

Zunächst erkennt das SBP2 Protein das UGA Codon und anschließend interagiert die RNA-Binde-Domäne (RBD) mit der GA-Tandem-Sequenz innerhalb SECIS [61]. Die Interaktion bewirkt eine Konformationsänderung im SBP2, so dass die RBD mit der Sec-Inkorporations-Domäne (SID) interagieren kann. Diese bindet im weiteren Verlauf den Elongationsfaktor Efsec, der wiederum mit der $tRNA^{[ser]sec}$ beladen ist [57]. Durch eine weitere Konformationsänderung innerhalb von SID gelangt EFSec an die Elongationsfaktor-Bindungsposition im Ribosom, so dass Selenocystein in die wachsende Polypeptidkette eingebaut werden kann. Bisher ist noch ungeklärt wie SBP2 sich wieder von der SECIS ablöst [62]. Es wird vermutet, dass das ribosomale Protein L30, welches ebenso die SECIS bindet, für die Freisetzung von SBP2 verantwortlich ist [58].

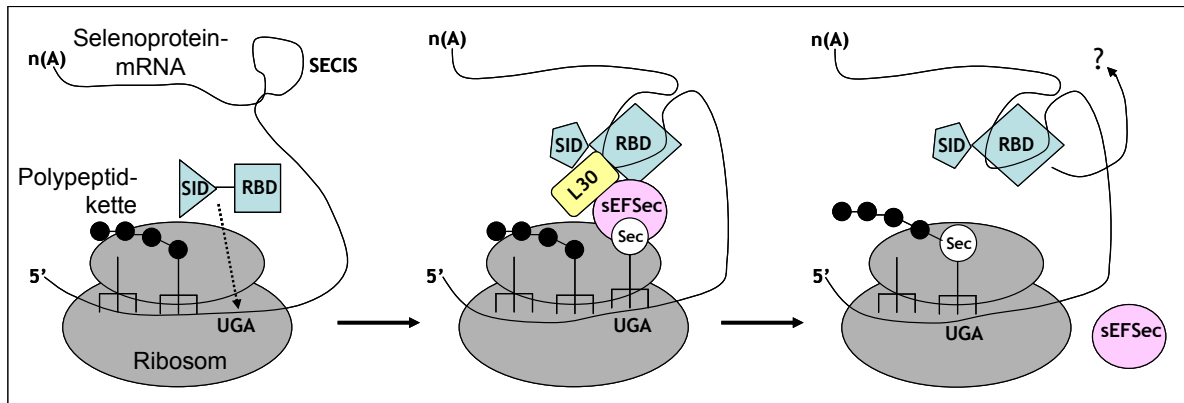


Abb.1.2. Model der Selenocysteininkorporation. SECIS = Selenocystein-Insertions-Sequenz, SID = Sec Inkorporationsdomäne, RBD = RNA-Bindedomäne, Sec = Selenocysteine, eEFSec = Elongationsfaktor EFSec. Modifiziert nach Fig. 4 in [62].

1.2.2. Regulation der Selenoproteinbiosynthese

Die Proteinbiosynthese der Selenoproteine folgt einer Hierarchie, was bedeutet, dass nicht alle Selenoproteine gleichermaßen mit Selen versorgt werden [63]. Die in der Hierarchie niedrig stehenden Stress-Selenoproteine werden bei Selenrestriktion nicht mehr exprimiert [64]. Im Gegensatz dazu stehen die Haushalts-Selenoproteine, deren Proteinsynthese sogar im Selenmangel stattfindet, hoch in der Hierarchie [64]. Selenmangel wirkt sich nicht auf die Transkription der mRNA aus, sondern beeinflusst deren Stabilität und Translation [65]. Die Interaktion des eukaryontischen Initiationsfaktors 4a3 (eIF4a3) mit der SECIS verhindert die Bindung von SBP2, dadurch kommt es zum nonsense-vermittelten Abbau der mRNA von Stress-Selenoproteinen im Selenmangel [66]. Die tRNA^{[ser]sec} existiert in zwei Isoformen, die sich durch eine einzelne Methylgruppe unterscheiden. Für die Proteinsynthese der Haushalts-Selenoproteine wird die Methylcarboxymethyl-5'-Uridin (mcm5U) Isoform der tRNA^{[ser]sec} verwendet. Diese Isoform ist das Vorläufermolekül der zweiten Isoform, Methylcarboxymethyl-5'-Uridin- 2'-O-Methylribose (mcm5Um), die für die Proteinsynthese der Stress-Selenoproteine eingesetzt wird. Im Selenmangel findet keine Addition der Methylgruppe statt, so dass die Translation von Stress-Selenoproteinen inhibiert wird [67, 68].

1.2.3. Glutathionperoxidasen

Die Glutathionperoxidasen katalysieren die Reduktion von Wasserstoffperoxid bzw. organischen Peroxiden zu den entsprechenden Alkoholen. Zunächst fungiert die Glutathionperoxidase als Elektronendonator und liegt nach der Reduktion von Peroxiden in oxidierter Form vor. Im weiteren Reaktionsverlauf erfolgt die Elektronenübertragung von Glutathion, so dass die Glutathionperoxidase reduziert vorliegt. Pro Reaktion werden zwei Moleküle Glutathion oxidiert. Damit der Zyklus erneut ablaufen kann werden den beiden

Glutathionmolekülen mittels der Glutathionreduktase Elektronen zugeführt, so dass sie reduziert vorliegen.

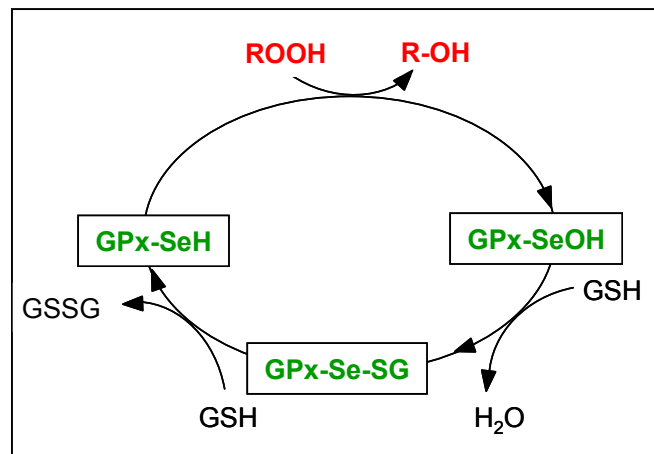


Abb.1.3. Redoxzyklus der Glutathionperoxidase

Die Glutathionperoxidase 3 (GPx3) wird hauptsächlich ins Plasma sezerniert und kann neben Glutathion als Substrat auch Thioredoxin und Glutaredoxin verwenden [69]. Neben der Reduktion von Hydroperoxiden wurden für die Glutathionperoxidase 4 (GPx4) weitere Funktionen aufgeklärt. Sie ist als Strukturprotein ein essentieller Bestandteil der Mitochondrien im Mittelstück von Spermien [29]. Die GPx4 kommt in mitochondrialer, zytosolischer und nukleärer Isoform vor. Der Knockout der mitochondrialen GPx4 bewirkt eine Deformation der Geißel und führt zu Infertilität [70]. Im Gegensatz dazu ist der Knockout der zytosolischen GPx4 letal [71]. Die Funktion der GPx6, die hauptsächlich im olfaktorischen Epithel exprimiert wird, ist noch weitgehend unerforscht [22].

1.2.3.1. Glutathionperoxidase 1 (GPx1)

Das erste im Säugetier nachgewiesene Selenoprotein war die Glutathionperoxidase 1 [72]. Dieses Enzym wird ubiquitär exprimiert und ist im Cytosol vorzufinden. Im Selenmangel wird die GPx1 nicht exprimiert, da sie zu den Stress-Selenoproteinen gehört. Die postulierte Funktion von GPx1 ist der Schutz vor oxidativem Stress durch die Reduktion von Wasserstoffperoxiden. Der Knockout von GPx1 in Mäusen verursachte sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch bei Hypoxie keinen Phänotyp [73]. Allerdings war die Gabe von Paraquat, einem Superoxidanion produzierenden Redoxzykler, für GPx1-Knockout Mäuse letal [74]. Des Weiteren wird zusätzlich eine antikarzinogene Funktion von GPx1 diskutiert. In humanen Brustkrebszellen führte die Überexpression von GPx1 zu einer verminderten Phosphorylierung der Protein-S6-Kinase (p70S6K) und der Serin/Threonin-Kinase Akt, wodurch das DNA-Reparaturgen Gadd45 vermehrt exprimiert wurde [75]. *In vivo* wurde in der Leber beobachtet, dass die GPx1-Expression im Tumor deutlich niedriger ist, als im umliegenden normalen Gewebe.

Unter physiologischen Bedingungen induziert das Tumorsuppressorgen p53 die Expression von GPx1 [76]. Weitere Ergebnisse belegen, dass durch die Reduktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch die GPx1, die Induktion von Apoptose inhibiert wird. In endothelialen Zellen führte die Überexpression von GPx1 zu einer Verminderung des proapoptotischen Proteins Bax und somit zur Inhibierung von Apoptose [77]. Während des Alterungsprozesses von endothelialen Zellen nimmt die Expression von GPx1 ab, wodurch diese vermehrt in Apoptosen gehen [78]. Die konstitutive Überexpression von GPx1 im Mausmodell führte zu Adipositas, Insulinresistenz und zu Diabetes mellitus Typ 2. Die Beteiligung von Wasserstoffperoxiden bei der Insulinantwort der Zelle ist vermutlich ursächlich dafür. Die Überexpression von GPx1 senkte den Level an reaktiven Sauerstoffspezies im Cytosol, dadurch blieb die insulin-vermittelte Phosphorylierung des Insulinrezeptors aus und es lag weniger phosphoryliertes Akt in der Zelle vor, wodurch die Entwicklung einer Insulinresistenz gefördert wurde [79].

1.2.3.2. Glutathionperoxidase 2 (GPx2)

Im Jahr 1993 wurde eine weitere Glutathionperoxidase, die ca. 70 % Homologie zur GPx1-Sequenz aufwies, identifiziert [24]. Die auffälligsten Sequenzunterschiede zwischen GPx1 und GPx2 befinden sich in der 3'UTR der mRNA. Diese sind ursächlich dafür, dass die GPx2 als Haushalts-Selenoprotein einzuordnen ist und im Selenmangel weiterhin exprimiert wird. Somit steht die GPx2 innerhalb der Hierarchie der Glutathionperoxidasen über der GPx1 [80]. Die GPx2 wird hauptsächlich im Kryptengrund der Epithelzellen entlang des Gastrointestinaltraktes exprimiert [25]. Zusätzlich wurde im Menschen in der Leber und im Brustgewebe eine GPx2-Expression dokumentiert [24]. Die Vermutung liegt nahe, dass die GPx2 im Darm als Barriere gegen Hydroperoxidabsorption fungiert [24]. Um die Funktion dieses Enzyms besser verstehen zu können, wurden im Jahr 2000 GPx2-Knockout Mäuse generiert. Das Fehlen des Enzyms verursachte allerdings unter physiologischen Bedingungen keinen erkennbaren Phänotyp [81]. Jedoch entwickelten die Tiere nach einer Behandlung mit Gammastrahlung mehr Hauttumore als Wildtypiere [82]. Ein doppelter Knockout von GPx1 und GPx2 verursachte zunächst Colitis und führte im weiteren Verlauf zur Entwicklung von intestinalen Tumoren in diesen Mäusen [83]. Allerdings war ein GPx2-Allel ausreichend um die Tumorentstehung zu verhindern, deshalb wird vermutet, dass GPx2 antiinflammatorische und antikarzinogene Eigenschaften besitzt [84].

Während der Entwicklung von gastrointestinalen Adenomen wurde die GPx2-Expression transient hochreguliert. In frühen Adenomen war die GPx2-Expression im Vergleich zu Adenomen im fortgeschrittenen Stadium deutlich erhöht [25]. Des Weiteren wurde eine GPx2-Überexpression in Brustkrebs-, Hautkrebs- und im Barrett's Ösophagusgewebe (Speiseröhrenkrebs) dokumentiert [85, 86, 87]. Experimente mit einer humanen

Colonkrebszelllinie (HT29) belegten, dass die Expression von GPx2 prokarzinogene Eigenschaften vermittelt, indem einerseits das Tumorwachstum in Nacktmäusen sowie die eigenständige Koloniebildung in Softagar unterstützt wurden. Allerdings inhibierte GPx2 sowohl die Migration dieser Zellen, als auch deren Invasion. Diese Eigenschaften sind als antikarzinogen zu bewerten. Des Weiteren wird eine antiinflammatorische Wirkung von GPx2 postuliert, da *in vitro* gezeigt wurde, dass GPx2 ein Zielgen des Transkriptionsfaktors Nrf2 ist [88]. Dieser induziert bei oxidativem Stress, welcher durch z.B. Krebs oder Entzündung ausgelöst wird, verschiedene antioxidative Schutzmechanismen. Die Tatsache, dass GPx2 die Expression der Cyclooxygenase-2 (COX2) inhibierte unterstützt die Hypothese, dass GPx2 antiinflammatorisch wirkt, da COX2 ein prominenter Entzündungsmarker ist [89]. In einer weiteren Studie mit den GPx2-Knockout Mäusen schützte eine adäquate GPx2-Expression vor einer durch ein Allergen ausgelösten Luftwegsentzündung [90].

1.3. Morphologie des Colons

Da GPx2 hauptsächlich im Gastrointestinaltrakt exprimiert wird und sich diese Dissertation mit der Colonkarzinogenese beschäftigt, wird im Folgenden der morphologische Aufbau des Colons beschrieben. Das Colon besitzt im Gegensatz zum Dünndarm keine Panethzellen, die durch die Expression von Lysozymen, Laktoferrin, Peptidasen und Defensinen als bakterielle Barriere fungieren. Ein weiterer Unterschied ist, dass sich die Mukosa im Colon ausschließlich in Krypten faltet und im Vergleich zum Dünndarm keine Villi besitzt. Die im Kryptengrund befindlichen Stammzellen teilen sich asymmetrisch, so dass zwei Tochterzellen entstehen, wobei eine die parentale Stammzelle ersetzt und die andere eine transit-amplifizierende Zelle darstellt [91]. Die transit-amplifizierenden Zellen haben nur noch ein begrenztes Teilungsvermögen. Sie migrieren in Richtung Kryptenspitze und differenzieren zu Enterozyten, Becherzellen und enteroendokrinen Zellen. Die Enterozyten sind der am häufigsten auftretende Zelltyp und für die Absorption der Nährstoffe aus der Nahrung verantwortlich. Das von den Becherzellen sezernierte Mucin bildet einen Schutz gegen chemische und mechanische Einwirkungen der Nahrung. Die enteroendokrinen Zellen produzieren verschiedene Hormone (Serotonin, Substanz P).

An der Kryptenspitze gehen die Zellen in Apoptose und werden nach dem Ablösen von der Lamina Propria ins Lumen abgeschilfert. Durch diesen Prozess erneuert sich das Darmepithel alle fünf Tage. Allerdings kann es auch im Kryptengrund spontan zur Apoptose von Zellen kommen. Es wird vermutet, dass dadurch zum einen Zellen mit DNA-Schäden eliminiert werden und zum anderen die Zellzahl der Krypte reguliert wird [92, 93]. Neben der spontan-induzierten Apoptose, kann auch durch induzierten Stress mittels Gammastrahlung oder Chemikalien Apoptose verursacht werden. Es wird vermutet, dass bei der spontan-induzierten Apoptose und bei der durch stress-induzierten Apoptose unterschiedliche

Signalwege aktiviert werden. Die spontan-induzierte Apoptose läuft im Gegensatz zur stress-induzierten Apoptose unabhängig von p53 und Bax ab [93].

Die genaue Lokalisation der Stammzellen im Kryptengrund und die Aufrechterhaltung der Omnipotenz innerhalb einer differenzierten Umgebung war lange Zeit ungeklärt und ist immer noch Gegenstand intensiver Forschung. Inzwischen belegen mehrere Studien mit diversen Stammzellmarkern, wie z.B. SOX4, Lgr5, β 1-Integrin und β -Catenin, dass es ca. vier bis sechs Stammzellen pro Kryptengrund gibt [94, 95, 96].

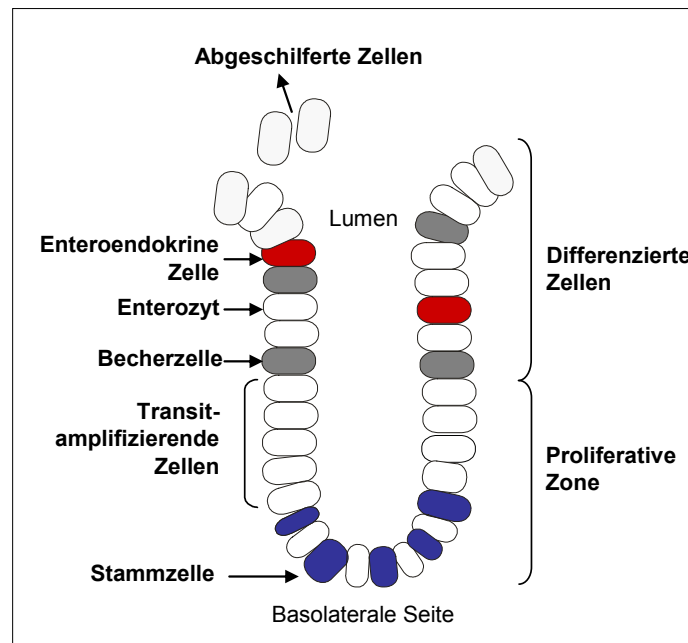


Abb.1.4. Aufbau einer Colonkrypte. Modifiziert nach Fig. 2 in [92]

Ein Gradient aus verschiedenen Rezeptor- und Ligandsignalmolekülen bewirkt die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters am Kryptengrund [97]. Hierbei ist der Wnt-Signalweg für die Physiologie des Darmepithels essentiell. Von den Epithel- und Mesenchymzellen am Kryptengrund werden verschiedene Wnt-Liganden sezerniert, so dass ein Gradient aufgebaut wird, der in Richtung Kryptenspitze wieder absinkt [98]. Das Wnt-Signal verursacht eine Translokation von β -Catenin in den Kern [99]. Dadurch erfolgt die Transkription verschiedener Zielgene, wie z.B. C-Myc, die für die Proliferation und den Zellzyklus wichtig sind. GPx2 ist ein solches Wnt-Zielgen und somit spielt dieses Enzym vermutlich eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und der Homöostase des Epithels [100].

1.4. Entzündung und Krebs

Ursächlich für die Entstehung der meisten Krebsarten sind Mutationen oder epigenetische Veränderungen von Tumorsuppressor- und Onkogenen. Im weiteren Verlauf der Karzinogenese kommt es dadurch zur Modulation von verschiedenen Signalwegen, so dass Zellen mit einem Wachstums- und Überlebensvorteil entstehen. In den meisten Fällen ist

eine Mutation nicht ausreichend, um den karzinogenen Prozess zu initiieren. Es wurde postuliert, dass vier bis fünf Mutationen hierfür notwendig sind [101]. Die Tumorentstehung im Colon wird in 80% der Fälle durch mindestens zwei Mutationen im APC-Gen verursacht. Die daraus resultierende konstitutive Aktivierung des Wnt-Signalwegs führt zur Zellproliferation und somit zur Entstehung von aberranten Krypt Foci [102]. Im weiteren karzinogenen Verlauf kommt es durch genomische Instabilität zur Bildung von frühen Adenomen. Diese können sich durch Mutationen in den Genen K-ras und Smad4, die einerseits zur Inhibierung der Apoptose führen und andererseits das Überleben und die Proliferation vorantreiben, zu späten Adenomen entwickeln. Durch die Mutation des Tumorsuppressorgens p53 kommt es zur Entstehung von colorektalen Karzinomen. Weitere Veränderungen im Aufbau der extrazellulären Matrix und bei der Expression von Matrix-Metalloproteinasen führen zur Transition von Epithelzellen zu mesenchymalen Zellen, welche die Fähigkeit zur Metastasierung haben [101].

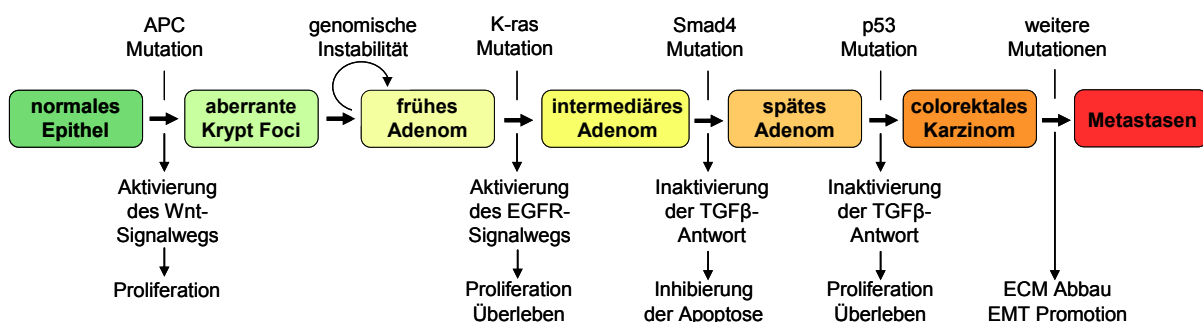


Abb.1.5. Model der Entstehung von Colonkrebs. APC = Adenomatous polyposis coli, K-ras = Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, TGF = transformierender Wachstumsfaktor, ECM = extrazelluläre Matrix, EMT = epitheliale-mesenchymale Transition. **Modifiziert von** Fig.3 in [101]

Die gängige Hypothese ist, dass Mutationen in Geweben mit einer schnellen Zellerneuerung, wie z.B. dem Darmepithel, hauptsächlich in adulten Stammzellen auftreten und daraus Krebsstammzellen entstehen können [103]. Differenzierte Zellen besitzen nur eine kurze Lebensdauer, so dass davon ausgegangen werden muss, dass dieser Zeitraum zu kurz ist, um zu einer Anhäufung verschiedenster Mutationen zu führen [104].

Seit der Beobachtung von Rudolf Virchow im Jahr 1863, dass Tumorgewebe mit Immunzellen infiltriert ist, wird vermutet, dass chronisch entzündetes Gewebe gefährdet ist, Krebs zu entwickeln [105]. Während einer Entzündung versucht sich das Gewebe zu regenerieren. Diese Regeneration findet jedoch in einem speziellen Mikroklima statt, bestehend aus inflammatorischen Zellen, Wachstumsfaktoren und Cytokinen. Bei der Immunantwort werden Mastzellen und Leukozyten zum Entzündungsherd rekrutiert. Nachfolgend kommt es, durch die Phagozytose von Granulozyten und Makrophagen zur Aktivierung der NADPH-Oxidase und dadurch zur Freisetzung von O_2^- und H_2O_2 . Diese Moleküle verursachen DNA-Schäden, so dass Veränderungen in Signalwegen entstehen

können, die für die Homöostase der Zelle essentiell sind [106]. Die Ursachen für die Entstehung einer chronischen Entzündung und einem daraus resultierenden Tumor sind noch nicht genau verstanden. Es wird diskutiert, ob der Transkriptionsfaktor NFκB einen Einfluss darauf hat, da NFκB in Immunzellen die Produktion von Cytokinen aktiviert. Die Cytokine wiederum verursachen die Aktivierung von NFκB in malignen Zellen, wodurch die Produktion von Chemokinen induziert wird [107]. Diese locken mehr Immunzellen in den Tumor, so dass die Entzündung weiter vorangetrieben wird. Es wird vermutet, dass sich Tumore wie Wunden verhalten, die nicht heilen [108]. Jeder Schritt innerhalb der fortschreitenden Tumorgenese, von der Initiation über die Progression bis hin zur Metastasierung, wird durch Entzündung beeinflusst.

Es gibt zahlreiche Belege, dass chronische Entzündungen das Risiko einer Krebsentstehung erhöhen [109]. Dabei kann die Ursache für eine chronische Entzündung sowohl erblich bedingt sein, als auch durch virale, bakterielle oder parasitäre Infektionen ausgelöst werden [110]. Morbus Crohn (MC) und Colitis Ulcerosa (UC) sind chronischentzündliche Autoimmunerkrankungen des Gastrointestinaltrakts, deren Prävalenz in den letzten Jahren stark angestiegen ist [111, 112]. Colitis Ulcerosa tritt, im Gegensatz zu Morbus Crohn, bei dem der gesamte Darm betroffen sein kann, ausschließlich im Dickdarm auf. Bei der Therapie von chronischentzündlichen Erkrankungen werden u.a. nichtsteroidale-antiinflammatorische Wirkstoffe, wie z.B. Aspirin oder Celecoxib eingesetzt, da diese die Entzündung verringern, wodurch auch das Krebsrisiko gesenkt wird [113]. Die adäquate Therapie der Erkrankungen bleibt risikobelastet, da die verwendeten Medikamente auch viele Nebenwirkungen, wie z.B. myokardialer Infarkt, Ösophagitis, Magengeschwüre und Darmperforation, verursachen [114]. Die genauen Ursachen dieser beiden Erkrankungen sind bisher noch ungeklärt. Neben dem Einfluss genetischer Prädispositionen und der Darmflora wird diskutiert, welchen Einfluss die Ernährung auf die Inzidenz dieser Krankheiten hat [115]. Die Idee ist, dass sich eine spezifische Ernährungsweise präventiv auf die Inzidenz dieser Krankheiten auswirken kann und auch das Krebsrisiko senkt.

1.5. Selen und Krebs

Seit den 1960er Jahren wird eine antikarzinogene Funktion von Selen diskutiert [116]. In epidemiologischen Studien wurde festgestellt, dass Menschen, die in Gebieten mit stark selenmangeligen Böden leben, eine erhöhte Krebsmortalität aufwiesen [117]. Des Weiteren korrelierte ein hoher Plasmaselengehalt mit einer niedrigen Krebsmortalität [118]. Ebenso korrelierte in einer Populationsstudie in Linxiang (China) ein niedriger Plasmaselen Spiegel der Probanden mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Speiseröhren- und Magenkrebs [119]. Mittels einer Interventionsstudie, der sogenannten Clark-Studie, Anfang der 1980er Jahre sollte ermittelt werden, ob Selensupplementation einen Einfluss auf die

Reinzidenz von Hautkrebs bzw. auf andere Krebsinzidenzen hat. Die Auswertung der Studie ergab, dass die Selensupplementation keinen Effekt auf die Reinzidenz von Hautkrebs hatte. Allerdings lag bei Selensupplementation ein signifikant vermindertes Prostata-, Lungen- und Colonkrebsrisiko vor [120]. Diese Ergebnisse sollten mit der im Jahr 2000 gestarteten groß angelegten SELECT-Studie zur Prävention von Krebs durch Intervention mit Selen und Vitamin E bestätigt werden. Die Selensupplementation wurde allerdings im Jahr 2008 abgebrochen, da bis zu diesem Zeitpunkt kein Einfluss von Selen auf die Prostatakrebsinzidenz bzw. andere Tumorinzidenzen nachgewiesen werden konnte [121]. Der größte Anteil der Probanden hatte zum Beginn der Selensupplementation einen hohen Plasmaselen Spiegel. Deshalb wird vermutet, dass diese Probanden nicht von der Selensupplementation profitieren konnten. Trotz des Abbruchs der Supplementation ist die Idee mittels Selengabe bestimmten Krebsarten vorzubeugen bzw. die Reinzidenz zu verhindern, weiterhin Bestandteil verschiedener Interventionsstudien (Tab.1.3.).

Tab.1.3. Interventionsstudien zu Selensupplementation und Krebs

Land	Dauer	Probanden	Supplementation	Untersuchung/Ziel	Quelle
<u>NPC - Studie über Ernährungsbedingte Prävention von Krebs (1983-91)</u>					
USA	4,5 Jahre Verlaufskontrolle: 6,4 Jahre	1312	200 µg Selen/Tag Selen-angereicherte Hefe	Einfluss von Selen auf das Wiederauftreten von Hautkrebs	[120]
Ergebnis	kein Einfluss von Selen auf die Reinzidenz von Hautkrebs, aber verringertes Colorektal-, Lungen- und Prostatakrebsrisiko				
<u>Generelle Populationsstudie in Linxiang, China (1986-91)</u>					
China (Linxiang)	5,25 Jahre Verlaufskontrolle: 15 Jahre	1103	50 µg Selen/Tag Selen-angereicherte Hefe 15 mg β-Carotin 30 mg α-Tocopherol	Einfluss von Selen auf gastritischen Krebs (z.B. Magenkrebs)	[119]
Ergebnis	niedrige Plasmaselenlevel korrelierten mit erhöhtem Risiko für die Entstehung von Speiseröhren- und Magenkrebs				
<u>PRECISE - Prävention von Krebs durch Intervention mit Selen (seit 1999)</u>					
Dänemark, Schweden, UK	8 Jahre Vorstudien: 1999-2004	500	100, 200, 300 µg Selen/Tag Selen-angereicherte Hefe	Einfluss von Selen auf Gesamttumorinzidenz in gesunden Probanden	[122]
Ergebnis	Auswertung von Biomarkern für Selenaufnahme bestätigte Selensupplementation, kein Auftreten von adversen Effekten				
<u>Einfluss von Selen bei Therapie von Hals- und Kopfkrebs (1999)</u>					
USA	8 Wochen	33	200 µg Selen/Tag Natriumselenit	Einfluss von Selen auf Therapieverlauf bei Hals- und Kopfkrebs	[123]
Ergebnis	Selensupplementation verbesserte zellvermittelte Immunantwort				

Land	Dauer	Probanden	Supplementation	Untersuchung/Ziel	Quelle
SELECT - Prävention von Krebs durch Intervention mit Selen und Vitamin E (2000-2008)					
USA Kanada	3 Jahre Verlaufskontrolle: 7-12 Jahre Abbruch: 2008	35533	200 µg Selen/Tag <i>L</i> -Selenomethionin 400 IU Vit. E/Tag <i>all rac</i> - α -Tocopherylacetat	Einfluss von Selen auf Prostata-, Colon- und Lungenkrebs	[121]
Ergebnis	kein Einfluss von Selen auf die Prostatakrebsinzidenz oder andere Tumorinzidenzen, leicht erhöhtes Risiko für Typ 2 Diabetes Mellitus durch Selensupplementation				
Selensupplementation bei Behandlung von adenomatösen colorektalen Polypen (seit 2001)					
USA	3-5 Jahre Verlaufskontrolle: 5 Jahre	1850	einmal Selen/Tag	Einfluss von Selen auf das Wiederauftreten bzw. die Entstehung von colorektalen Polypen	[124]
Ergebnis	noch keine Ergebnisse vorhanden				

Parallel zu den Studien im Menschen wurde auch im Tiermodell intensiv eine antikarzinogene Wirkung von Selen erforscht. Die Anreicherung von Futter mit Selen (5 ppm) resultierte in einer verminderten Tumorinzidenz in Ratten [125]. Die Forschergruppe von Maryce M. Jacobs untersuchte die Wirkung von Selen auf die durch ein Karzinogen verursachte Colontumorgenese in Ratten. In dieser Studie führte die Selensupplementation zu einer signifikant verminderten Tumoranzahl [126]. Es bleibt weiterhin ungeklärt, ob die antikarzinogenen Effekte von Selen selber oder über Selenoproteine vermittelt werden. Vermutlich sind beide in den präventiven Prozess involviert. Die Inkubation sowohl von Selenomethionin als auch Methylseleninsäure inhibierte das Wachstum von Krebszellen [127, 128, 129]. Bei der genetischen Analyse von gesunden Probanden und Patienten mit colorektalem Krebs waren Einzelnukleotidpolymorphismen in den Genen von Selenoprotein S, Selenoprotein P und GPx4 mit einem erhöhten colorektalem Krebsrisiko assoziiert [130]. Zusätzlich wurden antiinflammatorischen Eigenschaften von Selen und Selenoproteinen *in vivo* durch verminderte proinflammatorische und extrazelluläre matrixverwandte Genexpression in Makrophagen demonstriert [131, 132].

1.6. Zielsetzung

Es ist bekannt, dass der Knockout von GPx1 und GPx2 Colitis und Colontumore verursacht [83]. Des Weiteren offenbarte sich, dass ein GPx2-Allel ausreichend ist, um sowohl Colitis als auch die Tumorentstehung zu verhindern, wodurch die Vermutung nahe liegt, dass GPx2 antiinflammatorische und antikarzinogene Eigenschaften besitzt [84].

Das Ziel dieser Arbeit war die nähere Charakterisierung der GPx2-Knockout Maus. Dabei sollte näher erforscht werden, welche Funktion GPx2 unter physiologischen Bedingungen ausübt.

Zunächst sollte in Wildtyp-Tieren untersucht werden, ab welchem Zeitpunkt postnatal GPx1 und GPx2 exprimiert werden und wie sich die Gesamt-GPx-Aktivität von postnatal bis ins jugendliche Alter verändert. Der Vergleich zwischen Wildtyp- und GPx2-Knockout-Maus sollte Aufschluss darüber geben, ob es unter physiologischen Bedingungen zu morphologischen Veränderungen des Colons kommt. Des Weiteren sollten Enzymexpressionanalysen durchgeführt werden, um zu analysieren ob der GPx2-Knockout beispielsweise die Expression der GPx1 im Colon beeinflusst.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte ermittelt werden welchen Einfluss GPx2 auf die entzündungsvermittelte Colonkarzinogenese hat. Hierfür sollte ein Tierversuch mit Wildtyp- und GPx2-Knockout-Mäusen durchgeführt werden. Das verwendete Futter sollte drei verschiedene Selenkonzentrationen aufweisen und wurde als Selen marginal-defizient, -adäquat und -supplementiert eingestuft. Die Colonkarzinogenese sollte durch die Applikation des Karzinogens Azoxymethan (AOM) initiiert werden. Die Gabe von Natrium-Dextransulfat (DSS) sollte eine Entzündung im Colon verursachen, wodurch der karzinogene Prozess stimuliert werden sollte. Zum einen sollte in der akuten Entzündungsphase eine Woche nach der DSS-Applikation der Entzündungsstatus des Colons bewertet werden. Diese Daten sollten Antworten über Unterschiede im Entzündungsstatus zwischen Wildtyp-Tieren, GPx2-Knockout-Tieren und den drei verschiedenen Selendiäten liefern. Zum anderen sollte 12 Wochen nach der AOM-Gabe am Ende des Versuchs die Auswertung von Tumorstufen und Tumoren erfolgen. Hierbei sollte geklärt werden, ob es Unterschiede in der Anzahl und Größe von Tumorstufen (ACF) bzw. Tumoren gibt. Ebenfalls sollte die Verteilung der Tumore entlang des Colons dokumentiert werden.

2. METHODEN

2.1. Tierversuche

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Tierversuche wurden mit männlichen C57Bl/6J Wildtyp (WT) und GPx2^{-/-}C57Bl/6Jx129SV/J (GPx2-Knockout) Mäusen durchgeführt. Die GPx2-Knockout Maus wurde zur Verfügung gestellt von Dr. Fong-Fong Chu (Beckman Research Institute, City of Hope, USA). Das Gpx2-Gen enthält 2 Exons. Die Deletion von Exon 1 verhindert die vollständige mRNA-Synthese des Gens. Somit ist in der GPx2-Knockout Maus weder die GPx2-mRNA noch das GPx2-Protein detektierbar. Zur Charakterisierung des Genotyps wurde bei den Mäusen im Alter von 4 Wochen eine Schwanzspitzenbiopsie durchgeführt, welche mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (siehe 2.2.) analysiert wurde.

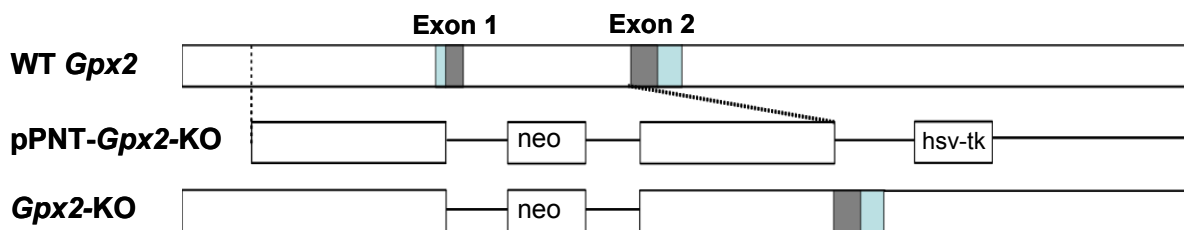


Abb.2.1. Konstruktion des GPx2-Knockout (KO). Dargestellt ist das GPx2-Gen der Maus (*mus musculus*). Das GPx2-KO Konstrukt wurde erzeugt, indem das Exon 1 durch ein Konstrukt aus dem pPNT-Vektor, der das Neomycingen beinhaltet, und einer Herpes-simpex-Virus-Thymidinkinase-Kassette ersetzt wurde. Der Austausch des GPx2-Gen mit dem mittleren DNA-Konstrukte (pPNT-Gpx2-KO) erfolgte durch homologe Rekombination. Exon 1 und Exon 2 sind grau markiert. Die 3'- und 5'-nicht-translatierten Regionen sind blau unterlegt. neo = Neomycin-Kassette, hsv-tk = Herpes-simpex-Virus-Thymidinkinase. Quelle: abgewandelt von Fig.1A [81]

Die von Dr. Chu erhaltenen GPx2-Knockout Männchen wurden zunächst mit WT Weibchen verpaart. Die daraus resultierende heterozygote männliche F1-Generation (HET) wurde erneut mit WT Weibchen verpaart. Anschließend wurden die daraus entstandenen heterozygoten Weibchen und Männchen der F2-Generation miteinander verpaart. Die weitere Zucht zur Erhaltung der GPx2-Knockout-Mauslinie erfolgte mit den daraus resultierenden Wildtyp, GPx2-Knockout und HET Tieren. Für die Tierversuche wurden WT Männchen und Weibchen sowie GPx2-Knockout Männchen und Weibchen miteinander verpaart, um eine größtmögliche Anzahl an WT und GPx2-Knockout Männchen zu erhalten. Die Haltung der Versuchstiere erfolgte unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF) bei einem 12-stündigen Licht-Dunkel-Rhythmus und freiem Zugang zu Wasser und Futter nach Vorschrift des Tierschutzgesetzes. Die Tötung der mit Isofluran (Shop pharma, Burgdorf, D) narkotisierten Tiere erfolgte durch zervikale Dislokation.

2.1.1. Tierversuch in Abhängigkeit vom Alter

30 männliche C57Bl/6J Wildtyp Mäuse wurden in 6 verschiedene Altersgruppen (0, 1, 2, 4, 6 und 8 Wochen alt) mit jeweils 5 Tieren pro Gruppe eingeteilt und bekamen im Alter von

4 Wochen nach dem Absetzen vom Muttertier Haltungsfutter verabreicht (Ssniff, Soest, D), welches einen Selengehalt von 0,36 mg/kg Futter aufwies. Im Laufe des Versuchs wurde eine *Helicobacter*-Infektion nachgewiesen, die allerdings zu keinem Krankheitsbild führte. Nach der Tötung der Tiere wurden die entnommenen Organe mit einer in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Gefrierzange schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.1.2. Model für entzündungsassoziierten Dickdarmkrebs

169 männliche Wildtyp C57Bl/6J (WT) und GPx2^{-/-}C57Bl/6Jx129SV/J (GPx2-Knockout) Mäuse aus eigener Zucht erhielten ab einem Alter von 4 Wochen Selen marginal-defizientes, selenadäquates oder selensupplementiertes Futter. Die Tiere wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF) in einzelbelüfteten Käfigen (IVC, Techniplast, Italien) gehalten. Die Verabreichung des Futters erfolgte in Form von Pellets. Das selenarme Futter (Nr. C1045 mit 50 % Kohlenhydraten, 17 % Protein, 5 % Fett, 4 % Ballaststoffen und einer Mixtur aus Mikronährstoffen; Altromin, Lage, D) auf Basis von Torulahefe hatte laut eigener Messung einen Selengehalt von 0,08 mg/kg Futter. Das selenadäquate Futter wurde durch Zumischung von Selenomethionin (Acros, Geel, Belgien) auf einen Selengehalt von 0,15 mg/kg Futter eingestellt und das selensupplementierte Futter entsprechend auf 0,66 mg/kg. Die Selengehalte wurden mittels Fluorimetrie (2.8) bestimmt. Für das entzündungsassoziierte Dickdarmkrebsmodell wurden die Tiere in 12 Gruppen mit jeweils 14 Tieren (bzw. einmalig 15 Tiere) eingeteilt:

Tab.2.1. Einteilung der Versuchsgruppen

Selen marginal-defizient				Futter							
				selenadäquat				selensupplementiert			
Lösemittel-kontrolle		AOM/DSS		Behandlung							
				Lösemittel-kontrolle		AOM/DSS		Lösemittel-kontrolle		AOM/DSS	
WT GPx2-KO WT GPx2-KO				Genotyp							
				WT GPx2-KO		WT GPx2-KO		WT GPx2-KO		WT GPx2-KO	
				Σ 12 Gruppen à 14 Tiere							

Im Alter von 9 Wochen erfolgte die intraperitoneale Injektion von Azoxymethan (AOM, 10 mg/kg Körpergewicht, Sigma-Aldrich, Steinheim, D) bzw. isotonomischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl, Sigma-Aldrich, Steinheim, D) bei der Kontrollgruppe. Eine Woche später erhielten die Behandlungsgruppen 1% Natrium-Dextransulfat (DSS, MP biomedical, Eschwege, D) für 7 Tage im Trinkwasser bzw. reines Trinkwasser in den Kontrollgruppen. Den Tieren wurde über einen Zeitraum von 4 Wochen (im Alter von 8 bis 12 Wochen) jeden zweiten Tag 100 µl Kalium-Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7,4) per Schlundsonde verabreicht (als Kontrolle für eine Sulforaphan-Behandlung).

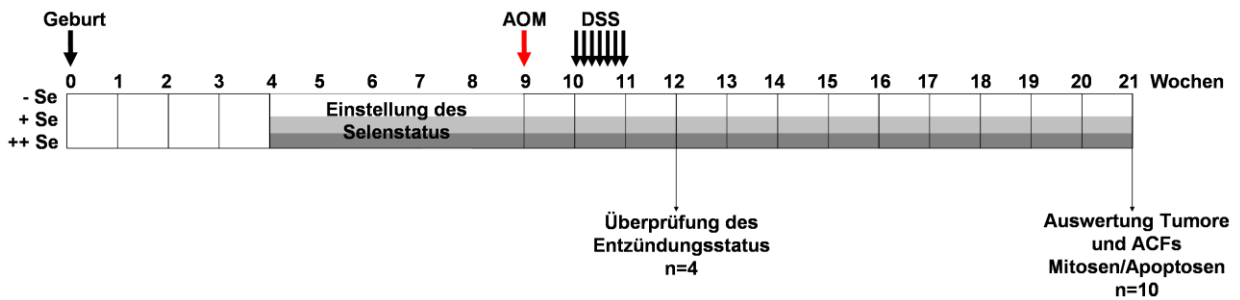


Abb.2.2. Experimentelles Design des Tierversuchs für entzündungsassoziierten Dickdarmkrebs.
 AOM = Azoxymethan, DSS = Natrium-Dextransulfat, ACF = aberranter Krypt Foci

Das Gewicht der Tiere wurde im Alter von 8 bis 12 Wochen jeden zweiten Tag und im Alter von 12 bis 21 Wochen einmal pro Woche ermittelt. Ab der DSS-Applikation im Alter von 10 Wochen wurde zusätzlich die Konsistenz bzw. Verfärbungen des Fäzes sowie okkultes Blut im Kot dokumentiert. Im Alter von 12 bzw. 21 Wochen wurden die Tiere mittels Isofluran narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Es erfolgte die Aufteilung des Colons für verschiedene Analysen (Abb.2.3.1. und Abb.2.3.2.). Das Ileum wurde wie folgt aufgeteilt: ca. 4 cm proximal wurden mit einer in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Gefrierzange schockgefroren und bei -80°C gelagert und 1 cm distal wurde in 4%iger Formaldehydlösung (Merck, Darmstadt, D) fixiert. Der rechte Leberlappen wurde in Formaldehydlösung fixiert und das restliche Lebergewebe wurde schockgefroren.

2.2. Genotypisierung

Für die Genotypisierung wurde die Schwanzspitzenbiopsie zunächst proteolytisch verdaut (Tab. 2.2.). Nach 4 h Inkubation bei 50°C und 1000 U/min im Thermoschüttler (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D) erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Proteinase K für 10 min bei 95°C.

Tab.2.2. Ansatz für die Gewebelyse

Reagenzien	Volumen in µl	Finale Konzentration	Firma/ Bestandteile
H ₂ O ad 50 µl	39,5		
10 x Gitschier-Puffer	5	1 x	670 mM TRIS-HCl pH 8,8; 0,5 % (v/v) Triton X-100 160 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 65 mM MgCl ₂
Proteinase K (10 mg/ml)	5	5 µg	AppliChem, Darmstadt, D
β-Mercaptoethanol	0,5	1 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Die anschließende Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Analyse des Genotyps wurde mit spezifischen WT- und GPx2-Knockout-Primern (Tab.2.3.) durchgeführt. Die PCR der Genotypisierungsansätze (Tab.2.3.) wurde im Thermozykler (T3 Thermozykler, Biometra, Göttingen, D) durchgeführt und bestand aus 3 Phasen: Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Primer und Elongation (Tab. 2.3.).

Tab.2.3. PCR-Ansatz für die Genotypisierung

Reagenzien	Volumen in µl	Finale Konzentration	Firma / Sequenz der Oligonukleotide
H ₂ O ad 25 µl	18,875		
10 x DreamTaq™ Green Puffer	2,5	1 x	Fermentas, Leon-Rot, D
MgCl ₂ (25 mM)	0,5	0,5 mM	Fermentas, Leon-Rot, D
dNTPs (25 mM)	0,5	0,5 mM	Bioline, Luckenwalde, D
Primer forward GPx2 (25 µM)	0,5	0,5 µM	5' GTGCTGATTGAGAATGTGGC 3'
Primer forward pNTpgK1 (25 µM)	0,5	0,5 µM	5' CAGTTTCATAGCCTGAAGAACGAGAT 3'
Primer reverse Mpxin09 (25 µM)	0,5	0,5 µM	5' TCCATGCCAACGTAGTGATT 3'
Taq-Polymerase (5u/µl)	0,125	0,003125 u	DreamTaq™, Fermentas, Leon-Rot, D
Template	1		

Phase	Temperatur in °C	Zeit
Denaturierung	95	2 min
Denaturierung	95	30 sec
Primer-Hybridisierung	58	45 sec
Elongation	72	45 sec
Finale Elongation	72	10 min

Die PCR-Produkte (Wildtyp-PCR: 450 bp, GPx2-Knockout-PCR: 480 bp) wurden in einem 1,5%igen Agarosegel (Biozym LE Agarose, Oldendorf, D) aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) unter UV-Licht visualisiert.

2.3. Histologie und indirekte Immunhistochemie

2.3.1. Analyse des Entzündungsstatus im Colon

Eine Woche nach der DSS-Applikation erfolgte die Tötung von 4 Tieren pro Gruppe (Alter: 12 Wochen) zur Analyse der Entzündung des Colons. Der proximale Teil des Colons diente zur biochemischen Analyse (Western Blot, Aktivitätsmessungen, etc.) und wurde schockgefroren und bei -80°C gelagert. Der transverse und distale Teil des Colons wurde aufgerollt und in 4%iger Formaldehydlösung fixiert (Abb.2.3.).

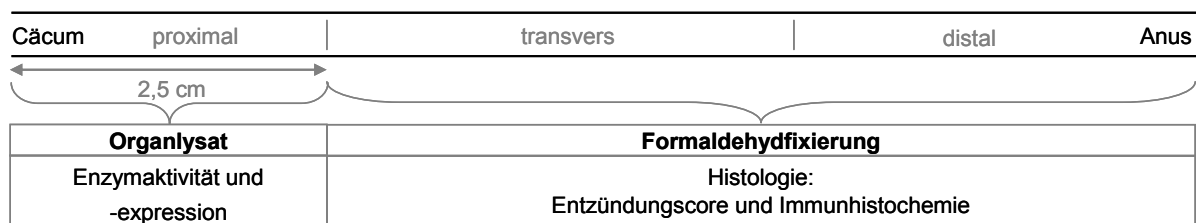


Abb. 2.3. Aufteilung des Colons für Analyse des Entzündungsstatus und Enzymexpression

Der Entzündungsstatus des Colons wurde auf der längs geschnittenen und in Paraffin (HISTOPLAST, Shandon, USA) eingebetteten Hämatoxylin/Eosin gefärbten Colonrolle analysiert. Der Entzündungsscore bestand aus verschiedenen Parametern (Tab.2.4.). Die histologische Auswertung des Colons fand am Mikroskop statt (Zeiss Axio Observer D1, Jena, D). Für die Beurteilung der Colon-Makroskopie wurden direkt nach der Organentnahme morphologische Veränderungen, wie z.B. Schwellung, Verkürzung, Rötung dokumentiert.

Tab.2.4. Parameter des Entzündungsscores

Histologischer Score	Bewertung	Score
Mucosaverlust	moderat, stark	1, 2
Einblutungen	ja	1
Ödem der Mucosa/Submucosa	ja	1
Kryptenarchitektur	gestört	1
Entzündliche Infiltration	mild, moderat, stark	1, 2, 3
Klinische Daten	Bewertung	Score
Gewichtsverlust	1-3 g, > 3 g	1, 2
Diarrhö	1-6 Tage, ≥ 7 Tage	1, 2
Okkultes Blut	ja	1
Colon Makroskopie	Bewertung	Score
Sichtbare Veränderungen (Verkürzung, Schwellung)	leicht, moderat, stark	1, 2, 3
		Σ maximal 16 Punkte

2.3.2. Quantifizierung von Tumoren und aberranten Krypt Foci (ACF)

Bei der Organentnahme 12 Wochen nach der AOM Injektion wurden die verbliebenen 10 Tiere pro Gruppe (Alter: 21 Wochen) getötet. Das gesamte Colon wurde entnommen. Ein definiertes Colonstück wurde zur Quantifizierung von Apoptosen bzw. Mitosen verwendet (2.3.3). Das restliche Colon wurde auf Filterpapier aufgespannt und in 4%iger Formaldehydlösung fixiert, um eine maximale Breiten- und Längenausdehnung zu erreichen. Nach der Spülung des Colons für 1 min in PBS-Lösung (0,14 M NaCl₂, 10 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O) erfolgte die Färbung in Methylenblaulösung (0,1 % Methylenblau in PBS-Lösung) für ca. 2 - 4 min. Die dadurch entstehende selektive Färbung des Gewebes ermöglicht eine Analyse der ACF und Tumore. Anschließend wurde das Colon in PBS-Lösung überführt und 10 min inkubiert, um eine gleichmäßige Verteilung des Farbstoffs in allen Zellen bzw. Krypten zu erzielen. Die Zählung von Tumoren und ACF erfolgte am Binokular (Objektiv: DF Plan 1,5 x, Olympus SZH10 research stereo, Hamburg, D). Die Tumorgöße wurde ermittelt durch Messung an der größten Ausdehnung des Tumors. Einzelne Tumore wurden nach der Zählung für weitere histologische und immunhistochemische Analysen heraus-präpariert und in Paraffin eingebettet (siehe 2.3.4.).

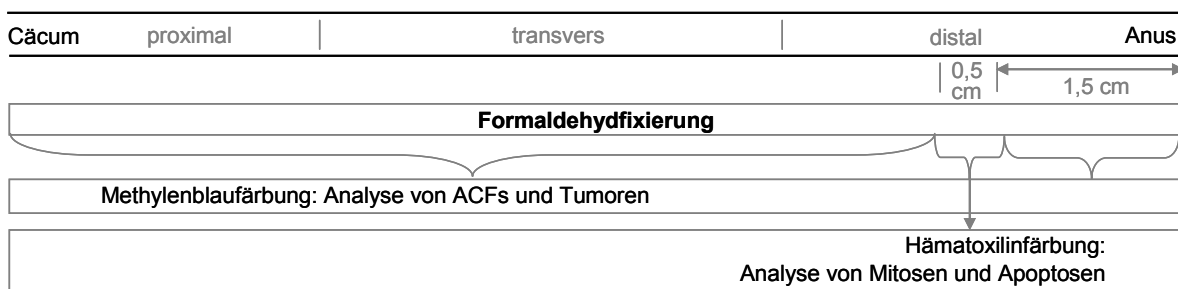


Abb. 2.4. Aufteilung des Colons zur Analyse von ACF, Tumoren, Mitosen und Apoptosen

2.3.3. Quantifizierung von Apoptosen/Mitosen

Bei der Tötung wurde vor dem Aufspannen des Colons auf Filterpapier in einer Distanz von 1,5 cm zum Anus ein 0,5 cm großes Stück Colon herauspräpariert und in 4%iger Formaldehydlösung fixiert. Das in Paraffin eingebettete Colongewebe wurde quer angeschnitten und mit Hämatoxylin gefärbt. Die Quantifizierung der Apoptosen bzw. Mitosen erfolgte am Mikroskop (Objektiv 60 x, Zeiss Axio Observer D1, Jena, D). Apoptotische Zellen wurden charakterisiert anhand von morphologischen Veränderungen identifiziert (Zellschrumpfung, Kernkondensation, perinukleare Klärung, etc.). Mitotische Zellen wurden durch die charakteristischen Phasen der Mitose (Pro-, Meta-, Ana- und Telophase) klassifiziert, innerhalb derer es zur Chromatinkondensation und Chromosomenformation kommt. Die Quantifizierung erfolgte in 200-300 longitudinal angeschnittenen Colonkrypten pro Maus. Für die Auswertung wurde die Krypte gedanklich in 4 gleichgroße Abschnitte unterteilt, wobei der erste Abschnitt der Kryptenspitze und der vierte Abschnitt dem Kryptengrund entspricht (Abb.2.5.).

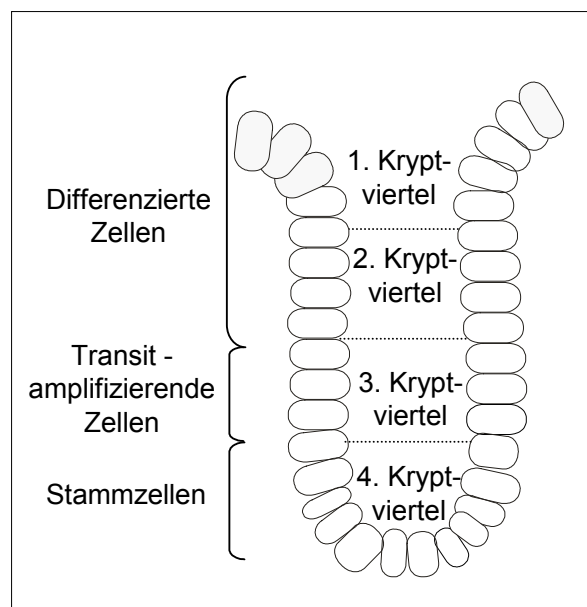


Abb. 2.5. Darstellung einer Colonkrypte. Für die Quantifizierung von Mitosen und Apoptosen gedankliche Unterteilung in 4 gleich große Abschnitte.

2.3.4. Gewebeaufarbeitung für Immunfärbungen

Die Organproben wurden in 4%iger Formaldehydlösung für 24 h fixiert und anschließend für 24 h unter fließendem Leitungswasser gespült. Die Dehydrierung der Proben im Entwässerungsautomaten (HYPERCENTER®XP, Shandon, USA) erfolgte über eine aufsteigende Ethanolreihe, 100 % Toluol und Paraffin (Tab.2.5.).

Tab.2.5. Dehydrierung der Gewebe

Substanz	Zeit in min	Temperatur in °C	Vakuum
Ethanol, 55 %	45	40	ohne
Ethanol, 70 %	70	40	ohne
Ethanol, 96 %	90	40	ohne
Ethanol, 96 %	105	40	ohne
Ethanol, 100 %	90	40	ohne
Ethanol, 100 %	150	40	ohne
Toluol	90	40	mit
Toluol	150	40	mit
Paraffin	120	60	mit
Paraffin	180	60	mit

Abschließend wurden die Proben in Paraffin eingebettet. Das Schneiden der gekühlten Paraffinblöcke in 2 µm dicke Schnitte erfolgte am Microtom (MICROM, Walldorf, D). Im Anschluss wurden die Schnitte in 37°C warmes Wasser überführt, um eine Streckung des Schnittes zu erzielen. Danach wurden die Schnitte auf Objektträger gezogen und getrocknet. Die Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte wurde mittels 100 % Toluol und einer absteigenden Ethanolreihe erreicht (Tab.2.6.).

Tab.2.6. Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte

Substanz	Zeit in min
Toluol	2:00
Toluol	3:00
Ethanol, 100 %	2:00
Ethanol, 100 %	3:00
Ethanol, 96 %	2:00
Ethanol, 70 %	1:45
Ethanol, 40 %	2:00
Aqua dest.	1:30

2.3.5. Hämatoxilin-färbung

Hämatoxilin dient zur Färbung von Zell- und Gewebestrukturen, wie z.B. Zellkernen. Dadurch wird eine Quantifizierung von Mitosen und Apoptosen (2.7.2.) ermöglicht. Für die Hämatoxilin-färbung wurden die Schnitte mit Mayers Hämalaun (Merck, Darmstadt, D) für 1 min bei RT inkubiert und anschließend für 5,5 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Eine Spülung mit destilliertem H₂O für 30 sec wurde angeschlossen. Die Dehydrierung der Gewebeschnitte erfolgte in einer aufsteigenden Ethanolreihe und 100 % Toluol (Tab. 2.7.).

Tab.2.7. Dehydrierung der Gewebeschnitte

Substanz	Zeit in min
Ethanol, 70 %	1:30
Ethanol, 96 %	2:00
Ethanol, 100 %	2:00
Ethanol, 100 %	2:30
Toluol	2:30
Toluol	3:30

2.3.6. Immunhistochemie

Die Expression verschiedener Proteine im Colon wurde mittels Immunhistochemie analysiert. Bei dieser Methode werden Proteine mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht. Das Antigen des zu untersuchenden Proteins wird vom Primärantikörper erkannt und gebunden. An den Primärantikörper bindet ein spezifischer Sekundärantikörper, der zusätzlich an ein Enzym gekoppelt ist, welches das anschließend angebotene Substrat umsetzen kann. Die Substratumsetzung resultiert in einer sichtbaren Färbung des zu untersuchenden Proteins. Eine starke Färbung stellt somit eine hohe Expression des Proteins dar.

Zunächst wurden die Schnitte einer Hitzebehandlung (Mikrowelle, 5 min, 850 W) in 10 mM Na-Citrat (pH 6.0) unterzogen, um das Antigen des zu untersuchenden Proteins zu demaskieren. Anschließend wurden die Schnitte mit destilliertem H₂O gespült. Eine Inkubation für 10 min mit 3 % H₂O₂ in deionisiertem Wasser diente zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität. Zwischen den nachfolgenden Schritten erfolgte eine Spülung mit PBS (pH 7.4). Die Inkubation der Schnitte mit den Primärantikörpern Kaninchen-anti-Human GPx2 Antiserum (Hersteller siehe Tab.2.9., Verdünnung 1:12000 in Antikörperverdünnungsmedium S3022, DAKO, Hamburg, D) oder Kaninchen-anti-Human GPx1 Antiserum (Hersteller siehe Tab.2.8., Verdünnung 1:6500 in Antikörperverdünnungsmedium S3022, DAKO, Hamburg, D) erfolgte für 18 h bei 4°C. Im Anschluss wurden die Schnitte mit dem Sekundärantikörper (Simple Stain Mouse MAX PO (R) Universal Immuno-Peroxidase Polymer for mouse tissues, Anti rabbit, N-Histofine®, Nichirei BIOSCIENCES, Tokio, Japan) inkubiert. Die Visualisierung der Antikörperbindung erfolgte mittels Inkubation mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Chromogen Substrate Kit, Diagnostic BioSystems, Pleasanton, USA) für 1 min bei RT. Anschließend wurden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe und Toluol (Tab. 2.7.) dehydriert. Abschließend erfolgte die Einschließung der Schnitte unter Deckgläschen mittels Kunstharz (Entellan, Merck, Darmstadt, D). Die Analyse der Proteinexpression in den Colonekrypten erfolgte am Mikroskop (Zeiss Axio Observer D1, Jena, D). Die Expression wurde wie folgt bewertet: keine Expression = 0 Punkte, schwache Expression = 1 Punkt, mäßige Expression = 2 Punkte und für eine starke Expression wurden 3 Punkte vergeben.

2.4. Herstellung von Proteinlysaten aus Organen

Für die Analyse von Proteinexpressionen und Enzymaktivitäten wurden aus verschiedenen Organen Proteinlysate hergestellt. Die Homogenisation von 20 mg schockgefrorenem Gewebe erfolgte mit einem in Stickstoff gekühlten Mörser. Das Homogenat wurde anschließend in ein auf Eis gekühltes Safelock-Gefäß mit 500 µl GPx-Homogenisationspuffer (100 mM TRIS, 300 mM KCl, 0,1 % TritonX-100, pH 7,6) und 4 µl Proteinase Inhibitor (Protease-Inhibitor-Cocktail-Set-III, Calbiochem, Darmstadt, D) überführt. Nach der Zugabe einer Metallkugel (2,5 mm Durchmesser, KGM, Fulda, D) erfolgte die Gewebezerkleinerung in einer Kugelmühle (Qiagen Tissue Lyser, Hilden, D) für 2 x 2 min bei höchster Frequenz (30 Hz). Zwischenzeitlich wurden die Proben auf Eis abgekühlt. Nach dem Entfernen der Metallkugel wurden die Proben für 15 min bei 4°C und höchster Geschwindigkeit (16400 rpm) zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge R180D, Wesseling-Berzdorf, D). Abschließend wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.5. Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt der Organlysate wurde in nach der von Marion M. Bradford beschriebenen Methode quantifiziert [133]. Bei einer Komplexbildung des verwendeten Farbstoffs Coomassie-Brillant-Blau G-250 (Bio-Rad, München, D) mit sauren und basischen Seitenketten von Proteinen wird der Farbstoff in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfonatform stabilisiert und das Absorptionsmaximum verschiebt sich von 470 nm auf 595 nm. Für die Messung der Proteinkonzentration in einer 96-Loch-Platte (Zellkultur Testplatten 96 F, Technic Plastic Products, Trasadingen, CH) wurde zu 10 µl Probe (Verdünnung Colon und Ileum 1:30, Verdünnung Leber 1:100) 200 µl Bradford-Färbelösung (Verdünnung 1:5, Bio-Rad, München, D) zugegeben. Nach einer Inkubation für 15 min bei RT erfolgte die Absorptionmessung bei 630 nm im Plattenphotometer (BioTek Synergy 2, Bad Friedrichshall, D). Zur Quantifizierung wurde eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen (zwischen 20 und 300 µg/ml) von bovinem Serumalbumin (BSA, Protein Assay Standard II, BioRad, München, D) verwendet.

2.6. SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) und Western Blot

SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein Detergens, welches die Eigenladungen von Proteinen überdeckt, sodass die Proteine eine konstante negative Ladung aufweisen. Die denaturierten Proteine werden auf ein Gel aus Polyacrylamid geladen, welches in Elektrolyte eingelegt ist. Das Gel fungiert als Sieb. Die Anlegung eines elektrischen Feldes bewirkt die Wanderung der negativ geladenen Proteine zur Kathode und dadurch die Auftrennung der Proteine der Größe nach. Die nach der Auftrennung ihrer Größe nach sortierten Proteine werden beim Western Blot durch Bindung spezifischer Antikörper sichtbar gemacht.

Zur Probe (Endkonzentration 50 µg Protein) wurden 4 µl 5 x Lämmli-Puffer (312,5 mM TRIS (pH 6,8), 10 % SDS, 12,5 % β-Mercaptoethanol, 50 % Glycerin, 0,625 % Bromphenolblau) und ein entsprechendes Volumen H₂O zugegeben, sodass jeder Ansatz ein Endvolumen von 20 µl hatte. Während der Denaturierung der Proteine für 5 min bei 95°C erfolgte die Vorbereitung der Gelapparatur (Biometra, Minigel-Twin G42, Göttingen, D). Der gesamte Ansatz (20 µl) und ein Proteinmarker (Bio-Rad, München, D) wurden auf ein Polyacrylamidgel geladen.

Tab.2.8. Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

Sammelgel (5,5 %)	Substanz	Trenngel (12,5 %)
3,06 ml	H ₂ O	2,44 ml
638 µl	AA (29:1) 40 %	1,87 ml
0,5 M; pH 6,8; 1,25 ml	TRIS-HCl	1,5 M; pH 8,8; 1,5 ml
50 µl	SDS 10 %	60 µl
50 µl	APS 10 %	60 µl
50 µl	TEMED 10 %	60 µl

Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Stromstärke von 15 mA pro Gel in 1 x Elektrophoresepuffer (25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 3,4 mM SDS, pH 8,5). Anschließend wurde die Blotapparatur (Amersham Pharmacia Biotech, Model TE77, Freiburg, D) vorbereitet. Das Gel, die Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schüll, Dassel, D) und das Filterpapier (Schleicher & Schüll, Dassel, D) wurden vollständig mit Blotpuffer (25 mM TRIS, 100 mM Glycin, 15 % Methanol, pH 8,3) getränkt. Nach der Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran mittels *semi-dry*-Verfahren für 2 h bei 4°C und einer Stromstärke von 1,2 mA/cm² erfolgte die Inkubation der Membran für 1 h in 5%iger Magermilchlösung (in TRIS-gepufferter Kochsalzlösung mit Tween 20 (TTBS; 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20, pH 7,5)) zur Blockierung unspezifischer Bindungen. Während der nachfolgenden Schritte wurde die Membran mehrmals in TTBS gewaschen. Zuerst wurde die Membran mit dem entsprechenden Primärantikörper und anschließend mit einem Sekundärantikörper inkubiert (Tab.2.9.).

Tab.2.9. Verwendete Western Blot Antikörper

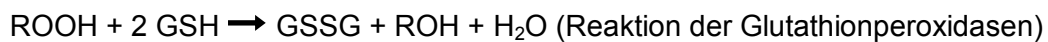
Primärantikörper	Verdünnung in 1xTTBS	Inkubations- temperatur	Inkubationszeit	Hersteller
Kaninchen-anti-Human GPx2	1:5000	4°C	16 h	GBF, Braunschweig; Böcher et al., 1997
Kaninchen-anti-Human GPx1	1:8000	4°C	16 h	abcam, Cambridge, UK
Kaninchen-anti-Human β-Actin	1:5000	RT	2 h	Biozol, Eching, D
Sekundärantikörper				
Ziege-anti-Kaninchen-IgG-POD	1:50000	RT	1 h	Chemicon, Hofheim, D

Gleichmäßiges Überschichten der Membran mit luminolhaltigem Detektionsreagenz (Super-Signal West Dura Extended Duration Substrate, Pierce, USA) diente zur Visualisierung der Immunreaktion mittels Chemilumineszenz (Kamerasystem Fuji LAS3000-CCD). Die Auswertung der Proteinbanden erfolgte mit der Software Aida/2D Densitometry 4.04 (Raytest, Straubenhardt, D).

Zur Normalisierung und als Kontrolle für die Auftragung gleicher Proteinkonzentrationen wurde das Gel nach dem Blotting mit Coomassie-Brilliant-Blue (1 g Coomassie-Brilliant-Blue (Serva, Heidelberg, D), 425 ml Ethanol, 50 ml Methanol, 100 ml Essigsäure (96 %) in 425 ml H₂O) angefärbt und anschließend fixiert (7 % Essigsäure, 10 % Methanol).

2.7. Glutathion-Peroxidase (GPx) Aktivitätsmessung

Die GPx-Aktivität verschiedener Organlysate wurde mit einem Glutathionreduktasegekoppelten Test bestimmt. Folgende Reaktionen finden hierbei statt:



Für die Messung der GPx-Aktivität in einer 96-Loch-Platte (Zellkultur Testplatten 96 F, Technic Plastic Products, Trasadingen, CH) wurden 2,5 µl Probe (Verdünnung 1:10 bei Colon und Ileum, Verdünnung 1:100 bei Leber) vorgelegt und 247,5 µl des Reaktionsmixes (100 mM TRIS/HCl pH 7,6; 5 mM EDTA, 1 mM NaN₃; 3 mM GSH, 0,1 mM NADPH, 0,1 % Triton X-100; 600 mU Glutathionreduktase (Sigma-Aldrich, Steinheim, D)) zugegeben. Nach einer Inkubation für 10 min bei 37°C wurden 10 µl H₂O₂ (finale Konzentration: 50 µM) zum Starten der Reaktion zugegeben. Die Messung des NADPH-Verbrauchs erfolgte über einen Zeitraum von 5 min bei 340 nm am Photometer (Biotek Synergy 2, BioTek, Bad Friedrichshall, D). Mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes ($\epsilon_{[\text{NADPH}]}$: 6,3 mM⁻¹ cm⁻¹) wurde mit dem $\Delta E/\text{min}$ aus der Messung die Enzymaktivität in mU/mg Protein berechnet.

2.8. Bestimmung des Selengehalts

Die Bestimmung des Selengehaltes erfolgte mittels fluorimetrischer Messung [134, 135]. Zunächst erfolgte die Einwaage von 60-80 mg Futter bzw. die Abmessung von 30 µl Plasma und eine anschließende Verdünnung mit 100 µl Wasser. Nach der Zugabe von 500 µl Säuremix (HNO₃/HClO₄, 4:1, v/v) wurden die Proben für 30 min bei 100°C inkubiert. Vor und Nach einer erneuten Inkubation für 30 min bei 120°C fand eine Gasentweichung durch vorsichtiges Öffnen des Deckels statt. Während der anschließenden Inkubation für mindestens 120 min bei 190°C in einem Thermostat VLM 4.0 Heizblock (VLM GmbH, Leopoldshöhe), wird das freigesetzte Selen zu Se (VI) oxidiert. Nach der Abkühlung der

Proben über Nacht auf Raumtemperatur wurden 500 µl HCl (37 %) zugegeben und für 15 min bei 90°C inkubiert. Während der im Anschluss durchgeführten Inkubation für 45 min bei 150°C, wird das freigesetzte Se (VI) zu Se (IV) reduziert. Nach dem Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 2 ml EDTA (2,5 mM, pH 8,0) und 600 µl 2,3-Diaminonaphthalen (DAN; 1mg/ml in 0,1 M HCl) und eine nachfolgende Inkubation für 30 min bei 55°C, bei der eine Komplexbildung zwischen Se und DAN stattfindet. Abschließend erfolgte die Extraktion der Proben mit 3 ml Cyclohexan. Nach der Phasentrennung (ca. 24 h) wurden die Proben fluorimetrisch im AB2 Lumineszenz-spektrometer (SLMAMINCO ®) bei 346 nm Anregung und 520 nm Emission vermessen. Eine Atomabsorptionsspektroskopie-Selen-Standardlösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) mit Konzentrationen zwischen 0 und 450 µg Selen/l diente zur Erstellung einer Standard-geraden, welche zur Quantifizierung der gemessenen Werte verwendet wurde.

2.9. Statistik

Die Statistikberechnung erfolgte mit dem zweiseitigen Student's T-Test beim Vergleich von Mittelwerten, dem Mann-Whitney-Test (U-Test) beim Vergleich von Medianen und dem ein- und zweiseitigem ANOVA-Test beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen unter Verwendung des Programms GraphPad Prism Version 5 (La Jolla, USA), wobei Unterschiede von $p \leq 0,05$ als signifikant angesehen wurden. Die Auswertung der Korrelation von Entzündungsscore und Tumoranzahl sowie die Auswertung der Tumoranzahl bezüglich der Verteilung der Ergebnisse bzw. der Anwendung geeigneter Statistikttests wurde unterstützt von Frau Prof. Hannelore Liero und Herrn Prof. Henning Läuter (Mathematisches Institut, Universität Potsdam).

3. ERGEBNISSE

3.1. Physiologische Funktion der GPx2

3.1.1. Enzymexpression im Colon in Abhängigkeit vom Alter

Jeweils 5 Wildtyp-Tiere im Alter von 0, 1 und 2 Wochen wurden vom Muttertier gesäugt. Die Selenaufnahme erfolgte mit der Muttermilch. Die Nahrungsaufnahme von festem Futter begann mit dem Absetzen der Jungtiere vom Muttertier im Alter von 4 Wochen. Die Tiere im Alter von 4, 6 und 8 Wochen erhielten Haltungsfutter, welches einen Selengehalt von 0,36 ng/mg Futter aufwies. Zunächst erfolgte die Messung des Selengehalts im Leberlysat, um anschließend eine Aussage über den Selenstatus der Tiere treffen zu können. Der Selengehalt der Leber betrug im Alter von einer Woche 17,4 ng/ml und stieg zunächst linear bis ins jugendulter Alter von 6 Wochen um das Dreifache auf 60,6 ng/ml an. Im Alter von 8 Wochen betrug der Selengehalt 60,5 ng/ml, somit wurde kein weiterer altersabhängiger Anstieg verzeichnet (Abb.3.1.A).

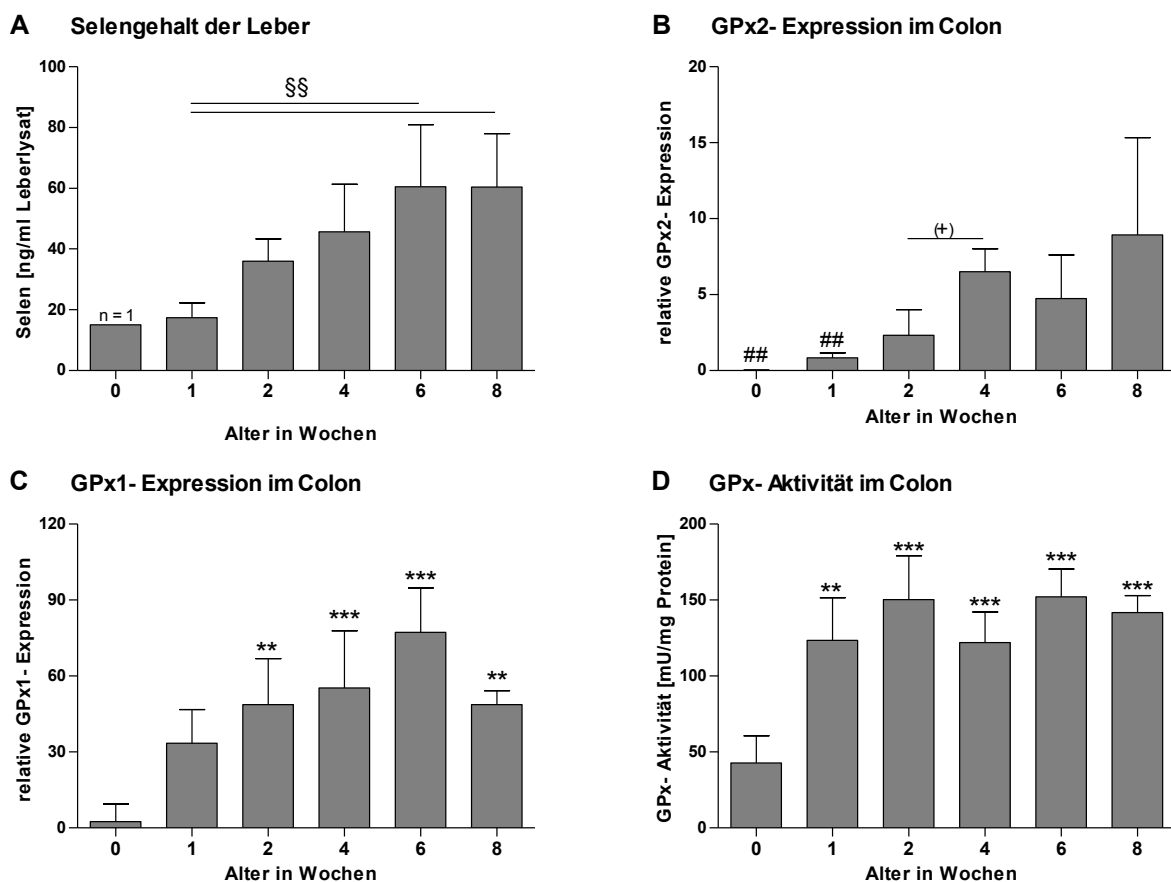


Abb.3.1. **Selenstatus und Enzymexpression von männlichen Wildtyp-Tieren in Abhängigkeit vom Alter** (n = 5). **A** Selengehalt der Leber (für den Zeitpunkt 0 Wochen wurde nur ein Tier vermessen). **B**, **C** GPx2- und GPx1-Proteinexpression im Colon. Analyse mittels Western Blot, Normalisierung auf Coomassie-Färbung des Gels. **D** GPx-Aktivität im Colon in mU/mg Protein. 1way ANOVA ## p<0,01 vs Alter 8 Wochen; ** p<0,01, *** p<0,001 vs Alter 0 Wochen; §§ p<0,01; (+) p<0,05 zweiseitiger Student's T-Test zwischen Alter 2 und 4 Wochen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD.

Die GPx1- und GPx2-Expression im Colonlysate wurde mittels Western Blot analysiert. Der GPx2-Expressionslevel im Zeitraum von postnatal bis zum Absetzen vom Muttertier war sehr niedrig. Zum Zeitpunkt des Absetzens der Jungtiere von der Mutter im Alter von 4 Wochen stieg die GPx2-Expression signifikant um das ca. Dreifache an (Abb. 3.1.B). Im weiteren Altersverlauf blieb der GPx2-Expressionslevel auf relativ gleichem Niveau.

Der GPx1-Expressionslevel war postnatal im Alter von 0 Wochen am niedrigsten. Ab einem Alter von 2 bis 6 Wochen konnte ein signifikanter Anstieg der GPx1-Expression im Colon dokumentiert werden (Abb.3.1.C). Das GPx1-Expressionslevel blieb mit steigendem Alter der Tiere auf relativ gleichem Niveau.

Die Messung der GPx-Aktivität erfolgte im Colonlysate. Die postnatale GPx-Aktivität betrug 42,7 mU/mg Protein und stieg ab dem Alter von einer Woche um das Dreifache auf 123,5 mU/mg Protein an. Im weiteren Altersverlauf konnte kein weiterer Anstieg der GPx-Aktivität verzeichnet werden (Abb.3.1.D).

3.1.2. Charakterisierung des GPx2-Knockout

3.1.2.1. Gewichtsverlauf

Im Alter zwischen 8 und 21 Wochen erfolgte die Gewichtsdocumentation der Wildtyp- und GPx2-Knockout-Tiere. Bei der Auswertung des Gewichtsverlaufs der Tiere, die selenarmes Futter erhielten wurde festgestellt, dass die GPx2-Knockout-Tiere innerhalb dieses Altersverlaufs tendenziell um ca. 1,5 g schwerer waren als die Wildtypen (Abb.3.2.A). Im selenadäquaten Zustand konnte das gleiche Ergebnis dokumentiert werden. Der GPx2-Knockout wies auch hier ein um ca. 1,5 g höheres Gewicht auf als der Wildtyp (Abb.3.2.B). Im selensupplementierten Zustand war der Gewichtsunterschied von 2 g zwischen den GPx2-Knockout-Tieren und Wildtypen signifikant (Abb.3.2.C). Dieser Gewichtsunterschied war schon bei der Dokumentation des Gewichts im Alter von 8 Wochen bei allen drei Selendiäten zu verzeichnen.

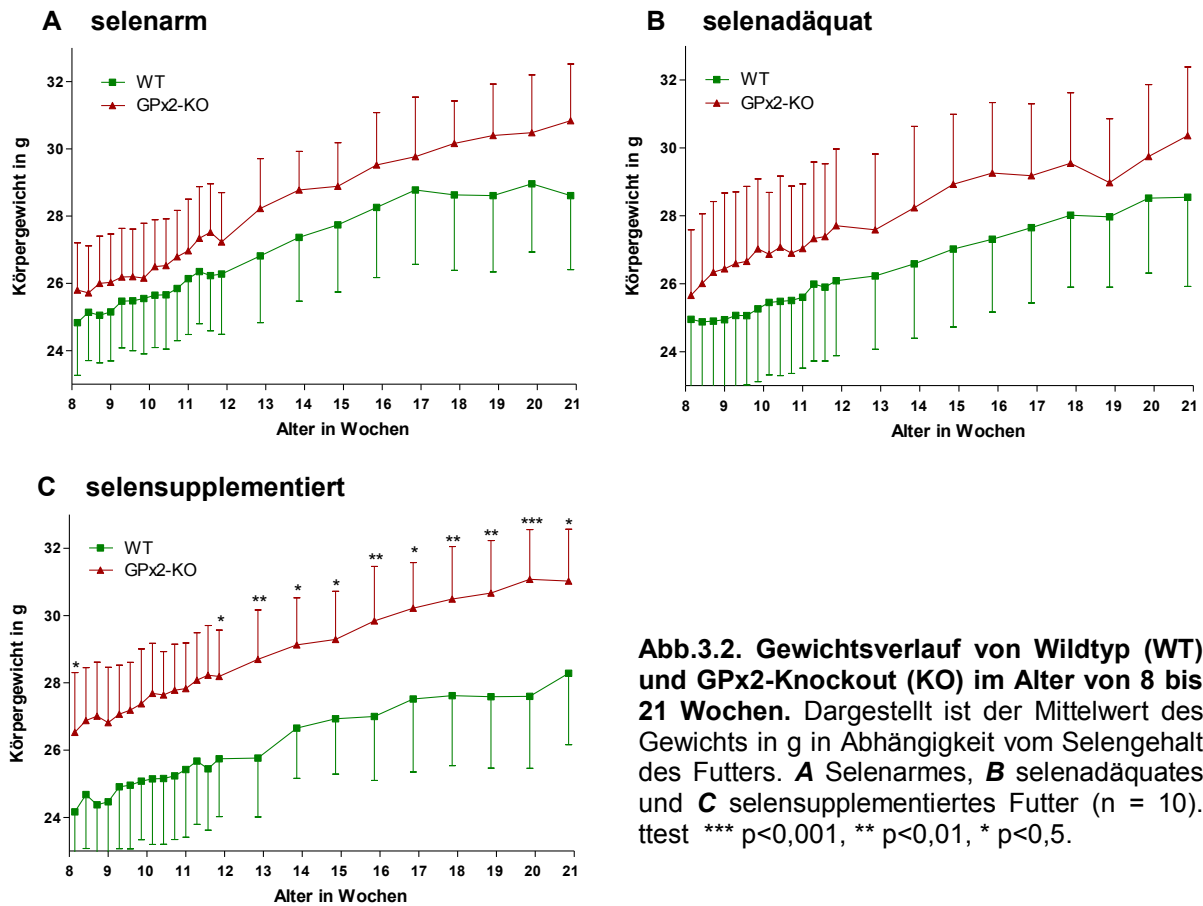


Abb.3.2. Gewichtsverlauf von Wildtyp (WT) und GPx2-Knockout (KO) im Alter von 8 bis 21 Wochen. Dargestellt ist der Mittelwert des Gewichts in g in Abhängigkeit vom Selengehalt des Futters. **A** Selenarmes, **B** selenadäquates und **C** selensupplementiertes Futter (n = 10). ttest *** p<0,001, ** p<0,01, * p<0,5.

3.1.2.2. GPx-Expression im Colon in Abhängigkeit vom Genotyp

3.1.2.2.1. Seleneffekt im Wildtyp

Im Alter von 13 Wochen wurden die GPx-Aktivität und der Proteingehalt an GPx1 und GPx2 in jeweils vier Wildtyp- und GPx2-Knockout Tieren analysiert. Nach dem Absetzen vom Muttertier wurden die Tiere mit selenarmem, -adäquatem und -supplementiertem Futter versorgt. Das selenarme Futter hatte laut eigener Messung einen Selengehalt von 0,08 und wurde demzufolge als marginal Selen-defizient eingestuft. Zunächst erfolgte die Überprüfung des Selenstatus mittels Messung des Plasmaselengehalts. Der Plasmaselengehalt im selenarmen Zustand unterschied sich nicht zwischen den beiden Genotypen, er betrug im Wildtyp 113,3 ng/ml und im GPx2-Knockout 95,6 ng/ml. Durch die Fütterung mit selenadäquatem Futter kam es zu einem signifikanten Anstieg des Plasmaselengehalts um das ca. Vierfache auf 482,1 ng/ml im Wildtyp und auf 351,8 ng/ml im GPx2-Knockout. Die Fütterung von selensupplementiertem Futter führte nur im GPx2-Knockout zu einer weiteren Steigerung des Plasmaselengehalts im Vergleich zum selenadäquaten Futter um den Faktor 1,8 auf 655,1 ng/ml. Im selenadäquaten Zustand war der Plasmaselengehalt im Wildtyp signifikant höher als im GPx2-Knockout (Abb.3.3.).

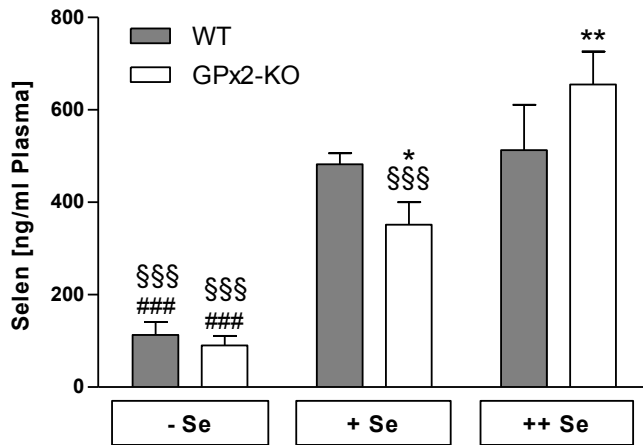


Abb.3.3. Selenstatus im Vergleich zwischen Wildtyp (WT) und GPx2-Knockout (KO). Dargestellt ist der Mittelwert des Plasmaselengehalts in ng/ml von WT und GPx2-KO-Männchen in Abhängigkeit vom Selengehalt des Futters. Selenarmes (-Se), -adäquates (+Se) und -supplementiertes (++Se) Futter (n = 4). 2way ANOVA * p<0,05, ** p<0,01 vs WT der gleichen Gruppe; ### p<0,001 vs +Se des entsprechenden Genotyps; §§§ p<0,001 vs ++Se des entsprechenden Genotyps.

Die Glutathionperoxidase(GPx)-Aktivität ist abhängig vom Selenstatus der Tiere (siehe Einleitung). Im selenarmen Zustand wurde nur eine niedrige GPx-Aktivität in beiden Genotypen gemessen. Im selenadäquaten bzw. -supplementierten Zustand war die GPx-Aktivität im Wildtyp und im GPx2-Knockout signifikant höher als im selenarmen Zustand. Im Vergleich zwischen den beiden Genotypen wurde im selenarmen Zustand eine tendenziell höhere GPx-Aktivität im GPx2-Knockout beobachtet. Bei selenadäquater und -supplementierter Fütterung war die Erhöhung der GPx-Aktivität gegenüber dem Wildtyp signifikant (Abb.3.4.).

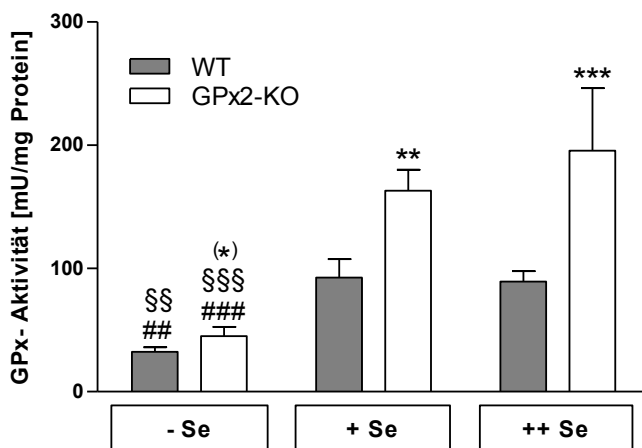


Abb.3.4. GPx-Aktivität im Vergleich zwischen Wildtyp (WT) und GPx2-Knockout (KO). Dargestellt ist der Mittelwert der GPx-Aktivität in mU/mg Protein in Abhängigkeit vom Selengehalt des Futters. Selenarmes (-Se), -adäquates (+Se) und -supplementiertes (++Se) Futter (n = 4). 2way ANOVA ** p<0,01, *** p<0,001 vs WT der gleichen Gruppe; (*) p<0,05 ttest beim Vergleich der -Se Gruppen; ## p<0,01, ### p<0,001 vs +Se des entsprechenden Genotyps; §§ p<0,01, §§§ p<0,001 vs ++Se des entsprechenden Genotyps.

In vier Tieren pro Gruppe wurde die GPx1- und GPx2-Expression entlang des Colons mittels Immunhistochemie an Paraffinschnitten charakterisiert. Nachfolgend werden die Ergebnisse für die Enzymexpression im Wildtyp beschrieben. Zunächst ist exemplarisch die Enzymexpression im distalen Colon dargestellt (Abb.3.5.). Wie erwartet war im selenadäquaten Zustand die GPx2-Expression im Kryptengrund am höchsten und nahm in Richtung Kryptenspitze ab (Abb.3.5.A).

Dagegen war die GPx1-Expression bevorzugt in der Kryptenspitze zu finden und nahm in Richtung Kryptengrund ab (3.5.B).

Im selenarmen Zustand konnte im Kryptengrund eine schwache GPx2-Expression dokumentiert werden (3.5.C). Im Gegensatz dazu war im selenarmen Zustand entlang der gesamten Krypte keine GPx1-Expression detektierbar (Abb. 3.5.D).

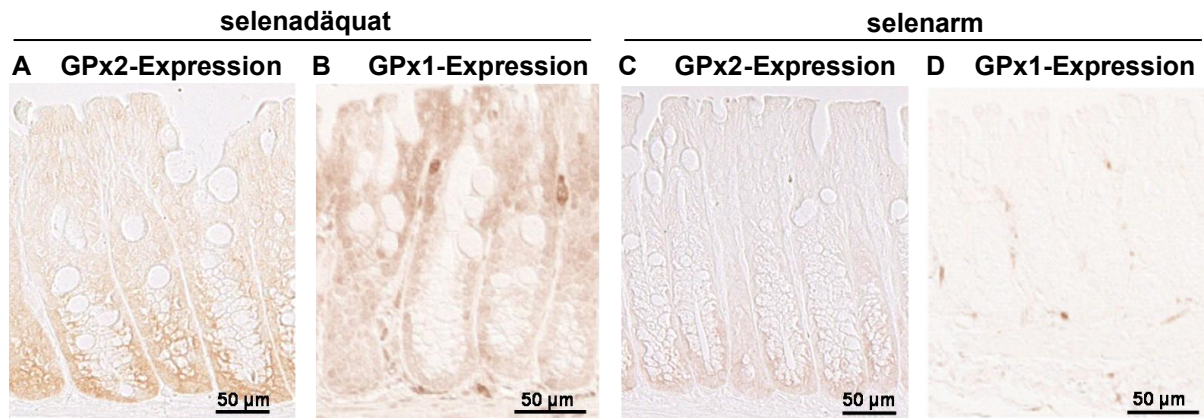


Abb.3.5. Enzymexpression im distalen Colon im Wildtyp in Abhängigkeit vom Selenstatus. **A** GPx2-Expression, **B** GPx1-Expression im selenadäquaten Zustand. **C** GPx2-Expression, **D** GPx1-Expression im selenarmen Zustand. Dargestellt sind exemplarische Paraffin-Schnitte, die mittels Immunhistochemie mit Kaninchen-anti-Human GPx2- bzw. GPx1-Antiserum angefärbt wurden (n = 4).

Die Intensität der GPx2- und GPx1-Antikörperfärbung wurde quantifiziert, indem die Farbintensität der Antikörperfärbung mit Punkten (von 0 = keine Färbung bis 3 = starke Färbung) bewertet wurde. Die Ergebnisse wurden zum besseren Verständnis als Diagramm dargestellt. Es stellte sich heraus, dass entlang des gesamten Colons in allen drei Seliendäten keine GPx2-Expression in der Kryptenspitze detektiert werden konnte (Abb.3.6.A). Auch in der Kryptenmitte wurde keine GPx2 im selenarmen Zustand detektiert. Im Gegensatz dazu war im Kryptengrund eine niedrige GPx2-Expression im selenarmen Zustand vorhanden.

Im selenadäquaten Zustand war in der Kryptenmitte ein tendenzieller Anstieg der GPx2 im transversen und ein signifikanter Anstieg im distalen Colon im Vergleich zum selenarmen Zustand zu verzeichnen. Zusätzlich wurde im Kryptengrund im transversen und distalen Colon ein signifikanter Anstieg der GPx2-Expression im Vergleich zum selenarmen Zustand beobachtet.

Ausschließlich im selensupplementierten Zustand war der Anstieg der GPx2-Expression in der Kryptenmitte im transversen und distalen Colon und im Kryptengrund entlang des gesamten Colons signifikant im Vergleich zum selenarmen Zustand. Der GPx2-Gehalt war im selenadäquaten und im selensupplementierten Zustand annähernd gleich (Abb.3.6.A).

Im selenarmen Zustand war in keinem Teil des Colons GPx1 nachzuweisen. Im selenadäquaten Zustand kam es in der Kryptenspitze zu einem signifikanten Anstieg der GPx1-Expression im proximalen, transversen und distalen Colon, in der Kryptenmitte ausschließlich im transversen und distalen Colon. Im Kryptengrund war keine GPx1 nachweisbar. Im selensupplementierten Zustand wurde eine signifikante Steigerung der GPx1-Expression sowohl in der Kryptenspitze als auch in der Kryptenmitte entlang des gesamten Colons im Vergleich zum selenadäquaten Zustand verzeichnet. Des Weiteren kam es im selensupplementierten Zustand auch zu einem Anstieg des GPx1-Expressionslevels im Kryptengrund. Dieser Anstieg war ausschließlich im distalen Colon signifikant gegenüber dem selenarmen bzw. selenadäquaten Zustand (Abb.3.6.B).

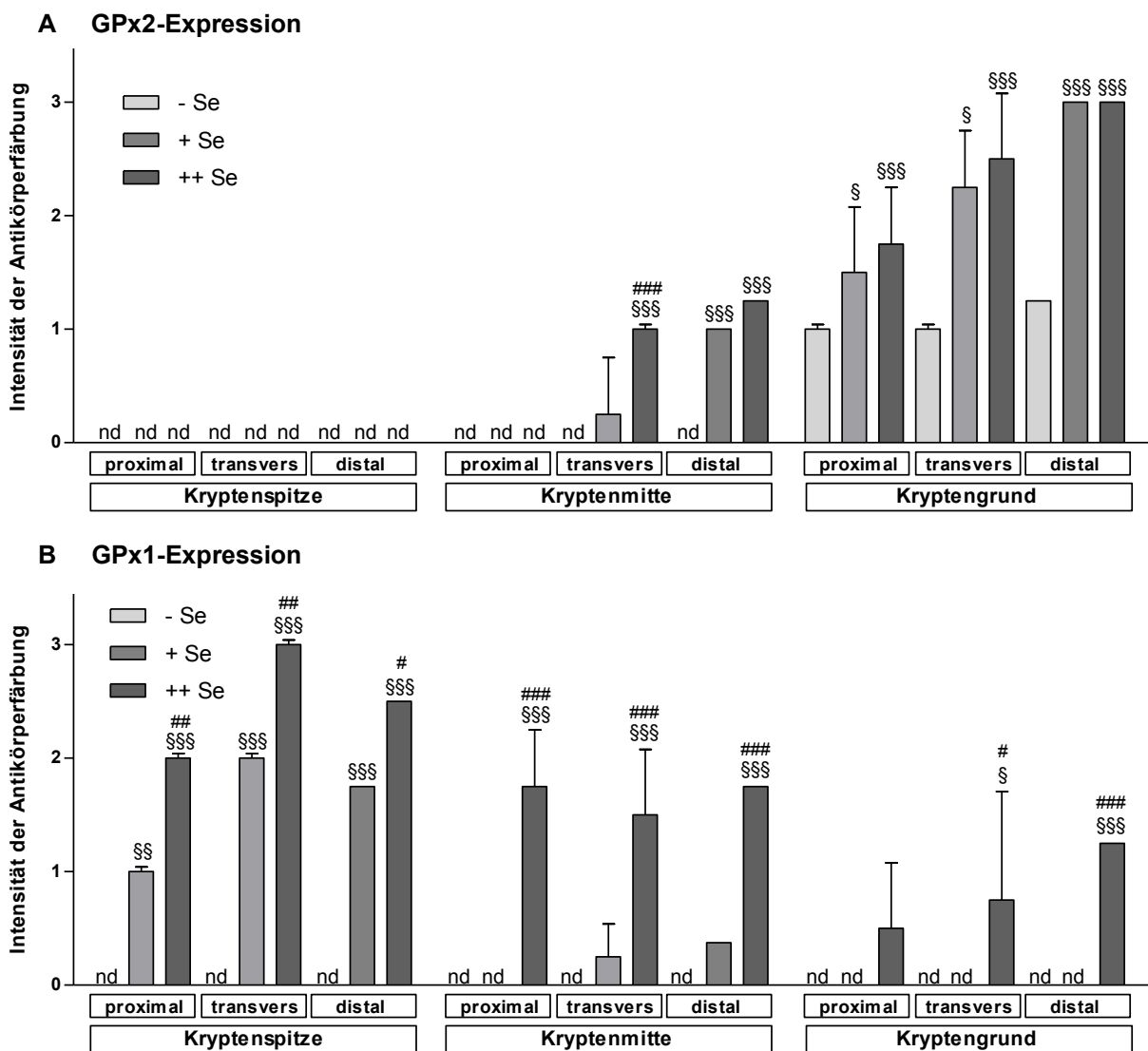


Abb.3.6. GPx2- und GPx1-Proteinexpression entlang des Colons im Wildtyp in Abhängigkeit vom Selenstatus. Dargestellt ist die Auswertung der Intensität der GPx2- (A) und GPx1- (B) Antikörper-Färbung der Immunhistochemie (Mittelwert ± SD) im selenarmem (weiß), -adäquatem (hellgrau) und -supplementiertem (dunkelgrau) Zustand (n = 4). Die Antikörperfärbung wurde bewertet, indem Punkte vergeben wurden (0 Punkte = keine Färbung bis 3 Punkte = starke Färbung). 2way ANOVA § p<0,05, §§ p<0,01, §§§ p<0,001 vs -Se der gleichen Gruppe; # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001 vs ++Se der gleichen Gruppe. nd = nicht detektierbar

3.1.2.2. Effekt des Genotyps

Nachfolgend wird die Auswertung der GPx1-Expression im distalen Colon im Vergleich zwischen Wildtyp und GPx2-Knockout beschrieben. Die Analyse der Immunhistochemie zeigte, dass im GPx2-Knockout der GPx1-Expressionslevel sowohl im selenadäquaten als auch im selenarmen Zustand im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht war (Abb. 3.7. und 3.8.). Wie beschrieben war im selenarmen Zustand GPx1 im Wildtyp nicht exprimiert. Hingegen war im GPx2-Knockout eine deutliche GPx1-Expression sichtbar, welche überraschenderweise im Kryptengrund lokalisiert war (Abb.3.7.B).

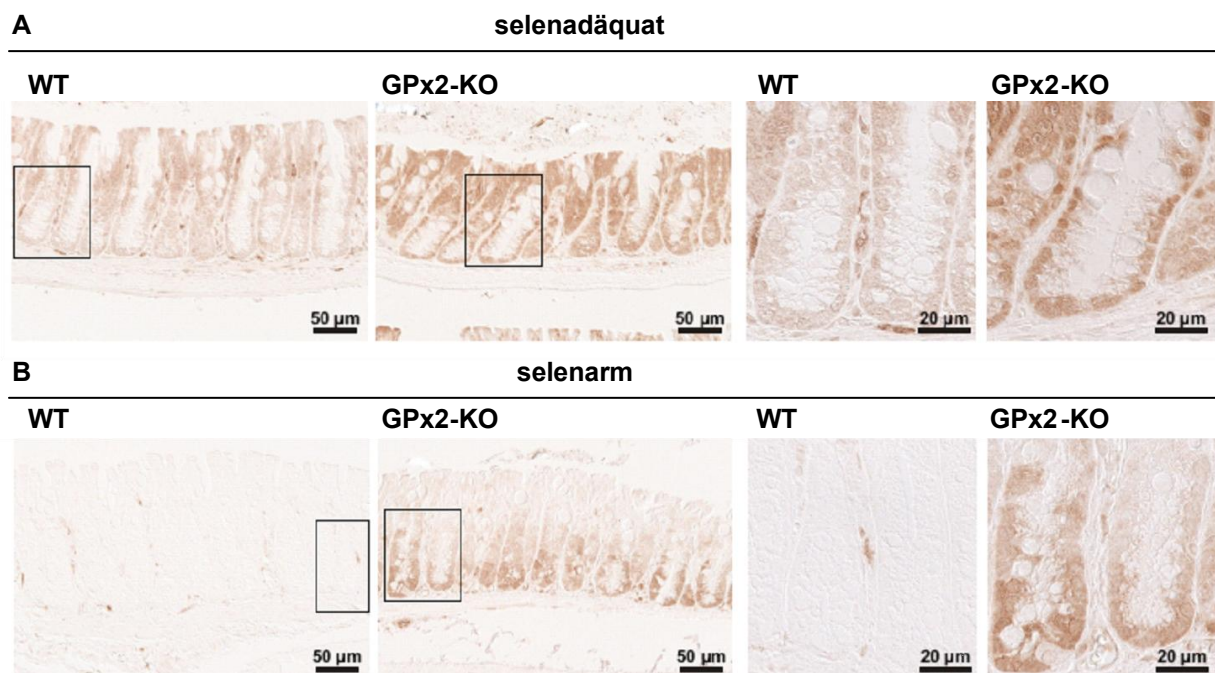


Abb.3.7. GPx1-Expression im Wildtyp (WT) und GPx2-Knockout (KO) im distalen Colon in Abhängigkeit vom Selenstatus. Dargestellt ist exemplarisch die Antikörperfärbung der GPx1-Expression im selenadäquaten (**A**) und selenarmen (**B**) Zustand im Wildtyp und GPx2-KO (n = 4). Immunhistochemie mit Kaninchen-anti-Human GPx1-Antiserum.

Nachfolgend sind die Ergebnisse für die Auswertung der Intensität der GPx1-Antikörperfärbung im Wildtyp und im GPx2-Knockout aus Abbildung 3.7. aufgeführt.

Es wurde kein Unterschied der GPx1-Expression zwischen Wildtyp und GPx2-Knockout in der Kryptenspitze dokumentiert. Allerdings wurde im GPx2-Knockout ein signifikanter Anstieg der GPx1-Expression auf selenadäquatem bzw. -supplementiertem Futter in der Kryptenmitte verzeichnet (Abb.3.8.). Im Kryptengrund wurde bei allen drei Selenitäten ein signifikanter Anstieg der GPx1-Expression im GPx2-Knockout detektiert.

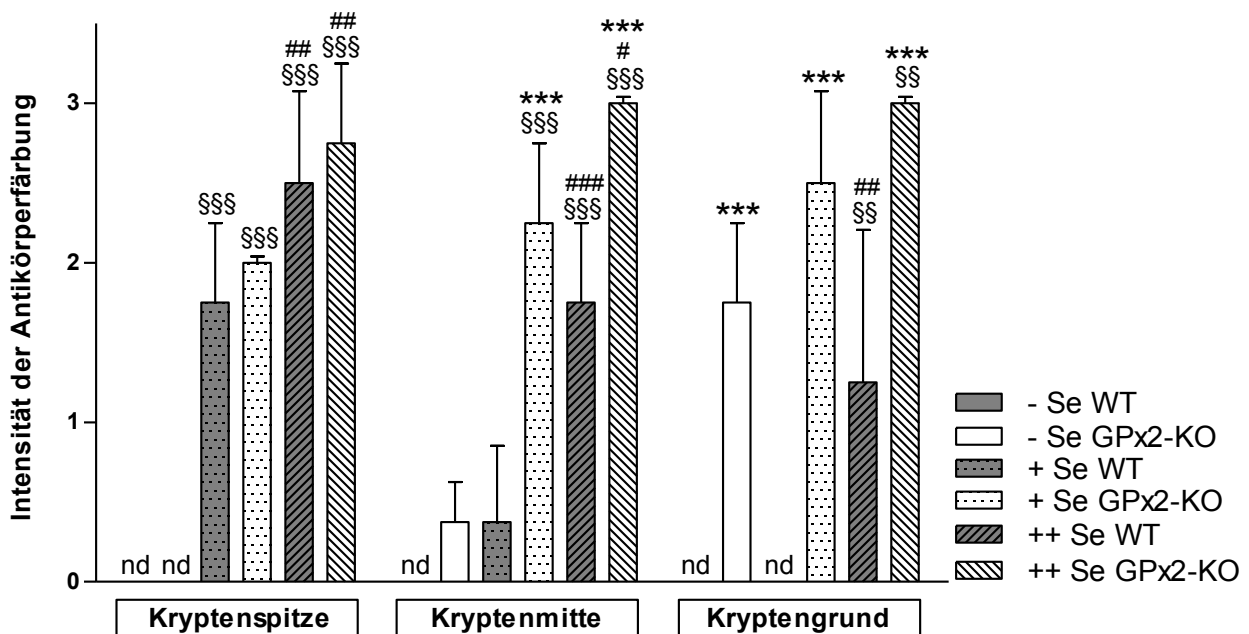


Abb.3.8. Auswertung der GPx1-Expression im Wildtyp und GPx2-Knockout (KO) im distalen Colon in Abhängigkeit vom Selenstaus. Dargestellt ist die Auswertung der Intensität der GPx1-Antikörperfärbung im selenarmen (ohne Muster), -adäquaten (gepunktet) und - supplementiertem (gestreift) Zustand im Wildtyp (grau) und im GPx2-KO (weiß) (n = 4). Die Antikörperfärbung wurde bewertet, indem Punkte vergeben wurden (0 Punkte = keine Färbung bis 3 Punkte = starke Färbung). Immunhistochemie mit Kaninchen-anti-Human GPx1 Antiserum. 2way ANOVA, §§ p<0,01, §§§ p<0,001 vs -Se der gleichen Gruppe; ## p<0,01, ### p<0,001 vs + Se der gleichen Gruppe; *** p < 0,001 vs WT. nd = nicht detektierbar

3.1.2.3. Morphologische Charakterisierung des Colons

Für die Untersuchung hinsichtlich morphologischer Unterschiede im Colon zwischen Wildtyp und GPx2-Knockout wurden bei 10 Tieren pro Gruppe Mitosen und Apoptosen in 200-300 longitudinal angeschnittenen Krypten gezählt. Die Auswertung erfolgte im distalen Colon, im Abstand von 1,5 cm zum Anus. Die Krypte wurde gedanklich in vier gleich große Abschnitte eingeteilt, wobei der erste Abschnitt der Kryptenspitze und der vierte Abschnitt dem Kryptengrund entsprach. Bei der histologischen Färbung der Colonschnitte zeigte sich, dass in den GPx2-Knockout Tieren auf selenarmem Futter annähernd in jeder Krypte mehrere Apoptosen im Kryptengrund detektiert werden konnten (Abb.3.9.A). Weiterhin wurden vermehrt Mitosen im 2. und 3. Kryptviertel verzeichnet (Abb. 3.9.B und C). Für die Darstellung (Abb. 3.11. und 3.12.) wurde die jeweilige Mitosen- bzw. Apoptoseanzahl pro 100 Krypten berechnet.

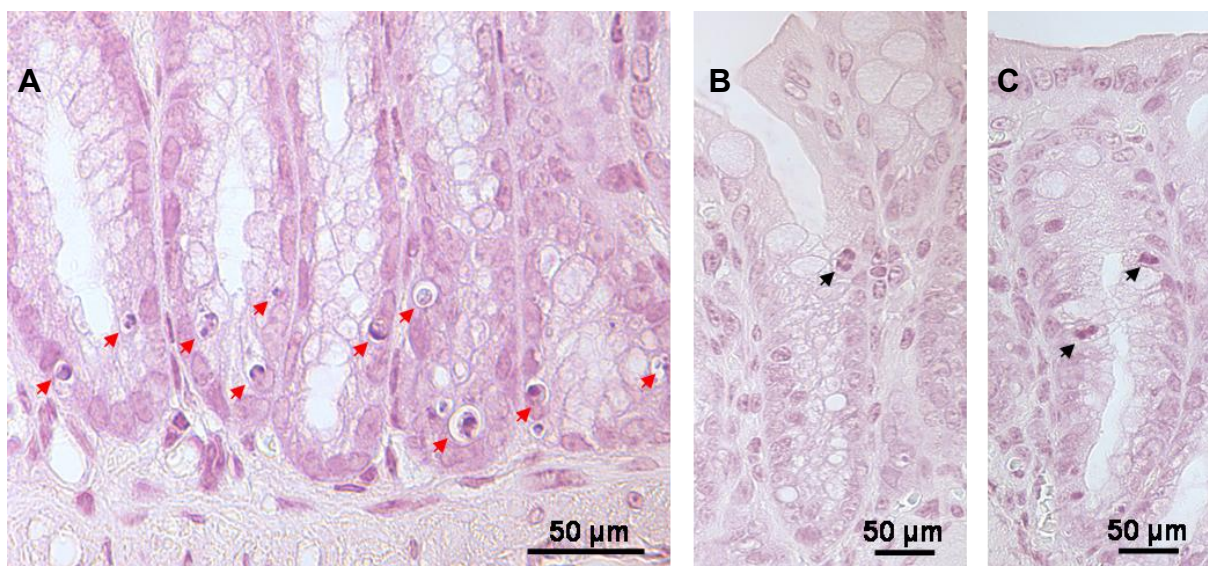


Abb.3.9. Repräsentative histologische Färbung des Colons zur Darstellung von Apoptosen und Mitosen. Im Abstand von 1,5 cm zum Anus wurde ein Colonstück herauspräpariert und in Paraffin eingebettet. Es wurden 2 µm dicke Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. **A** Im GPx2-Knockout (KO) auf selenarmem Futter waren in annähernd jeder Krypte Apoptosen im 4. Kryptviertel vorzufinden (rote Pfeile). **B, C** Im 2. Kryptviertel traten im selenarmem Zustand im GPx2-KO vermehrt Mitosen auf (schwarze Pfeile). Objektiv 60 x, Mikroskop Zeiss Axio Observer D1.

Die Ergebnisse der Quantifizierung der Apoptosen und Mitosen wird nachfolgend beschrieben. Im 1. und im 2. Kryptviertel (Kryptenspitze) gab es keinen Unterschied in der Anzahl der Apoptosen weder zwischen Wildtyp und GPx2-Knockout noch zwischen den drei Seliendäten. Im 3. Kryptviertel war die Apoptoseanzahl im GPx2-Knockout auf selenarmem Futter mit 14 Apoptosen pro 100 Krypten signifikant erhöht im Vergleich zum Wildtyp und zu den GPx2-Knockout Tieren auf selen-adäquatem bzw. -supplementiertem Futter. Im 4. Kryptviertel konnte bei allen drei Seliendäten im GPx2-Knockout eine signifikante Erhöhung der Apoptoseanzahl im Vergleich zum Wildtyp dokumentiert werden. In diesem Kryptviertel war die höchste Anzahl an Apoptosen in GPx2-Knockout Tieren auf selenarmem Futter mit

60 Apoptosen pro 100 Krypten vorzufinden. Mit steigendem Selengehalt des Futters kam es zu einer signifikanten Abnahme der Apoptoseanzahl im selenadäquaten und im selensupplementierten Zustand auf jeweils 15 Apoptosen pro 100 Krypten. Im selenarmen Zustand schwankte die Apoptoseanzahl pro Tier innerhalb der GPx2-Knockout Tiere stark. Mit steigendem Selengehalt des Futters wurde die Anzahl der Apoptosen pro Tier innerhalb der Gruppen homogener.

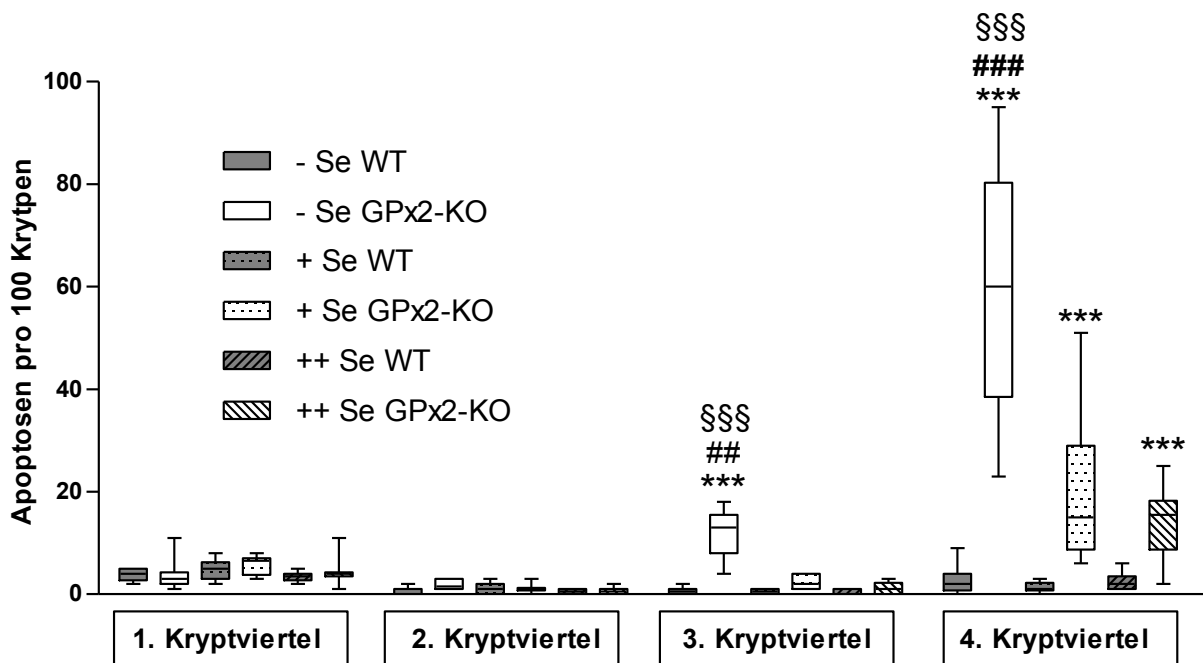


Abb.3.10. Quantifizierung von Apoptosen im Colon. Dargestellt ist die Anzahl der Apoptosen pro 100 Krypten in jeweils 10 Tieren pro Gruppe als Boxplot mit Median und Whiskern vom Minimum zum Maximum. Der Wildtyp ist grau und der GPx2-Knockout (KO) ist weiß unterlegt (ohne Muster = selenarm, gepunktet = selenadäquat und gestreift = selensupplementiert). 2way ANOVA ***p<0,001 vs WT; ### p<0,001 vs +Se; \$\$\$ p<0,001 vs ++Se

Im 4. Kryptviertel wurden im Wildtyp und im GPx2-Knockout annähernd gleich viele Mitosen verifiziert. Es gab keine signifikanten Unterschiede, da die Werte pro Tier innerhalb der Gruppen stark schwankten (Abb.3.11.). Sowohl der Selengehalt des Futters als auch der Genotyp hatten demnach keinen Einfluss auf die Mitoseanzahl in diesem Kryptviertel. Im Vergleich zum 4. Kryptviertel sank die Mitoseanzahl im 3. Kryptviertel im Wildtyp in allen 3 Selendiäten und im GPx2-Knockout im selenadäquaten bzw. -supplementierten Zustand. Im selenarmen Zustand kam es im GPx2-Knockout zu einem signifikanten Anstieg der Mitoseanzahl im 3. Kryptviertel auf 7,0 Mitosen pro 100 Krypten und im 2. Kryptviertel auf 2,3 Mitosen pro 100 Krypten im Vergleich zum Wildtyp und zum GPx2-Knockout im selenadäquaten bzw. selensupplementierten Zustand. Innerhalb dieser zwei Gruppen wurde eine starke Schwankung der Mitoseanzahl pro Gruppe beobachtet. In den übrigen Gruppen wurden kaum Mitosen im 2. Kryptviertel dokumentiert. Im 1. Kryptviertel wurde in keiner der Gruppen Mitosen verifiziert.

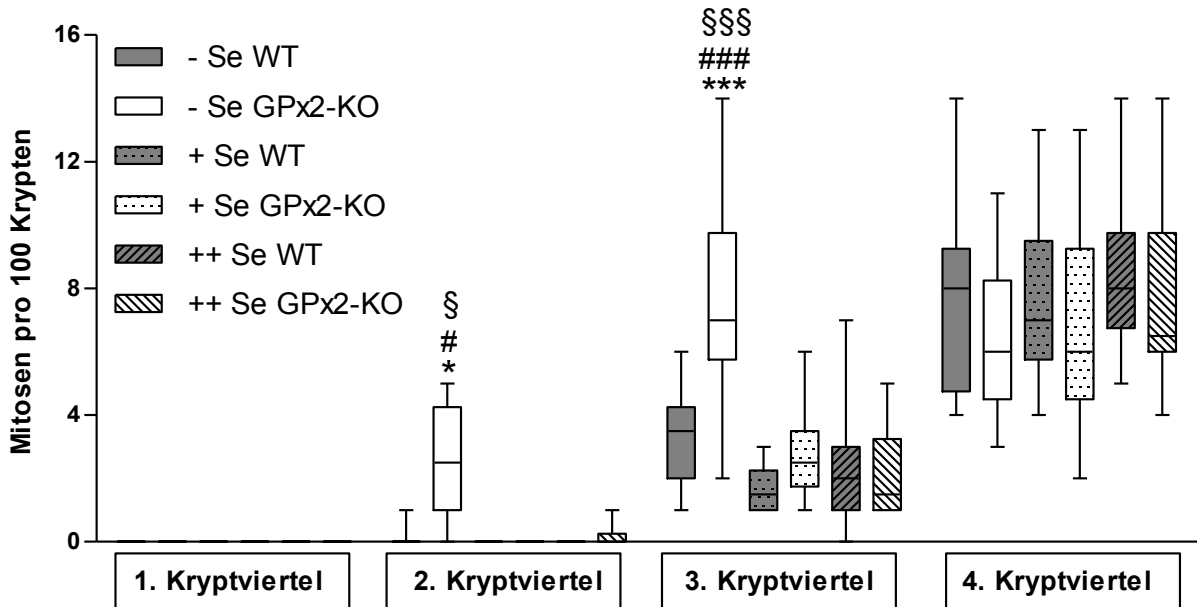


Abb.3.11. Quantifizierung von Mitosen im Colon. Dargestellt ist die Anzahl der Mitosen pro 100 Krypten in jeweils 10 Tieren pro Gruppe als Boxplot mit Median und Whiskern vom Minimum zum Maximum. Der Wildtyp ist grau und der GPx2-Knockout (KO) ist weiß unterlegt (ohne Muster = selenarm, gepunktet = selenadäquat und gestreift = selen-supplementiert). 2way ANOVA * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs WT; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ vs +Se; § $p < 0,05$, §§§ $p < 0,001$ vs ++Se.

Um zu analysieren, ob es zu einer morphologischen Veränderung der Krypten kam, wurde exemplarisch von 50 Krypten pro Tier die Länge ermittelt. Im selen-supplementierten Zustand wurde kein Unterschied in der Kryptenlänge zwischen GPx2-Knockout und Wildtyp gefunden. Die Krypten im GPx2-Knockout hatten eine durchschnittliche Länge von 159,1 μm und die Krypten im Wildtyp wiesen eine Länge von 150,7 μm auf. Auch im selenadäquaten Zustand gab es keinen Unterschied in der Kryptenlänge im Vergleich zwischen Wildtyp und GPx2-Knockout. Die Kryptenlängen glichen annähernd denen im selen-supplementierten Zustand. Im selenarmen Zustand wurde im GPx2-Knockout eine signifikante Verlängerung der Krypten um 18 % (27 μm) gegenüber dem Wildtyp verzeichnet. Des Weiteren war diese Verlängerung auch signifikant gegenüber der Kryptenlänge im GPx2-Knockout auf selenadäquatem und -supplementiertem Futter.

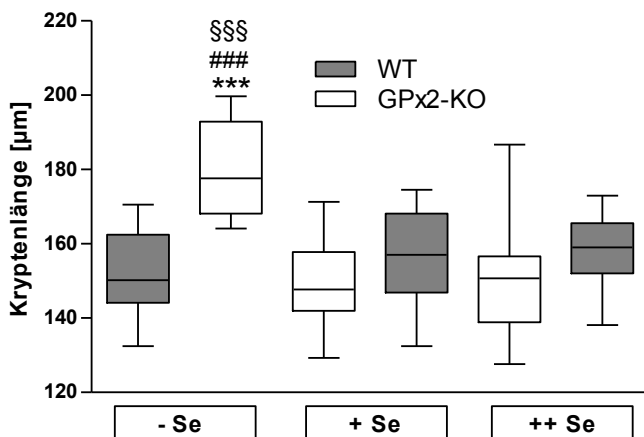


Abb.3.12. Messung der Länge von Colonkrypten im Wildtyp (WT) und GPx2-Knockout (KO). Dargestellt ist die Kryptenlänge von 50 Colonkrypten in jeweils 10 Tieren pro Gruppe als Boxplot mit Median und Whiskern vom Minimum zum Maximum. Der Wildtyp ist grau und der GPx2-Knockout ist weiß unterlegt. 2way ANOVA *** $p < 0,001$ vs WT; ### $p < 0,001$ vs +Se; §§§ $p < 0,001$ vs ++Se.

3.2. Einfluss von GPx2 auf die entzündungsassoziierte Colonkarzinogenese

3.2.1. Entzündungsstatus des Colons

Während der akuten Entzündungsphase eine Woche nach der DSS-Applikation wurde in vier Tieren pro Gruppe der Entzündungsstatus des Colons analysiert. Für die Auswertung wurden neben histologischen Veränderungen auch klinische Daten (z.B. Gewichtsverlust) und makroskopische Veränderungen des Colons (z.B. Schwellung) bewertet und als Entzündungsscore für jedes Tier zusammengefasst (für nähere Informationen siehe Tab.2.4.). In den Kontrollgruppen, welche Saline und Trinkwasser anstatt der AOM/DSS-Applikation erhalten hatten, wurden keine histologischen Veränderungen des Colons festgestellt (Abb. 3.13.A). In den behandelten Gruppen wurden histologische Veränderungen wie z.B. schwache und mäßige Entzündung bzw. schwere Ulcerationen dokumentiert (Abb.3.13. B, C, D).

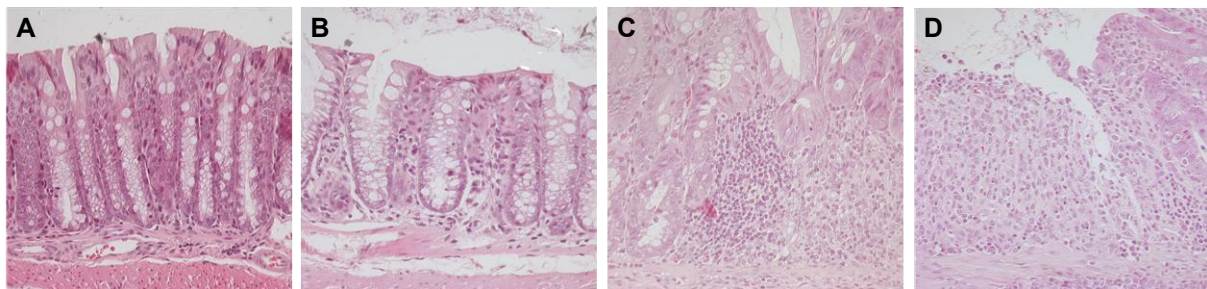


Abb.3.13. Histologische Charakterisierung der Entzündung im Colon. Dargestellt sind normale Krypten (A), schwache Inflammation mit Infiltration zwischen den Krypten (B), mäßige Entzündung mit Verlust der Kryptenarchitektur bzw. mäßigem Mukosaverlust (C) und schwere Ulceration mit einem kompletten Verlust der Mukosa (D).

Die AOM/DSS-Applikation führte in allen behandelten Tieren zu einer Entzündung. Sowohl im selenadäquaten als auch im selenarmen Zustand war die Entzündung im GPx2-Knockout im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht. Der Grad der Entzündung schwankte in allen drei Selendiäten stark innerhalb der GPx2-Knockout Gruppen (Abb.3.14.). Im Wildtyp war die Entzündung homogener innerhalb der jeweiligen Gruppe verteilt. Es gab nur wenige Ausreißer, z.B. ein WildtypTier mit schwacher Entzündung (2 Punkte) auf selenarmem Futter. Es wurde eine signifikante Verringerung der Entzündungsstatus durch Selensupplementation im GPx2-Knockout im Vergleich zum selenarmen Futter dokumentiert werden. Im Wildtyp war die Entzündung im selenarmen Zustand am größten. Im selenadäquaten Zustand kam es zu einer tendenziellen Abmilderung der Entzündung. Die weitere Supplementation von Selen führte zu einer signifikanten Verringerung (U-Test) im Vergleich zum selenarmen Zustand.

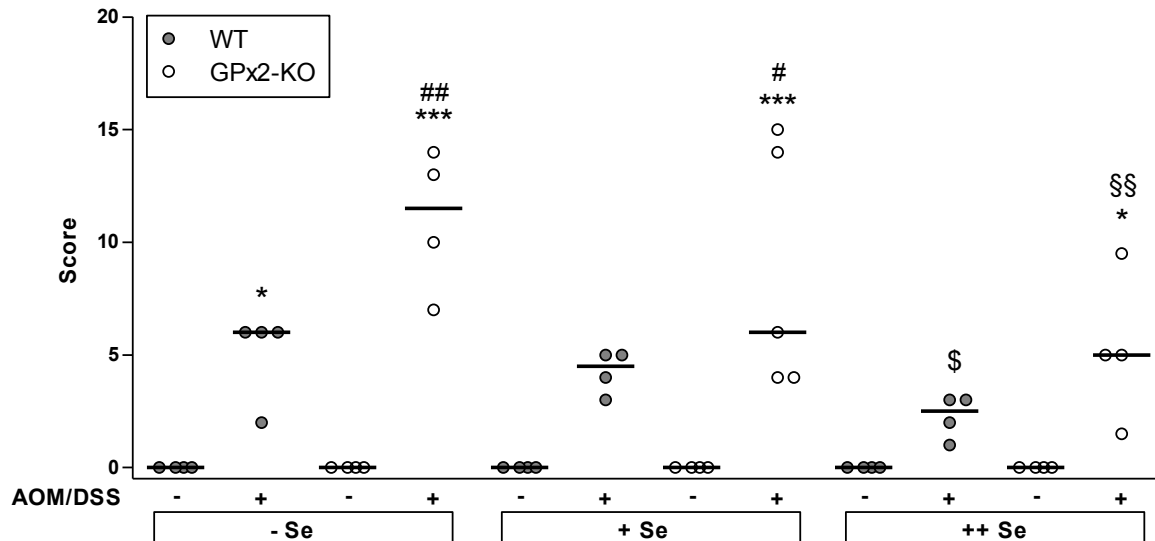


Abb.3.14. Entzündungsscore des Colons. Dargestellt ist der Inflammationsscore in der akuten Entzündungsphase vom WT (grau) und GPx2-Knockout (KO) (weiß) in Abhängigkeit vom Selenstatus (n = 4; Median ± SD; GPx2-KO, +Se, +AOM/DSS n = 5). 2way ANOVA * p<0,01, *** p<0,001 vs Kontrolle; # p<0,05, ## p<0,01 vs WT; \$\$\$ p<0,001 vs -Se; U-Test \$ p<0,05 vs -Se WT.

3.2.2. Kanzerogenese im Colon

12 Wochen nach der AOM-Applikation erfolgte die Tötung von 10 Tieren pro Gruppe. Die Entstehung von Tumoren und aberranten Krypt Foci (ACF) wurde am aufgespannten, methylenblaugefärbten Colon ausgewertet (Siehe Material und Methoden 2.3.2.). Ein ACF kann aus mehreren Krypten pro Focus bestehen, z.B. 2 Krypten pro Focus (Abb.3.15.A). Solide Tumoren wurden sowohl im transversen (Abb.3.15.B) als auch im distalen Colon (Abb.3.15.C) detektiert. Nach Möglichkeit wurde jeder einzelne Tumor herauspräpariert und in Paraffin eingebettet, um nach einer anschließenden Hämatoxilin/Eosin-Färbung zu analysieren ob es sich um ein Adenom oder ein Adenokarzinom handelt (Abb.3.15.D). Die Auswertung ergab, dass kein herauspräparierter Tumor als Adenokarzinom klassifiziert werden konnte.

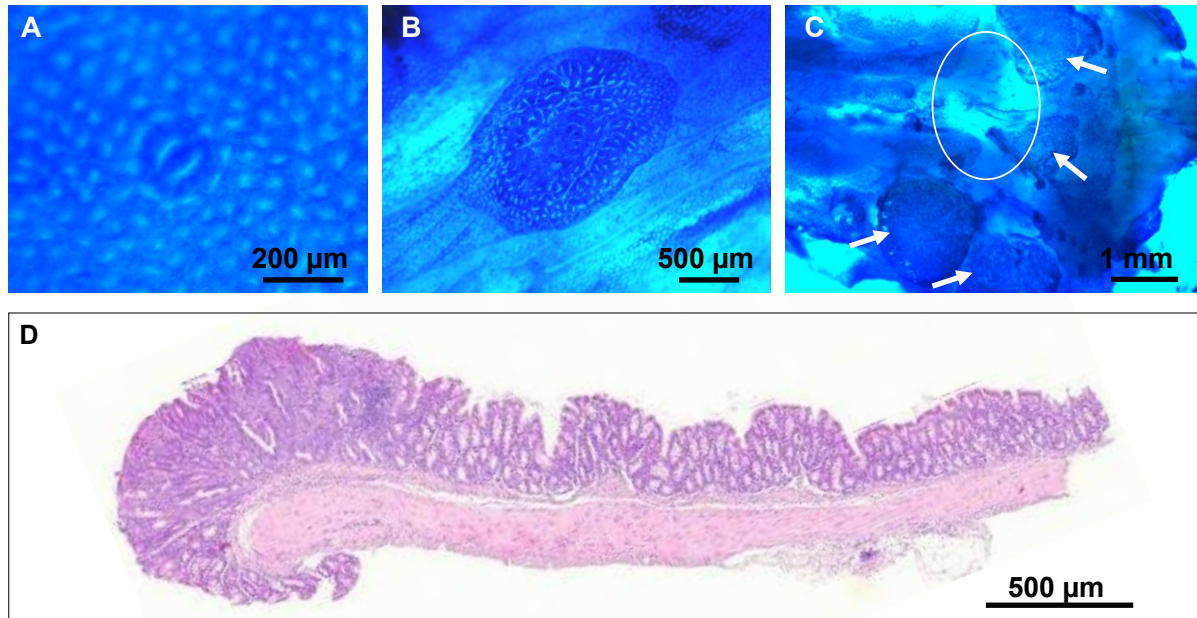


Abb.3.15. Exemplarische Darstellung von ACFs und Adenomen. **A** Aberranter Krypt Foci (ACF) mit 2 Krypten pro Focus in methylenblaugefärbter Mukosa. **B** Adenom im transversen Colon (Hämatoxilin/Eosin gefärbter Paraffinschnitt). **C** 4 Adenome (weiße Pfeile) und vernarbtes Gewebe (weiß umrandet) im distalen Colon in methylenblaugefärbter Mucosa. **D** Adenom in Hämatoxilin/Eosin gefärbtem Paraffinschnitt.

Annähernd alle Tiere innerhalb der jeweiligen behandelten Gruppe wiesen ACF auf. Die ACF-Inzidenz unterschied sich weder zwischen den beiden Genotypen noch zwischen den drei verschiedenen Selendiäten (Tab.3.1). Die ACF-Anzahl pro Tier ergab keinen Unterschied zwischen Wildtyp und GPx2-Knockout bzw. zwischen den drei Selendiäten. Die hohe Standardabweichung zeigt, dass die ACF-Anzahl innerhalb der Gruppe stark schwankte. Im selenarmem bzw. -supplementiertem Futter hatten jeweils 70 % der GPx2-Knockout Tiere und 50 % der Wildtypiere Tumore. Im selenadäquaten Zustand entwickelten 40 % der analysierten Tiere beider Genotypen Tumore. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Tumorzinzidenz auf selenadäquatem Futter im Vergleich zum selenarmen Futter verringert. Eine weitere Selensupplementation führte jedoch in beiden Genotypen zu einem Anstieg der Tumorzinzidenz auf das Niveau im selenarmen Zustand.

Tab.3.1. Auswertung ACF-Inzidenz und -Anzahl, Tumorzinzidenz

Futter	Genotyp	ACF-Inzidenz	ACF-Anzahl	Tumorzinzidenz
- Se	WT	9 (10)	4 ± 1.6	5 (10)
- Se	GPx2 KO	7 (10)	3 ± 3.8	7 (10)
+ Se	WT	10 (10)	4 ± 2.3	4 (10)
+ Se	GPx2 KO	8 (10)	3.5 ± 1.7	4 (10)
++ Se	WT	9 (10)	3 ± 1.8	5 (10)
++ Se	GPx2 KO	8 (10)	3 ± 1.7	7 (10)

ACF-Anzahl als Median ± SD

Die Auswertung der Anzahl der ACF bezogen auf die Anzahl der Krypten pro Focus ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und GPx2-Knockout (Abb.3.16.). Des Weiteren wurde zwischen den drei Selendiäten kein Unterschied in der Anzahl der Krypten pro Focus festgestellt. Die Werte wiesen eine große Streuung innerhalb der jeweiligen Gruppe auf. Der Großteil der ACF hatte eine, zwei und drei Krypten pro Focus. In einigen Gruppen wurden ACF mit mehr als vier Krypten pro Focus dokumentiert. Im selenarmen Zustand im GPx2-Knockout und im selenadäquaten Zustand im Wildtyp wurden einzelne ACF mit acht bis zehn Krypten pro Focus beobachtet.

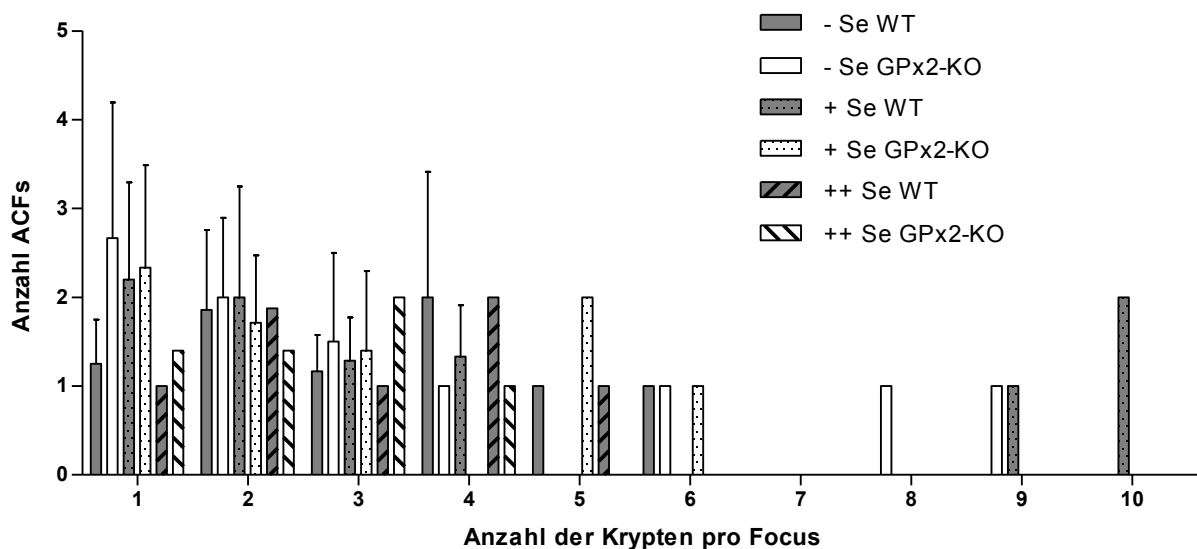


Abb.3.16. ACF-Anzahl mit Anzahl der Krypten pro Focus im Wildtyp und GPx2-Knockout. Dargestellt ist der Mittelwert der ACF-Anzahl in Bezug auf die Anzahl der Krypten pro Focus. Der Wildtyp (WT) ist grau und der GPx2-Knockout (KO) ist weiß unterlegt (ohne Muster = selenarm, gepunktet = selenadäquat und gestreift = selensupplementiert).

Die Auswertung der Tumoranzahl pro Tier war im GPx2-Knockout auf selenarmem bzw. -adäquatem Futter tendenziell höher als im Wildtyp (Abb.3.17.). Im selenarmen Zustand wurden in den GPx2-KnockoutTieren doppelt so viele Tumore pro Tier dokumentiert wie im Wildtyp. Die Schwankung der Tumoranzahl pro Tier im GPx2-Knockout war im selenarmen Zustand sehr hoch. Des Weiteren kam es im selenadäquaten Zustand im GPx2-Knockout zu einer annähernden Verdreifachung der Tumoranzahl im Vergleich zum Wildtyp. Im selensupplementierten Zustand gab es keinen Unterschied in der Tumoranzahl zwischen den beiden Genotypen. Die Daten zeigen, dass der selenadäquate Zustand nicht zu einer Verringerung der Tumoranzahl im Vergleich zum selenarmen Zustand in den beiden Genotypen geführt hat. Im GPx2-Knockout führte die Selensupplementation zu einer signifikanten Verringerung der Tumoranzahl pro Tier im Vergleich zum selenarmen bzw. -adäquaten Zustand. Im Wildtyp führte die Supplementation nicht zu einer geringeren Tumoranzahl, jedoch war die Verteilung innerhalb der Gruppe homogener.

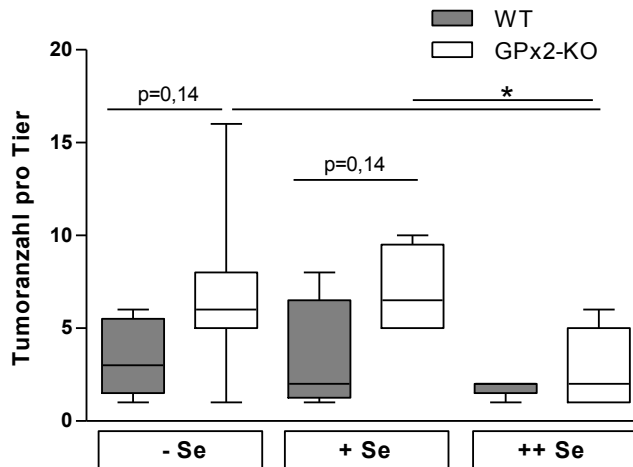


Abb.3.17. Tumoranzahl im Colon im Wildtyp (WT) und GPx2-Knockout (KO). Dargestellt ist die Tumoranzahl pro Tier im Colon im WT (grau) und im GPx2-Knockout (weiß) in Abhängigkeit vom Selenstatus (Boxplot mit Median und Whiskern vom Minimum zum Maximum). U-Test * $p < 0,05$.

In den 10 Tieren pro Gruppe, in denen die Tumor- und ACF-Entstehung ausgewertet wurde, fand ab dem Zeitpunkt der DSS-Applikation die Dokumentation klinischer Daten (Diarrhö, Gewichtsverlust, okkultes Blut) statt. Bei der Tötung wurde dokumentiert, ob makroskopische Veränderungen des Colons vorzufinden waren. Somit konnte für diese Tiere ein Entzündungsscore bestehend aus der Auswertung der klinischen Daten bzw. makroskopische Veränderungen erstellt werden. Zwischen dem Grad der Entzündung und der Anzahl der Tumore bestand ein linearer Zusammenhang (Abb.3.18.). Demnach verursacht eine starke Entzündung tendenziell mehr Colontumore als eine schwache Entzündung.

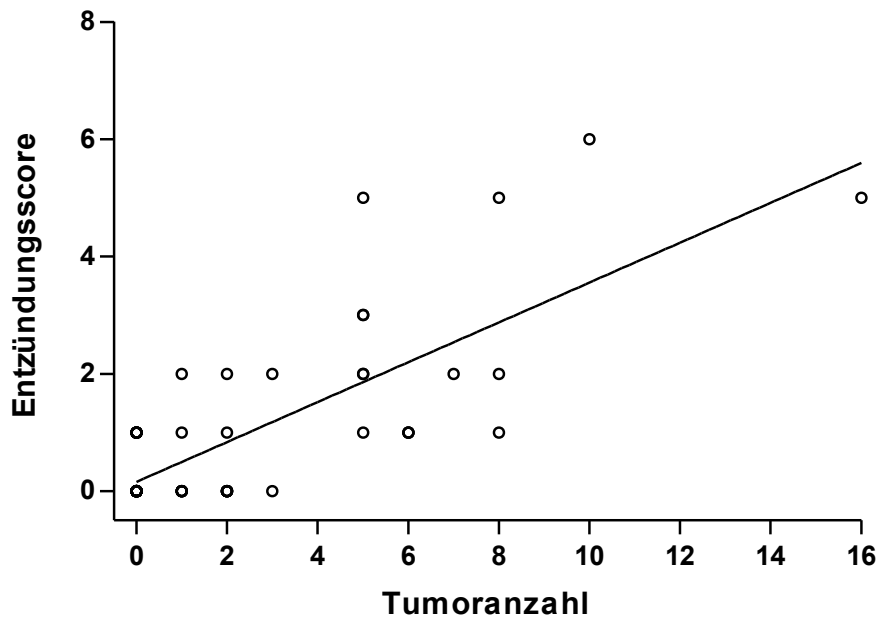


Abb.3.18. Korrelation zwischen Entzündung und Tumoranzahl. Lineare Regression $y = 0,3397x + 0,1579$, $R^2 = 0,59$.

Die Mehrheit der Tumore sowohl beim GPx2-Knockout als auch beim Wildtyp wurde im distalen Colon direkt am Anus vorgefunden (Abb.3.19.). Es gab demzufolge keinen Unterschied im Verteilungsmuster der Tumore zwischen den beiden Genotypen. Im proximalen Colon konnte nur bei einem GPx2-Knockout Tier auf selenarmem Futter ein Tumor verzeichnet werden. Vereinzelt Tumore traten in allen Gruppen im transversen Colon (40 bis 80 % Abstand vom Cäcum zum Anus) auf.

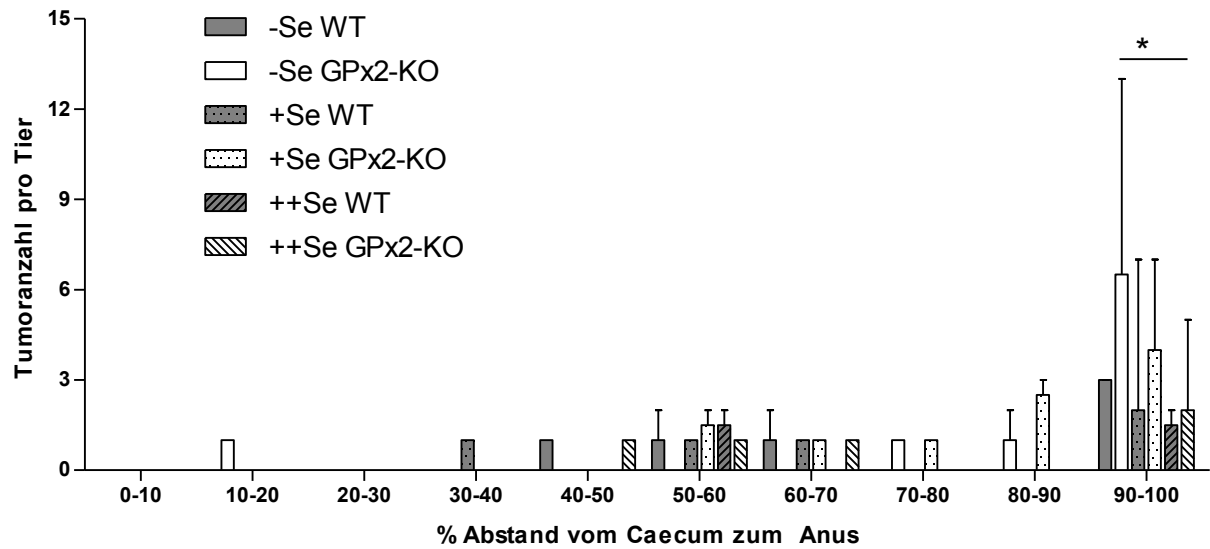


Abb.3.19. Tumorverteilung entlang des Colons. Dargestellt ist die Tumorverteilung (Median±SD) im Colon im WT (grau) und im GPx2-Knockout (KO) (weiß) in Abhängigkeit vom Selenstatus (ohne Muster = Selenarm, gepunktet = Selenadäquat und gestreift = Selensupplementiert). 1way ANOVA * p<0,05.

Die Messung der Tumorgöße erfolgte an der größten Ausdehnung des Tumors. Annähernd alle Tumore waren rund, demzufolge entspricht die gemessene Größe dem Durchmesser des Tumors. Im selensupplementierten Zustand waren die Tumore im GPx2-Knockout tendenziell kleiner als im Wildtyp. Im selenadäquaten Zustand wurde kein Unterschied in der Tumorgöße zwischen den beiden Genotypen festgestellt. Im Wildtyp wurden im selenarmen Zustand signifikant größere Tumore beobachtet als im GPx2-Knockout. (Abb.3.20.).

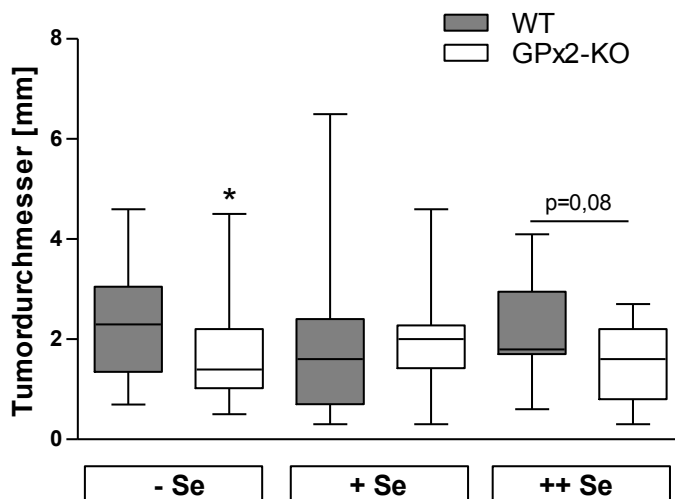


Abb.3.20. Größe der Colontumore im Wildtyp (WT) und GPx2-Knockout (KO). Dargestellt ist der Durchmesser (Boxplot mit Median und Whiskern vom Minimum zum Maximum) der Tumore im Colon im WT (grau) und im GPx2-Knockout (weiß) in Abhängigkeit vom Selenstatus. U-Test * p<0,05 vs WT.

4. DISKUSSION

4.1. Physiologische Funktion der GPx2

4.1.1. Enzymexpression im Colon in Abhängigkeit vom Alter

Bei Nagetieren beginnt die Besiedlung des Darms ab der Geburt durch *Bifidobacterium* Spezies und *Lactobacilli* Spezies [136]. Im Laufe der postnatalen Entwicklung verändert sich die Mikroflora, so dass sie sich im adulten Organismus aus mehreren Spezies zusammensetzt [137]. Die Besiedlung moduliert die Expression verschiedener Enzyme, die für die Immunantwort wichtig sind [138].

Um zu klären, welchen Einfluss die Mikroflora auf die Expression von GPx1 und GPx2 hat, erfolgte die Analyse der jeweiligen Enzymexpression im Zeitverlauf von der Geburt bis ins jugendadulte Alter. Die GPx2-Expression war postnatal und bis zum Alter von zwei Wochen niedrig. Im Alter von vier Wochen kam es zu einem ca. dreifachen Anstieg. Im weiteren Verlauf wurde keine weitere Expressionsteigerung dokumentiert (Abb.3.1.B) Die GPx1-Expression wurde ab dem Alter von einer Woche induziert und stieg im weiteren Altersverlauf allmählich an. Im Gegensatz zur GPx2-Expression wurde jedoch kein signifikanter Expressionsanstieg mit dem Absetzen vom Muttertier beobachtet (Abb.3.1.C). Demnach kommt es während der Veränderungen der Zusammensetzung der Darmmikroflora zwischen dem 8. und 21. Tag der postnatalen Entwicklung nur zu einer Erhöhung der Expression von GPx2.

Auch die Arbeitsgruppe um Steven Esworthy belegte, dass die GPx2-Expression im Ileum, im Gegensatz zur GPx1-Expression, durch die Veränderungen der Komposition der Mikroflora während der postnatalen Entwicklung induziert wird [139]. Die Organismen der Darmmikroflora kurz nach der Geburt werden als probiotisch eingestuft, da *Bifidobacterium* Spezies und *Lactobacilli* Spezies Entzündungen verhindern können, indem sie beispielsweise die Cytokinantwort von Enterozyten unterdrücken [140, 141, 142]. Im Gegensatz dazu fördert die Darmmikroflora in adulten Mäusen die Entstehung von entzündlichen Darmerkrankungen und wird somit als Stressinduktor angesehen [143, 144, 145]. Die Induktion von GPx2 könnte demnach antiinflammatorische Eigenschaften vermitteln, die Entzündungen, welche durch die Mikroflora ausgelöst werden, entgegenwirken.

Neben der Enzymexpression in Abhängigkeit vom Alter wurde der Selenstatus mittels Messung der GPx-Aktivität des Colons und des Selengehalts der Leber bestimmt. Es wurden auch Mäuse analysiert, die wenige Stunden alt waren. Da die Tiere zu diesem Zeitpunkt nur ein geringes Blutvolumen besitzen, konnte kein Plasmaselengehalt bestimmt werden. Kurz nach der Geburt, sowie im Alter von einer Woche hatten die Mäuse einen niedrigen Leberselenspiegel, obwohl das Muttertier mit Haltungsfutter, d.h. selensupplementiert,

versorgt wurde. Nach dem Absetzen vom Muttertier im Alter von vier Wochen erhielten die Tiere ebenfalls Haltungsfutter. Betrachtet man den Zeitraum von postnatal bis jungadult, so stieg der Selengehalt der Leber um das ca. Dreifache an. Eine weitere Zunahme im fortschreitenden Alter wurde jedoch nicht verzeichnet. Demnach stellt sich der Selengehalt der Leber bei ausreichendem Selengehalt des Futters auf ein konstantes Niveau im jungadulten Tier ein (Abb.3.1.A).

Die GPx-Aktivität im Colon stieg ab dem Alter von einer Woche signifikant an und blieb im weiteren Altersverlauf auf relativ gleichem Niveau (Abb.3.1.D). Somit verhalten sich die beiden Selenstatusmarker unterschiedlich in jungen Tieren. Vermutlich stellt die GPx-Aktivität einen besseren Marker für die Analyse des Selenstatus dar, da der Leberselengehalt erst allmählich im Laufe der postnatalen Entwicklung ansteigt.

4.1.2. Veränderte Enzymexpression im Colon im GPx2-Knockout

Um die physiologische Funktion von GPx2 genauer zu verstehen, wurden der Plasmaselenpiegel, die GPx-Aktivität und die Expression von GPx1 in GPx2-Knockout- und Wildtyp-Mäusen analysiert. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Analysen 13 Wochen alt und demnach war die Besiedlung des Darms dieser jungadulten Tiere keinen Veränderungen mehr unterlegen.

Wie zu erwarten, erhöhte die Aufnahme von selenadäquatem Futter den Plasmaselenpiegel in beiden Genotypen. Allerdings war der Plasmaselengehalt im GPx2-Knockout signifikant niedriger als der im Wildtyp. Das selensupplementierte Futter verursachte nur im GPx2-Knockout eine weitere Erhöhung des Plasmaselengehalts (Abb.3.3.). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Selenkonzentration des Futters dosisabhängig den Selengehalt des Plasmas ansteigen lässt.

Eventuell führt der Verlust von GPx2 zu einer veränderten Plasmaselenaufnahme oder zu einer vermehrten Expression von in der Hierarchie niedrig stehender Selenoproteine. Es ist bekannt, dass die Gabe von selenadäquatem Futter im Vergleich mit selenarmem Futter den Plasmaselenlevel in Mäusen um ein Vielfaches erhöht [146]. In einer humanen Selensupplementationsstudie stieg durch die Verabreichung von selensupplementierten Präparaten der Selengehalt des Blutes, der Haare und der Zehennägel nochmals an [147].

Auch die GPx-Aktivität im Colon stieg zumindest im GPx2-Knockout mit steigendem Selengehalt des Futters. Der GPx2-Knockout wies auf allen drei Selendiäten eine signifikant erhöhte GPx-Aktivität im Vergleich mit dem Wildtyp auf. Hierbei waren die größten Unterschiede auf selenadäquatem und -supplementiertem Futter zu beobachten (Abb. 3.4.). Diese Aktivitätserhöhung war unerwartet und auch zuvor nie beschrieben.

In vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe um Steven Esworthy wurde eher eine niedrigere Gesamt-GPx-Aktivität im Ileum von GPx2-Knockout Mäusen als in Wildtypieren

beschrieben. Eine höhere Gesamt-GPx-Aktivität im GPx2-Knockout wurde nur im Jejunum dokumentiert [139]. Die untersuchten Tiere hatten, im Gegensatz zu den für diese Arbeit analysierten Tieren, nachweislich eine Kontamination mit *Helicobacter* Spezies. Dies könnte eine eventuelle Erklärung für die gegensätzlichen Resultate sein, da aktuell spekuliert wird, inwieweit eine solche Pathogenkontamination die Expression bestimmter Enzyme beeinflusst [148].

Die bevorzugte Expression von GPx2 am Kryptengrund und GPx1 in der Kryptenspitze im Wildtyp wurde auch in dieser Arbeit bestätigt (Abb.3.6.) [25]. Die erhöhte GPx-Aktivität im GPx2-Knockout war überraschenderweise auf eine signifikant höhere GPx1-Expression entlang des gesamten Colons auf allen drei Selendiäten zurückzuführen (Abb.3.8.) Im Gegensatz zum Wildtyp wurde im GPx2-Knockout sogar im selenarmen Zustand eine GPx1-Expression detektiert (Abb.3.7.B). Beim Vergleich der GPx1-Expressionsmuster zwischen Wildtyp und GPx2-Knockout wurde festgestellt, dass im GPx2-Knockout die GPx1-Expression sogar im Kryptengrund lokalisiert war (Abb.3.7.).

In vorangegangenen Studien mit den GPx2-Knockout Mäusen wurde im Ileum ebenfalls eine erhöhte GPx1-Aktivität beschrieben [139]. Der Verlust von GPx2 *in vitro* resultierte in einem Anstieg von H₂O₂, so dass p53 stabilisiert wird. Im weiteren Verlauf induzierte p53 die Expression von antioxidativen Enzymen, wie z.B. GPx1 [149]. Die Vermutung ist, dass der Verlust von GPx2 am Kryptengrund durch die gesteigerte GPx1-Expression an dieser Stelle kompensiert werden soll. Mehrere Ursachen für die Steigerung der GPx1-Proteinexpression sind möglich. Eine erhöhte GPx1-mRNA Transkriptionsrate könnte ebenso dazu führen, wie eine erhöhte Stabilität der GPx1-mRNA, resultierend aus einer höheren Selenverfügbarkeit [150]. Ebenso könnte auch eine gesteigerte Translation der GPx1-mRNA ursächlich für diesen Phänotyp sein. Da GPx2 in der Hierarchie der Selenoproteine höher steht als GPx1, wird verfügbares Selen zunächst für die GPx2-Proteinbiosynthese verwendet [151]. Beim Verlust von GPx2 könnte das nun verfügbare Selen für die Proteinbiosynthese von GPx1 verwendet werden. Es bleibt zu klären, ob auch andere, in der Hierarchie eher niedrig stehende Selenoproteine wie z.B. SelW und SelH, vermehrt im GPx2-Knockout synthetisiert werden [146].

Die Konsequenzen einer gesteigerten GPx1-Expression wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht. GPx1-überexprimierende Mäuse sind resistenter gegenüber starkem oxidativem Stress [152]. Allerdings verursachte die Überexpression von GPx1 in Mäusen Adipositas, Insulinresistenz und Diabetes Mellitus Typ II [79]. Die für diese Arbeit verwendeten GPx2-Knockout Mäuse waren unabhängig vom Selenstatus des Futters ca. 1,5 bis 2 g schwerer als die Wildtypiere (Abb.3.2.). Bei der Analyse der Enzymexpression waren die Tiere ca. 12 Wochen alt. Es bleibt ungeklärt, ab welchem Zeitpunkt die GPx1-Induktion

einsetzt und ob sie mit fortschreitendem Alter aufrechterhalten bleibt. Zurzeit gibt es noch keine Daten über „alte“ GPx2-Knockout Mäuse.

4.1.3. Veränderte Morphologie des Colons im GPx2-Knockout

Für die Funktionalität des Colons ist dessen Morphologie und Zellhomöostase essentiell. In dieser Arbeit wurde überprüft, ob der GPx2-Knockout eine veränderte Colonmorphologie aufweist.

Im Wildtyp waren die meisten Apoptosen wie zu erwarten an der Kryptenspitze (1.Kryptviertel) vorzufinden (Abb.3.10.). Auch im GPx2-Knockout wurden an der Kryptenspitze Apoptosen dokumentiert. Allerdings wurde im GPx2-Knockout am Kryptengrund (4. Kryptviertel) eine signifikante Erhöhung der Apoptoseanzahl auf allen drei Selendiäten vorgefunden (Abb.3.10.). Dabei wurde eine dosisabhängige Reduktion der Apoptoseanzahl mit steigendem Selengehalt des Futters beobachtet. Im selenarmen Zustand war sogar im 3. Kryptviertel die Apoptoseanzahl signifikant erhöht (Abb.3.10.)

Die Selensupplementation reduzierte demzufolge die Anzahl der Apoptosen im Kryptengrund in beiden Genotypen. Allerdings war die Apoptoserate im GPx2-Knockout gegenüber dem Wildtyp immer noch deutlich erhöht. Daraus kann geschlossen werden, dass sich die Supplementation von Selen zwar positiv auf die Reduktion des vorgefundenen Phänotyps auswirkt, diesen aber nicht vollständig verhindern kann.

In der Literatur werden zum einen ein proapoptotischer und zum anderen ein antiapoptotischer Effekt von verschiedenen Selenverbindungen diskutiert. Die orale Applikation von Natriumselenit reduzierte in einem in Ratten Streptozotocin-induzierten Diabetesmodell Apoptosen in der Niere [153]. Im Gegensatz dazu war nach der Inkubation mit Methylseleninsäure *in vitro* vermehrte β -Catenin Degradation zu beobachten. Diese führte zur vermehrten Induktion von Apoptosen bzw. zur Inhibition des Zellwachstums [154]. Die genauen Mechanismen der Wirkung der einzelnen Selenverbindungen sind noch zu erforschen.

Das Fehlen von GPx2 bewirkt, dass am Kryptengrund vermehrt Zellen in Apoptosen gehen. Demnach kann eine antiapoptotische Wirkung von GPx2 postuliert werden. Auch *in vitro* inhibierte eine adäquate Expression von GPx2 Apoptosen [151]. Vermutlich wurden die im GPx2-Knockout vorgefundenen Apoptosen nicht ausschließlich durch H_2O_2 induziert, da es nachweislich zu einer gesteigerten GPx1-Expression im Kryptengrund kam und diese zu einer Reduktion von H_2O_2 führt. Der Redoxstatus wurde allerdings bislang nicht bestimmt. Demnach konnte GPx1 nicht vollständig die Funktion von GPx2 kompensieren. Das lässt vermuten, dass GPx1 und GPx2 verschiedene Substrate bevorzugen, oder in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert sind.

Weiterhin bleibt zu klären, ob eher der Verlust von GPx2 oder die Überexpression von GPx1 als proapoptotisches Signal einzustufen ist. Allerdings wurde bei einer Überexpression von GPx1 eine Reduktion des proapoptotischen Proteins Bax nachgewiesen [77]. Eine Reduktion der GPx1-Expression war *in vitro* mit in Apoptose gehenden Zellen assoziiert [78]. Weiterhin ungeklärt ist ebenso, welcher Zelltyp von den Apoptosen betroffen ist. Der Knockout des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 in Mäusen resultierte ebenfalls in einer Erhöhung der Apoptosen am Kryptengrund des Colons. Es wird vermutet, dass es sich bei den betroffenen Zellen um die dort lokalisierten adulten intestinalen Stammzellen handelt [155]. Inwieweit Bcl-2 bei der durch den Knockout von GPx2 induzierten Apoptose eine Rolle spielt, bleibt zu klären.

Neben der Apoptoserate kann die Bestimmung der Mitoserate ebenfalls Aufschluss über Veränderungen der Kryptomöostase geben. Die Analyse der Mitoserate zeigte, dass der Großteil der Mitosen sowohl im Wildtyp als auch im GPx2-Knockout im 3. und 4. Kryptviertel lokalisiert war (Abb.3.11.). Im selenarmen Zustand wurden im GPx2-Knockout auch im 2. Kryptviertel Mitosen detektiert (Abb.3.11.). Das bedeutet, dass der Verlust von GPx2 zusammen mit der Restriktion von Selen zu einer gesteigerten Mitoserate führte, da vermutlich die große Anzahl an Apoptosen im Kryptengrund die Zellzahl pro Krypte verminderte.

Die Lokalisation von Mitosen im 2. Kryptviertel deutet darauf hin, dass es hier vermutlich zu einer Verschiebung der Proliferationszone in Richtung Kryptenspitze gekommen ist. Es kann spekuliert werden, ob die enorm hohe Anzahl an Apoptosen im Kryptengrund im selenarmen Zustand zu dieser räumlichen Verdrängung geführt hat. Die Messung der Krypten im selenarmen Zustand im GPx2-Knockout ergab eine Länge von ca. 170 µm. Demzufolge waren die Krypten ca. 20 µm länger als die Krypten im Wildtyp und die Krypten im GPx2-Knock auf selenadäquatem- bzw. supplementiertem Futter. Diese morphologische Veränderung ist ein weiterer Beleg für die Verschiebung der Proliferationszone.

Es bleibt zu klären, welche Proteine in diesen Prozess involviert sind. Es ist bekannt, dass eine Erhöhung der Expression des Glucagon-like Peptid-2 (GLP-2) eine Kryptverlängerung bewirkt, indem vermutlich einerseits die Abschilferung der Zellen an der Kryptenspitze inhibiert wird und andererseits die Proliferation im Kryptengrund zunimmt [156]. Inwieweit sich die Verlängerung der Krypten, die erhöhte Apoptoseanzahl im Kryptengrund und die Verschiebung der Proliferationszone des GPx2-Knockout im selenarmen Zustand auf die gesamte Darmfunktion auswirkt, ist nicht bekannt. In dem von uns dokumentierten Zeitraum im Alter von 8 bis 21 Wochen kam es zu keiner Gewichtsreduktion in diesen GPx2-Knockout-Tieren. Demzufolge kann davon ausgegangen werden, dass die Resorption im Darm dieser Mäuse nicht gestört ist.

Im selenadäquaten und -supplementierten Zustand scheint die vermehrte Apoptoserate im GPx2-Knockout ohne große morphologische Veränderungen der Kryptenarchitektur toleriert zu werden. Zwar ist die Apoptoserate stark erhöht, aber sie reicht anscheinend nicht aus, um die Zellanzahl pro Krypte zu modulieren.

4.2. Einfluss von GPx2 auf die entzündungsassoziierte Colonkarzinogenese

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von GPx2 auf die entzündungsassoziierte Colonkarzinogenese erforscht werden. In dem hierfür verwendeten Krebsmodell wird der karzinogene Prozess durch die Applikation des Mutagens Azoxymethan (AOM) initiiert [157]. Eine anschließende Natrium-Dextransulfat-Behandlung verursacht eine Entzündung des Colons und stellt die Symptome von Colitis Ulcerosa im Menschen nach [158]. Die genauen Ursachen für die Entstehung von Colitis Ulcerosa sind bisher noch unbekannt. Es wird vermutet, dass die Struktur der intestinalen Mukosa, die durch eine sensitive Balance zwischen Apoptose und Zellregeneration aufrechterhalten wird, gestört ist [159]. Durch Veränderungen in den Tight-Junctions zwischen den Zellen und durch vermehrte Apoptose kommt es zu Störungen der Barrierefunktion der Epithelzellen [160, 161]. Dadurch können im weiteren Verlauf Bakterien die epitheliale Barriere durchwandern und somit Entzündungen auslösen [162].

Die Analyse des Entzündungsstatus des Colons erfolgte eine Woche nach der DSS-Applikation in der akuten Entzündungsphase. Die massivste Entzündung bei beiden Genotypen war im selenarmen Zustand vorzufinden. Im selenadäquaten Zustand kam es tendenziell zu einer Abmilderung der Entzündung. Die Supplementierung von Selen führte sowohl im GPx2-Knockout als auch im Wildtyp zu einer signifikanten Verminderung der Entzündung (Abb. 3.14.).

Demnach hat die Supplementierung von Selen in Form von Selenomethionin eine antiinflammatorische Wirkung. Diese Wirkung scheint dosisabhängig zu sein, denn mit steigendem Selengehalt des Futters kam es zu einer schrittweisen Abmilderung der Entzündung. Einige Selenverbindungen vermitteln eine antiinflammatorische Wirkung. Die Gabe von Natriumselenit *in vitro* bewirkte eine verbesserte Immunantwort [163]. Des Weiteren verursachte der Knockout der Selenocystein-tRNA in Makrophagen Veränderungen der extrazellulären Matrixproteinexpression und resultierte in einer vermehrten Invasivität dieser Immunzellen. Deshalb wurde geschlossen, dass bestimmte Selenoproteine antiinflammatorische Effekte bewirken können [132].

Es gibt viele Hinweise, dass GPx2 antiinflammatorische Eigenschaften besitzt. Beispielsweise ist GPx2 ein Zielgen des Transkriptionsfaktors Nrf2 [88]. Dieser induziert bei oxidativem Stress, welcher durch z.B. Krebs oder Entzündung ausgelöst wird, verschiedene antioxidative Schutzmechanismen. Der *in vitro* siRNA-vermittelte Knockdown

von GPx2 verursachte sowohl eine Steigerung der Cyclooxygenase-2 (COX2)-Expression als auch eine Erhöhung der Prostaglandin-E2 (PGE2)-Produktion. Es wird deshalb vermutet, dass GPx2 COX-2 hemmt [164]. Der Nachweis darüber, ob auch *in vivo* eine adäquate GPx2-Expression im Colon der Cyclooxygenase-2 entgegenwirken kann, muss noch erbracht werden. Auch *in vivo* wurde die antiinflammatorische Wirkung von GPx2 beobachtet. Der Doppel-Knockout von GPx1 und GPx2 in Mäusen verursachte massive Colitis und im weiteren Verlauf Colontumore [84]. Jedoch war ein GPx2-Allel ausreichend, um diesen Phänotyp zu unterdrücken, so dass keine Colitis und Tumore vorzufinden waren [84]. Zusätzlich kam es in GPx2-Knockout Mäusen zu einer stärkeren durch ein Allergen induzierten Atemwegsentzündung als in den vergleichbaren Wildtypen [90].

Im Vergleich zwischen den beiden Genotypen wurde ein signifikant erhöhter Entzündungsstatus des Colons im GPx2-Knockout im selenarmen und -adäquaten Zustand dokumentiert (Abb.3.14.). Die Selensupplementation reduzierte die Entzündung in beiden Genotypen auf das gleiche Niveau, so dass kein Unterschied mehr zwischen GPx2-Knockout und Wildtyp festgestellt wurde. Demzufolge kann postuliert werden, dass eine adäquate GPx2-Expression einen Schutz vor Entzündung bietet, indem die Entzündung abgemildert wird, bzw. deren Initiation verhindert wird.

Der Knockout von GPx2 erhöhte unter physiologischen Bedingungen unabhängig vom Selengehalt des Futters die Apoptoserate im Kryptengrund. Es kann deshalb spekuliert werden, inwieweit sich dieser Befund positiv auf die Entzündung auswirkt. Vermutlich ist durch die erhöhte Apoptoserate die Mukosahomöostase gestört, so dass die Barrierefunktion der Epithelschicht nicht mehr aufrechterhalten werden kann. Die vermehrte Einwanderung von Bakterien würde dann den Entzündungsprozess vorantreiben. In mehreren Studien zu Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn wurde durch die Inhibition von Apoptosen die Entzündung im Darm abgemildert [165, 166].

Des Weiteren liegt die Vermutung nahe, dass sich die Krypten im GPx2-Knockout in der Entzündungsphase aufgrund der massiven Apoptosen im Kryptengrund langsamer regenerieren können. Das könnte zum einen eine länger andauernde Entzündung verursachen und zum anderen könnten größere Bereiche der Mukosa im GPx2-Knockout entzündet sein. Letztendlich würde das die Wahrscheinlichkeit der Manifestation von Mutationen an der DNA erhöhen. Im weiteren Verlauf könnte das zum einen die Tumorentstehung positiv beeinflussen oder zum anderen den karzinogenen Prozess beschleunigen.

Ebenso hat die bakterielle Kolonisation des Colons einen Einfluss auf die Initiation bzw. den Verlauf einer Entzündung [167]. Es bleibt zu diskutieren, welchen Einfluss die veränderte Enzymexpression im GPx2-Knockout auf die bakterielle Kolonisation hat. Möglicherweise wird eine eher pathogene Besiedlung des Colons gefördert. Das wäre eine weitere Erklärung

für den starken Entzündungsstatus im GPx2-Knockout. Außerdem erhöhte der Knockout von GPx2 die GPx1-Expression (Abb.3.8.). Eine adäquate GPx1-Expression erhöhte die durch ein Allergen-induzierten Atemwegsentszündung, weil durch den verminderten Level an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) die Anzahl an differenzierten T-Lymphozyten verringert wurde [168].

Die entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn (MC) und Colitis Ulcerosa (UC) erhöhen das Risiko für Colonkrebs nachweislich [169, 170]. Auch in verschiedenen Mausmodellen war eine chronische Entzündung im weiteren Verlauf mit der Entstehung von Colontumoren assoziiert [84]. Auch in diesem Tierversuch korrelierte eine stärkere Entzündung mit einer erhöhten Tumoranzahl.

Zunächst erfolgte die Auswertung von aberranten Krypt Foci (ACF). Diese werden als Tumorstufen bewertet, da vermutet wird, dass verschiedene Mutationen sowie epigenetischen Veränderungen in Tumorsuppressorgenen bzw. Onkogenen genomische Instabilität verursachen, so dass sich im weiteren Verlauf aus ACF Adenome bilden können [171, 101]. Die Anzahl von Krypten pro Focus schwankt von einer Krypte pro Focus bis hundert [172].

Bei der Auswertung der Anzahl von Krypten pro Focus gab es keine Unterschiede zwischen GPx2-Knockout und Wildtyp (Abb.3.16.). Die meisten ACF hatten ein, zwei und drei Krypten pro Focus. Die ACF-Inzidenz zeigte weder zwischen Wildtyp und GPx2-Knockout noch zwischen den drei Selendiäten große Unterschiede (Tab. 3.1.). In den Wildtyp-Tieren wurde unabhängig vom Selengehalt des Futters eine tendenziell höhere ACF-Inzidenz als im GPx2-Knockout beobachtet. Im selenarmen und -adäquaten Zustand wurden im Wildtyp tendenziell mehr ACF dokumentiert als im GPx2-Knockout (Tab.3.1.).

Wenn die ACF als Tumorstufen betrachtet werden, kann davon ausgegangen werden, dass die Karzinogenese im GPx2-Knockout schon weiter vorangeschritten ist und deshalb weniger Tiere ACF aufwiesen. Auch in anderen Studien war die Korrelation zwischen Tumor- und ACF-Anzahl invers [173, 174, 175].

Im selenarmen und im -supplementierten Zustand war die Tumorzinzenz im GPx2-Knockout tendenziell höher als im Wildtyp. Im selenadäquaten Zustand wurde kein Unterschied in der Tumorzinzenz zwischen den beiden Genotypen festgestellt. Demzufolge liegt die Vermutung nahe, dass der Knockout von GPx2 sowie die Supplementation von Selen keinen wesentlichen Einfluss auf die Tumorzinzenz haben.

Im GPx2-Knockout waren sowohl im selenarmen als auch -adäquaten Zustand tendenziell mehr Tumore vorhanden. Nur im selensupplementierten Zustand war kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen zu verzeichnen, wobei die Streuung innerhalb der GPx2-Knockout-Gruppe immer noch sehr hoch war (Abb. 3.17.). Dieser Befund verdeutlicht die Hypothese, dass der Knockout von GPx2 sowohl vermutlich die Tumorzinzenz verstärkt als

auch die Tumorprogression beschleunigt. Bei diesem entzündungsassoziierten Krebsmodell kann davon ausgegangen werden, dass die stärkere Entzündung im GPx2-Knockout die Tumorentstehung stimuliert hat.

Durch die Supplementation von Selen kam es zu einer Reduktion der Tumoranzahl in beiden Genotypen, wobei diese im GPx2-Knockout sogar signifikant war. Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse mehrerer humaner Seleninterventionsstudien, in denen die Supplementation von Selen beispielsweise das Colon-, Prostata- und Lungenkrebsrisiko senkte (Tab.1.1.). Der genaue antikarzinogene Mechanismus von Selen ist bisher noch unbekannt. Einerseits können die antikarzinogenen Effekte durch die verschiedenen Selenverbindungen vermittelt werden [176]. Aber andererseits wird vermutlich durch die Supplementation von Selen auch die Proteinbiosynthese aller Selenoproteine vorangetrieben, so dass die Reduktion des Krebsrisikos demzufolge auch durch einzelne Selenoproteine vermittelt werden könnte [177]. Eine Hypothese ist, dass beispielsweise eine adäquate GPx1-Expression vor oxidativem Stress und somit auch vor der Entstehung von Tumoren schützt [178].

Die Analyse der Tumorverteilung entlang des Colons ergab, dass sich der Großteil der Tumore sowohl im Wildtyp als auch im GPx2-Knockout distal am Anus befand. Vereinzelt wurden auch Tumore im transversen Colon dokumentiert. Im proximalen Colon wurde kein Tumor detektiert. Es ist bekannt, dass sich die meisten Colontumore im Menschen sowie in Mäusen im distalen Abschnitt entwickeln [179, 174]. Allerdings wird aktuell kontrovers diskutiert, welche Ursachen zu diesem Verteilungsmuster führen.

Im selenadäquaten Zustand wurde kein Unterschied in der Tumorgöße zwischen den beiden Genotypen festgestellt. Allerdings entwickelten sich im GPx2-Knockout signifikant kleinere Tumore im selenarmen und -supplementierten Zustand. Demnach stimuliert GPx2 die Proliferation von Zellen. Im karzinogenen Prozess ist diese Eigenschaft als negativ zu bewerten, da dadurch das Wachstum von Tumoren unterstützt wird.

GPx2 ist ein Zielgen von β -Catenin, welches im Colonkrebs konstitutiv aktiv ist und dadurch unkontrolliertes Zellwachstum verursacht [100]. Die Eigenschaft von GPx2, Apoptosen zu inhibieren, wirkt sich vermutlich ebenso positiv auf das Tumorstadium aus. In *in vitro* Versuchen erhöhte die Expression von GPx2 das Koloniewachstum von Krebszellen im Softagar. Nach der Injektion von HT29-Zellen in Nacktmäusen entwickelten sich aus den HT29-Zellen, die GPx2 exprimierten im Gegensatz zu den HT29-Zellen mit einer verminderten GPx2-Expression, größere Tumore [89]. Während der Colonkarzinogenese wird GPx2 transient überexprimiert [25]. Die Ursache für die Hochregulation der GPx2-Expression könnte verschiedene Ursachen haben. In Tumoren wird die ΔN -Isoform von p63 vermehrt exprimiert. GPx2 ist ein Zielgen von p63. Dieser Transkriptionsfaktor scheint duale Funktionen zu haben, denn einerseits wurde eine tumorsuppressive Funktion postuliert aber andererseits konnte auch eine onkogene Wirkung von p63 festgestellt werden [151].

Ob diese Überexpression von GPx2 als pro- oder antikarzinogen eingestuft werden soll bleibt weiterhin ungeklärt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten jedoch, dass GPx2-Knockout-Tiere mehr Entzündung und Colonkrebs haben.

4.3. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der Knockout von GPx2 einerseits zu einer drastischen Erhöhung der Apoptoserate im Kryptengrund führte und andererseits eine Überexpression von GPx1 bewirkte. Obwohl auf allen drei Selenidäten eine Steigerung der Apoptoserate dokumentiert wurde, war der Effekt auf selenarmem Futter am größten. Die Tiere wurden in diesem Versuch über einen Zeitraum von 17 Wochen mit dem entsprechenden Futter versorgt. Um zu erfahren, welchen Einfluss diese Veränderungen im Expressionsmuster bzw. die Erhöhung der Apoptoserate auf die Funktion des Darms haben, sollten weitere Versuche durchgeführt werden, bei denen die Tiere über einen längeren Zeitraum gefüttert werden. Ein verlängerter Fütterungsversuch würde außerdem Aufschluss darüber geben, ob die Tiere im weiteren Verlauf durch die GPx1-Überexpression eine Insulinresistenz und Diabetes Mellitus Typ II entwickeln würden. Es bleibt zu klären, auf welcher Regulationsebene der Knockout von GPx2 die Expression von GPx1 beeinflusst. Hierfür sollten weitere Untersuchungen in Bezug auf die Transkriptions- und Translationsrate der GPx1-mRNA sowie deren Stabilität erfolgen. Des Weiteren sollte ermittelt werden, ob der Knockout von GPx2 auch einen Einfluss auf die Expression von anderen Selenoproteinen besitzt. Die mechanistischen Effekte der antiapoptotischen Wirkung von GPx2 sind immer noch ungeklärt. Inwieweit die vermittelte Inhibierung der Apoptose über den Transkriptionsfaktor p53 abläuft, muss noch erforscht werden. Hierfür wäre es notwendig den Kryptengrund im Wildtyp und im GPx2-Knockout in Bezug auf veränderte Enzymexpression zu analysieren. Modulationen in bestimmten Signalwegen könnten darüber Aufschluss geben, welche apoptotischen Signalwege durch GPx2 inhibiert werden. Um zu überprüfen, welchen Einfluss die GPx2-Expression auf den Verlauf der Entzündung des Colons hat, sollten weitere Versuche mit dem entzündungsassoziierten Karzinogenesemodell durchgeführt werden, bei denen verschiedene Zeitpunkte innerhalb der Entzündung betrachtet werden sollten. Dadurch könnte geklärt werden, ob es Unterschiede im Regenerationsverhalten der Mukosa bzw. in der Größe der entzündeten Areale zwischen GPx2-Knockout und Wildtyp gibt. Weiterhin sind die Mechanismen der antiinflammatorischen Wirkung von GPx2 *in vivo* unerforscht. Es sollte innerhalb der Entzündungsphase analysiert werden, ob es auch im Colon zu einer Unterdrückung der COX2-Expression durch GPx2 kommt. Mittels Expressionsanalysen des betroffenen Gewebes könnten weitere Veränderungen in Signalwegen detektiert werden. Außerdem ist bisher noch unerforscht, ob der Knockout von GPx2 einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Bakterienflora im

Colon hat. Eine veränderte Darmbesiedlung mit einem Überschuss an Pathogenen könnte eine weitere Erklärung für die höhere Entzündungssensibilität des GPx2-Knockout darstellen.

In Hinblick auf die entzündungsassoziierte Karzinogenese zeigte sich, dass der Knockout von GPx2 zu einer Erhöhung der Tumoranzahl auf selenarmem und -adäquatem Futter führte. Es bleibt zu klären, ob der hier vorgefundene Einfluss von GPx2 auf die entzündungsgassoziierte Karzinogenese sich ebenso in einem Karzinogenesemodell ohne Entzündung zeigt. Hierfür könnte Colonkrebs beispielsweise durch die mehrmalige Gabe des Mutagens Azoxymethan (AOM) verursacht werden. Eine Hypothese ist, dass in einem reinen Karzinogenesemodell womöglich weniger Tumore im GPx2-Knockout detektiert werden, da es durch die unter physiologischen Bedingungen vorgefundenen Apoptosen im GPx2-Knockout zu einer massiven Aussortierung von Zellen mit DNA-Schäden kommen könnte und sich dadurch wahrscheinlich nur wenige Mutationen an der DNA manifestieren können. Des Weiteren müssen die proliferativen Effekte von GPx2 genauer untersucht werden.

Die Mechanismen, die hinter den antiinflammatorischen, antikarzinogenen und antiapoptotischen Effekten von Selen stecken, bedürfen weiterer Erforschung, um die Ergebnisse der derzeit durchgeführten Seleninterventionsstudien besser interpretieren zu können.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Entdeckung der Glutathionperoxidase-2 (GPx2) wurde zunächst davon ausgegangen, dass die Funktion dieses Enzyms im Kryptengrund des Colons einzig in der Reduktion von H_2O_2 besteht. Im Laufe der weiteren Erforschung zeigte sich, dass GPx2 auch in verschiedenen Tumorgeweben vermehrt exprimiert wird. Dabei wird diskutiert, ob die Wirkung von GPx2 im Tumor eher als pro- oder als antikarzinogen einzustufen ist. Mehrere Experimente *in vitro* und *in vivo* zeigten antiinflammatorische Eigenschaften der GPx2. Aufgrund dieser Befunde wird derzeit über weitere Funktionen der GPx2 spekuliert.

In dieser Arbeit wurde die physiologische Funktion von GPx2 näher erforscht, dazu wurden Wildtyptiere und GPx2-Knockout-Tiere in Hinblick auf Veränderungen der Enzymexpression und der Colonmorphologie untersucht. Der Knockout von GPx2 erhöhte die Apoptoserate im Kryptengrund. Dabei war der größte Effekt auf selenarmem Futter zu verzeichnen. Hierbei kam es sogar zu einer Veränderung der Colonmorphologie, da die Verschiebung der Proliferationszone in Richtung Kryptenspitze eine Verlängerung der Krypten nach sich zog. Im Wildtyp wurden keine Apoptosen im Kryptengrund detektiert. GPx1 wird unter physiologischen Bedingungen im Gegensatz zur GPx2 in der Kryptenspitze exprimiert und ist im Selenmangel nicht mehr detektierbar. Der Knockout von GPx2 erhöhte die GPx1-Expression im Kryptengrund auf allen drei Seliendäten. Diese Überexpression von GPx1 am Kryptengrund soll vermutlich den Verlust von GPx2 an dieser Stelle kompensieren. Da jedoch dort die massive Apoptoserate detektiert wurde, kann die GPx1 nicht die komplette Funktion von GPx2 kompensieren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Funktion von GPx2 nicht nur in der Reduktion von H_2O_2 liegt. Vielmehr kann eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase von Zellen postuliert werden.

Ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit war die Klärung der Frage, welchen Einfluss GPx2 auf die entzündungsassoziierte Colonkarzinogenese ausübt. In dem hierfür verwendeten AOM/DSS-Modell wird der karzinogene Prozess durch Entzündung vorangetrieben. Es erfolgte sowohl im Wildtyp als auch im GPx2-Knockout zum einen die Bewertung des Entzündungsstatus des Colons und zum anderen wurde die Anzahl von ACF und Tumoren verglichen. Das Colon im GPx2-Knockout war wesentlich stärker entzündet als im Wildtyp. Diese Ergebnisse bestätigen die für die GPx2 postulierte antiinflammatorische Funktion. Normalerweise führt eine Erhöhung der Mitoseanzahl zur Regeneration des entzündeten Gewebes. Jedoch beeinflusst der Verlust von GPx2 vermutlich den Ablauf der Entzündung, indem beispielsweise die Regeneration des Gewebes durch die enorm hohe Apoptoserate am Kryptengrund verlangsamt wird. Des Weiteren hatten sich im GPx2-Knockout tendenziell weniger ACF jedoch mehr Tumore entwickelt. Somit korrelierte die Entzündung des Colons mit der Entwicklung von Tumoren. Der Verlust von GPx2 begünstigte vermutlich sowohl die

Tumorinitiation als auch die Tumorprogression. Allerdings stimulierte die Expression von GPx2 ebenfalls das Tumorwachstum.

Es kann geschlussfolgert werden, dass eine adäquate GPx2-Expression vor Entzündung schützt und somit das Risiko für Colonkrebs senkt. Ob GPx2 aber insgesamt pro- oder antikarzinogen wirkt, hängt vermutlich vom Stadium des Colonkarzinogenese ab.

6. LITERATUR

- [1] J. J. Berzelius. Lehrbuch der Chemie – Zweiter Band. 1844. p. 195.
- [2] H. H. Binder. Lexikon der chemischen Elemente. S. Hirzel Verlag. Stuttgart 1999.
- [3] P. J. Peterson and G. W. Butler. The uptake and assimilation of selenite by higher plants. *Austr. J. Biol. Sciences*, 1962. 15: p. 126-146.
- [4] I. A. Manville. The Selenium Problem and its Relationship to Public Health. *Am. J. Public Health Nations Health*, 1939. 29(7): p. 709-719.
- [5] A. M. Hurd-Karrer and F. W. Poos. Toxicity of selenium-containing plants to aphids. *Science*, 1936. 84(2176): p. 252.
- [6] K. W. Franke. A new toxicant occurring naturally in certain samples of plant foodstuffs. *J. Nutr.*, 1934. 8(5): p. 609-613.
- [7] F. Hernaman-Johnson. Secondary Ulceration of Breast treated by Todd's Method (Selenium Injections followed by X-rays). *Proc. Roy. Soc. Med.*, 1935. 28(6): p. 758.
- [8] S. F. Trelease and H. M. Trelease. Selenium as a stimulating and possibly essential element for certain plants. *Science*, 1938. 87(2247): p. 70-71.
- [9] K. Schwarz and C. M. Foltz. Factor 3 Activity of Selenium Compounds. *J. Biol. Chem.*, 1958. 233(1): p. 245-251.
- [10] M. E. Roberts. Antiinflammation studies. II. Antiinflammatory properties of selenium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1963. 5: p. 500-506.
- [11] D. E. Hogue, J. F. Proctor, R. G. Warner and J. K. Loosli. Relation of selenium, vitamin E and an unidentified factor to muscular dystrophy (stiff-lamb or white-muscle disease) in the lamb. *J. Anim. Sci.*, 1962. 21: p. 25-29.
- [12] Keshan Disease Research Group of the Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing, Observations on effect of sodium selenite in prevention of Keshan disease. *Chin. Med. J. (Engl.)*, 1979. 92(7): p. 471-476.
- [13] C. Cermelli, M. Vinceti, E. Scaltriti, E. Bazzani, F. Beretti, G. Vivoli and M. Portolani. Selenite inhibition of Coxsackie virus B5 replication: implications on the etiology of Keshan disease. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2002. 16: p. 41-46.
- [14] Deutsche Gesellschaft für Ernährung (www.dge.de): D-A-CH-Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, 2008.
- [15] J. R. Andressen and L.G. Ljungdahl. Formate Dehydrogenase of *Clostridium thermoaceticum*: Incorporation of Selenium-75, and the Effects of Selenite, Molybdate, and Tungstate on the Enzyme. *J. Bacteriol.*, 1973. 116(2): p. 867-873.
- [16] D. L. Hatfield and V. N. Gladyshev. How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol. Cell Biol.*, 2002. 22(11): p. 3565-3576.
- [17] D. M. Driscoll and P. R. Copeland. Mechanism and regulation of selenoprotein synthesis. *Annu. Rev. Nutr.*, 2003. 23: p. 17-40.

- [18] A. V. Lobanov, D. L. Hatfield and V. N. Gladyshev. Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009. 1790: p. 1424-1428.
- [19] E. C. Moore, P. Reichard and L. Thelander. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. V. Purification and properties of thioredoxin reductase from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.*, 1964. 239: p. 3445-3452.
- [20] Matsui, M., M. Oshima, H. Oshima, K. Takaku, T. Maruyama, J. Yodoi and M. M. Taketo. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev. Biol.*, 1996. 178: p. 179-185.
- [21] L. Nonn, R. R. Williams, R. P. Erickson and G. Powis. The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. *Mol. Cell. Biol.*, 2003. 23: p. 916-922.
- [22] G. V. Kryukov, S. Castellano, S. V. Novoselov, A. V. Lobanov, O. Zehtab, R. Guigó and V. N. Gladyshev. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, 2003. 300(5624): p. 1439-1443.
- [23] L. Flohé, L., W. A. Günzler and H. H. Schock. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.*, 1973. 32(1): p. 132-134.
- [24] F. F. Chu, J. H. Doroshov and R. S. Esworthy. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J. Biol. Chem.*, 1993. 268(4): p. 2571-2576.
- [25] S. Florian, K. Wingler, K. Schmehl, G. Jacobasch, O. J. Kreuzer, W. Meyerhof and R. Brigelius-Flohé. Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue. *Free Radic. Res.*, 2001. 35(6): p. 655-663.
- [26] K. Takahashi, N. Avissar, J. Whitin and H. Cohen. Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1987. 256: p. 677-686.
- [27] D. J. Broderick, J. T. Deagen and P. D. Whanger. Properties of glutathione peroxidase isolated from human plasma. *J. Inorg. Biochem.*, 1987. 30(4): p. 299-308.
- [28] F. Ursini, M. Maiorino, M. Valente, L. Ferri and C. Gregolin. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim. Biophys. Acta*, 1982. 710: p. 197-211.
- [29] F. Ursini, S. Heim, M. Kiess, M. Maiorino, A. Roveri, J. Wissing and L. Flohé. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science*, 1999. 285: p. 1393-1396.
- [30] M. J. Berry, L. Banu and P. R. Larsen. Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature*, 1991. 349(6308): p. 438-440.
- [31] J. Köhrle. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Mol. Cell Endocrinol.*, 1999. 151: p. 103-119.
- [32] K. Hirota, M. Matsui, S. Iwata, A. Nishiyama, K. Mori and J. Yodoi. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997. 94(8): p. 3633-3638.

- [33] S. R. Lee, J. R. Kim, K. S. Kwon, H. W. Yoon, R. L. Levine, A. Ginsburg and S. G. Rhee. Molecular cloning and characterization of a mitochondrial selenocysteine-containing thioredoxin reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 1999. 274: p. 4722-4734.
- [34] Q. A. Sun, Y. Wu, F. Zappacosta, K. T. Jeang, B. J. Lee, D. L. Hatfield and V. N. Gladyshev. Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. *J. Biol. Chem.*, 1999. 274(35): p. 24522-24530.
- [35] Q. A. Sun, L. Kirnarsky, S. Sherman and V. N. Gladyshev. Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001. 98: p. 3673-3678.
- [36] I. Y. Kim and T. C. Stadtman. Selenophosphate synthetase: detection in extracts of rat tissues by immunoblot assay and partial purification of the enzyme from the archaean *Methanococcus vannielii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995. 92: p. 7710-7713.
- [37] S. C. Low, J. W. Harney and M. J. Berry. Cloning and functional characterization of human selenophosphate synthetase, an essential component of selenoprotein synthesis. *J. Biol. Chem.*, 1995. 270: p. 21659-21664.
- [38] V. M. Labunskyy, A. D. Ferguson, D. E. Fomenko, Y. Chelliah, D. L. Hatfield and V. N. Gladyshev. A novel cysteine-rich domain of Sep15 mediates the interaction with UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 2005. 280: p. 37839-37845.
- [39] J. Panee, Z. R. Stoytcheva, W. Liu and M. J. Berry. Selenoprotein H is a redox-sensing high mobility group family DNA-binding protein that up-regulates genes involved in glutathione synthesis and phase II detoxification. *J. Biol. Chem.*, 2007. 282: p. 23759-23765.
- [40] Y. Horibata and Y. Hirabayashi. Identification and characterization of human ethanolaminephosphotransferase1. *J. Lipid Res.*, 2007. 48: p. 503-508.
- [41] C. Lu, F. Qiu, H. Zhou, Y. Peng, W. Hao, J. Xu, J. Yuan, S. Wang, B. Qiang, C. Xu and X. Peng. Identification and characterization of selenoprotein K: an antioxidant in cardiomyocytes. *FEBS Lett*, 2006. 580(22): p. 5189-5197.
- [42] M. A. Reeves, F. P. Bellinger and M. J. Berry. The neuroprotective functions of selenoprotein M and its role in cytosolic calcium regulation. *Antioxid. Redox Signal.*, 2010. 12(7): p. 809-818.
- [43] P. Castets, S. Maugenre, C. Gartoux, M. Rederstorff, A. Krol, A. Lescure, S. Tajbakhsh, V. Allamand and P. Guicheney. Selenoprotein N is dynamically expressed during mouse development and detected early in muscle precursors. *BMC Dev. Biol.*, 2009. 9: p. 46.
- [44] M. A. Motsenbocker and A. L. Tappel. A selenocysteine-containing selenium-transport protein in rat plasma. *Biochim. Biophys. Acta*, 1982. 719: p. 147-153.
- [45] Y. Gao, H. C. Feng, K. Walder, K. Bolton, T. Sunderland, N. Bishara, M. Quick, L. Kantham and G. R. Collier. Regulation of the selenoprotein SelS by glucose deprivation and endoplasmic reticulum stress - SelS is a novel glucose-regulated protein. *FEBS Lett*, 2004. 563: p.185-190.

- [46] J. E., Curran, J. B. Jowett, K. S. Elliott, Y. Gao, K. Gluschenko, J. Wang, D. M. Abel Azim, G. Cai, M. C. Mahaney, A. G. Comuzzie, T. D. Dyer, K. R. Walder, P. Zimmet, J. W. MacCluer, G. R. Collier, A. H. Kissebah and J. Blangero. Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response. *Nat. Genet*, 2005. 37: p. 1234-1241.
- [47] L. Grumolato, H. Ghzili, M. Montero-Hadjadje, S. Gasman, J. Lesage, Y. Tanguy, L. Galas, D. Ait-Ali, J. Leprince, N. C. Guérineau, A. G. Elkahoun, A. Fournier, D. Vieau, H. Vaudry and Y. Anouar. Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca²⁺ mobilization and neuroendocrine secretion. *FASEB J.*, 2008. 22(6): p. 1756-1768.
- [48] A. Sengupta, B. A. Carlson, V. M. Labunskyy, V. N. Gladyshev and D. L. Hatfield. Selenoprotein T deficiency alters cell adhesion and elevates selenoprotein W expression in murine fibroblast cells. *Biochem. Cell Biol.*, 2009. 87(6): p. 953-961.
- [49] A. Dikiy, S. V. Novoselov, D. E. Fomenko, A. Sengupta, B. A. Carlson, R. L. Cerny, K. Ginalski, N. V. Grishin, D. L. Hatfield and V. N. Gladyshev. SelT, SelW, SelH, and Rdx12: Genomics and Molecular Insights into the Functions of Selenoproteins of a Novel Thioredoxin-like Family. *Biochem.*, 2007. 46: p. 6871-6882.
- [50] P. D. Whanger. Selenoprotein W. *Methods Enzymol.*, 2002. 347: p. 179-187.
- [51] G. V. Kryukov, R. A. Kumar, A. Koc, Z. Sun and V. N. Gladyshev. Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002. 99:p. 4245-4250.
- [52] I. Chambers, J. Frampton, P. Goldfarb, N. Affara, W. McBain and P. R. Harrison. The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *EMBO J.*, 1986. 5: p. 1221-1227.
- [53] T. C. Stadtman. Selenocysteine. *Annu. Rev. Biochem.*, 1996. 65: p. 83-100.
- [54] M. J. Berry, J. D. Kieffer, J. W. Harney and P. R. Larsen. Selenocysteine confers the biochemical properties characteristic of the type I iodothyronine deiodinase. *J. Biol. Chem.*, 1991. 266(22): p. 14155-14158.
- [55] W. Leinfelder, E. Zehelein, M. A. Mandrand-Berthelot and A. Böck. Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine. *Nature*, 1988. 331: p. 723-725.
- [56] P. R. Copeland, J. E. Fletcher, B. A. Carlson, D. L. Hatfield and D. M. Driscoll. A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. *EMBO J.*, 2000. 19: p. 306-314.
- [57] D. Fagegaltier, N. Hubert, K. Yamada, T. Mizutani, P. Carbon, A. Krol. Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation. *EMBO J.*, 2000. 19: p. 4796-4805.
- [58] L. Chavatte, B. A. Brown and D. M. Driscoll. Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2005. 12: p. 408-416.

- [59] B. A. Carlson, F. J. Martin-Romero, E. Kumaraswamy, M. E. Moustafa, H. Zhi, D. L. Hatfield and B. J. Lee. Mammalian selenocysteine tRNA, 2001. p. 23-32. *In* D. L. Hatfield (ed.), Selenium: its molecular biology and role in human health. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Mass.
- [60] L. V. Papp, J. Lu, A. Holmgren, K. K. Khanna. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid. Redox Signal.*, 2007. 9(7): p. 775-806.
- [61] C. Allmang, P. Carbon, A. Krol. The SBP2 and 15.5 kD/Snu13p proteins share the same RNA binding domain: identification of SBP2 amino acids important to SECIS RNA binding. *RNA*, 2002. 8: p. 1308-1318.
- [62] J. Donovan and P. R. Copeland, Threading the needle: Getting selenocysteine into proteins. *Antioxid. Redox Signal.*, 2010. 12(7): p. 881-892.
- [63] K. E. Hill, P. R. Lyons and R. F. Burk. Differential regulation of rat liver selenoprotein mRNAs in selenium deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992. 185: p. 260-263.
- [64] A. M. Diamond, I. S. Choi, P. F. Crain, T. Hashizume, S. C. Pomerantz, R. Cruz, C. J. Steer, K. E. Hill, R. F. Burk and J. A. McCloskey. Dietary selenium affects methylation of the wobble nucleoside in the anticodon of selenocysteine tRNA([Ser]Sec). *J. Biol. Chem.*, 1993. 268(19): p. 14215-14223.
- [65] L. Flohé, E. Wingender and R. Brigelius-Flohé, The regulation of glutathione peroxidases. *In* *Oxidative Stress and Signal Transduction* (Forman, H. & Cadenas, E., eds), 1997. pp. 415-440. Chapman & Hall, New York.
- [66] M. E. Budiman, J. L. Bubenik, A. C. Miniard, L. M. Middleton, C. A. Gerber, A. Cash and D. M. Driscoll. Eukaryotic initiation factor 4a3 is a selenium-regulated RNA-binding protein that selectively inhibits selenocysteine incorporation. *Mol. Cell*, 2009. 35: p. 479-489.
- [67] A. M. Diamond, I. S. Choi, P. F. Crain, T. Hashizume, S. C. Pomerantz, R. Cruz, C. J. Steer, K. E. Hill, R. F. Burk, J. A. McCloskey and D. L. Hatfield. Dietary selenium affects methylation of the wobble nucleoside in the anticodon of selenocysteine tRNA([Ser]Sec). *J. Biol. Chem.*, 1993. 268: p. 14215-14223.
- [68] L. K. Kim, T. Matsufuji, S. Matsufuji, B. A. Carlson, S. S. Kim, D. L. Hatfield and B. J. Lee. Methylation of the ribosyl moiety at position 34 of selenocysteine tRNA[Ser]Sec is governed by both primary and tertiary structure. *RNA*, 2000. 6: p. 1306-1315.
- [69] M. Björnstedt, J. Xue, W. Huang, B. Akesson and A. Holmgren. The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.*, 1994. 269: p. 29382-29384.
- [70] M. Schneider, H. Förster, A. Boersma, A. Seiler, H. Wehnes, F. Sinowatz, C. Neumüller, M. J. Deutsch, A. Walch, M. Hrabé de Angelis, W. Wurst, F. Ursini, A. Roveri, M. Maleszewski, M. Maiorino and M. Conrad. Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *FASEB J.*, 2009. 23(9): p. 3233-3242.
- [71] L. J. Yant, Q. Ran, L. Rao, H. Van Remmen, T. Shibatani, J. G. Belter, L. Motta, A. Richardson and T. A. Prolla. The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic. Biol. Med.*, 2003. 34: p. 496-502.

- [72] L. Flohé, W. A. Günzler and H. H. Schock. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.*, 1973. 32(1): p. 132-134.
- [73] Y. S. Ho, J. L. Magnenat, R. T. Bronson, J. Cao, M. Gargano, M. Sugawara and C. D. Funk. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J. Biol. Chem.*, 1997. 272(26): p. 16644-16651.
- [74] W. H. Cheng, Y. S. Ho, B. A. Valentine, D. A. Ross, G. F. Jr. Combs and X. G. Lei. Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice. *J. Nutr.*, 1998. 128: p. 1070-1076
- [75] M. A. Nasr, M. J. Fedele, K. Esser and A. M. Diamond. GPx-1 modulates Akt and P70S6K phosphorylation and Gadd45 levels in MCF-7 cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004. 37(2): p. 187-195.
- [76] V. N. Gladyshev, V. M. Factor, F. Housseau and D. L. Hatfield. Contrasting patterns of regulation of the antioxidant selenoproteins, thioredoxin reductase, and glutathione peroxidase, in cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998. 251: p. 488-493.
- [77] K. Faucher, H. Rabinovitch-Chable, J. Cook-Moreau, G. Barrière, F. Sturtz and M. Rigaud. Overexpression of human GPX1 modifies Bax to Bcl-2 apoptotic ratio in human endothelial cells. *Mol. Cell Biochem.*, 2005. 277: p. 81-87.
- [78] T. He, M. J. Joyner and Z. S. Katusic. Aging decreases expression and activity of glutathione peroxidase-1 in human endothelial progenitor cells. *Microvas. Res.*, 2009. 78(3): p. 447-452.
- [79] J. P. McClung, C. A. Roneker, W. Mu, D. J. Lisk, P. Langlais, F. Liu and X. G. Lei. Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *PNAS*, 2004. 101(24): p. 8852-8857.
- [80] K. Wingler, C. Müller and R. Brigelius-Flohé. Stability of gastrointestinal glutathione peroxidase mRNA in selenium deficiency depends on its 3'UTR. *Biofactors*, 2001. 14(1-4): p. 43-50.
- [81] R. S. Esworthy, J. R. Mann, M. Sam and F. F. Chu. Low glutathione peroxidase activity in Gpx1 knockout mice protects jejunum crypts from gamma-irradiation damage. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2000. 279(2): p. G426-436.
- [82] J. Walshe, M. M. Serewko-Auret, N. Teakle, S. Cameron, K. Minto, L. Smith, P. C. Burcham, T. Russell, G. Strutton, A. Griffin, F. F. Chu, S. Esworthy, V. Reeve and N. A. Saunders. Inactivation of glutathione peroxidase activity contributes to UV-induced squamous cell carcinoma formation. *Cancer Res.*, 2007. 67(10): p. 4751-4758.
- [83] R. S. Esworthy, R. Aranda, M. G. Martín, J. H. Doroshov, S. W. Binder and F. F. Chu. Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2001. 281(3): p. G848-855.
- [84] R. S. Esworthy, L. Yang, P. H. Frankel and F. F. Chu. Epithelium-specific glutathione peroxidase, Gpx2, is involved in the prevention of intestinal inflammation in selenium-deficient mice. *J. Nutr.*, 2005. 135(4): p. 740-745.
- [85] A. Naiki-Ito, M. Asamoto, N. Hokaiwado, S. Takahashi, H. Yamashita, H. Tsuda, K. Ogawa and T. Shirai. Gpx2 is an overexpressed gene in rat breast cancers induced by three different chemical carcinogens. *Cancer Res.*, 2007. 67(23): p. 11353-11358.

- [86] M. M. Serewko, C. Popa, A. L. Dahler, L. Smith, G. M. Strutton, W. Coman, A. J. Dicker and N. A. Saunders. Alterations in gene expression and activity during squamous cell carcinoma development. *Cancer Res.*, 2002. 62(13): p. 3759-3765.
- [87] H. Mörk, M. Scheurlen, O. Al-Taie, A. Zierer, M. Kraus, K. Schöttker, F. Jakob and J. Köhrle. Glutathione peroxidase isoforms as part of the local antioxidative defense system in normal and Barrett's esophagus. *Int. J. Cancer*, 2003 Jun. 105(3): p. 300-304.
- [88] A. Banning, S. Deubel, D. Kluth, Z. Zhou and R. Brigelius-Flohé. The GI-GPx gene is a target for Nrf2. *Mol. Cell Biol.*, 2005. 25(12): p. 4914-4923.
- [89] A. Banning, A. Kipp, S. Schmitmeier, M. Löwinger, S. Florian, S. Krehl, S. Thalmann, R. Thierbach, P. Steinberg and R. Brigelius-Flohé. 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 Res.*, 2008. 68(23): p. 9746-9753.
- [90] A. M. Dittrich, H. A. Meyer, M. Krokowski, D. Quarcoo, B. Ahrens, S. M. Kube, M. Witzenrath, R. S. Esworthy, F. F. Chu and E. Hamelmann. Glutathione peroxidase-2 protects from allergen-induced airway inflammation in mice. *Eur. Respir. J.*, 2010. 35(5): p. 1148-1154.
- [91] A. P. Garrison, M. A. Helmrath and C. M. Dekaney. Intestinal Stem Cells. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2009. 49: p. 2-7.
- [92] C. S. Potten. The significance of spontaneous and induced apoptosis in the gastrointestinal tract of mice. *Cancer Metastasis Rev.*, 1992. 11: p. 179-195.
- [93] A. J. Watson and D. M. Pritchard. Lessons from genetically engineered animal models. VII. Apoptosis in intestinal epithelium: lessons from transgenic and knockout mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2000. 278(1): p. G1-5.
- [94] K. Fujimoto, R. D. Beauchamp and R. H. Whitehead. Identification and isolation of candidate human colonic clonogenic cells based on cell surface integrin expression. *Gastroenterology*, 2002. 123: p. 1941-1948.
- [95] N. Barker, J. H. van Es, J. Kuipers, P. Kujala, M. van den Born, M. Cozijnsen, A. Haegebarth, J. Korving, H. Begthel, P. J. Peters and H. Clevers. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, 2007. 449: p. 1003-1007.
- [96] L. G. Van der Flier, J. Sabates-Bellver, I. Oving, A. Haegebarth, M. De Palo, M. Anti, M. E. Van Gijn, S. Suijkerbuijk, M. Van de Wetering, G. Marra and H. Clevers. The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology*, 2007. 132: p. 628-632.
- [97] E. Battle, J. T. Henderson, H. Begthel, M. M. van den Born, E. Sancho, G. Huls, J. Meeldijk, J. Robertson, M. van de Wetering, T. Pawson and H. Clevers. β -Catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell*, 2002. 111: p. 251-263.
- [98] A. Gregorieff, D. Pinto, H. Begthel, O. Destrée, M. Kielman, H. Clevers. Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology*, 2005. 129: p. 626-638.

- [99] S. Schneider, H. Steinbeisser, R. M. Warga and P. Hausen. β -catenin translocation into nuclei demarcates the dorsalizing centers in frog and fish embryos. *Mech. Dev.*, 1996. 57: p. 191-198.
- [100] A. Kipp, A. Banning and R. Brigelius-Flohé. Activation of the glutathione peroxidase 2 (GPx2) promoter by beta-catenin. *Biol. Chem.*, 2007. 388(10): p. 1027-1033.
- [101] E. R. Fearon and B. Vogelstein. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990. 61: p. 759-767.
- [102] S. Segditsas and I. Tomlinson. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene*, 2006. 25(57): p. 7531-7537.
- [103] J. B. Spillane and M. A. Henderson. Cancer stem cells: a review. *J. Surg.*, 2007. 77: p. 464-468.
- [104] M. Al-Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison and M. F. Clarke. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *PNAS*, 2003. 100: p. 3983-3988.
- [105] R. Virchow. Die krankhaften Geschwülste, Dreissig Vorlesungen 1862-1863.
- [106] S. I. Grivennikov, F. R. Greten and M. Karin. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 2010. 140(6): p. 883-899.
- [107] T. S. Blackwell and J. W. Christman. The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1997. 17(1): p. 3-9.
- [108] H. F. Dvorak. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.*, 1986. 315: p. 1650-1669.
- [109] E. Shacter and S. A. Weitzman. Chronic Inflammation and cancer. *Oncology*, 2002. 16(2): p. 217-226.
- [110] S. P. Hussain, L. J. Hofseth and C. C. Harris. Radical causes of cancer. *Nature*, 2003. 276(3): p.276-285.
- [111] B. A. Jacobsen, J. Fallingborg, H. H. Rasmussen, K. R. Nielsen, A. M. Drewes, E. Puho, G. L. Nielsen and H. T. Sørensen. Increase in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in northern Denmark: a population-based study, 1978-2002. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2006. 18(6): p. 601-606.
- [112] www.dccv.de: Deutsche Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Vereinigung
- [113] P. Bansal and A. Sonnenberg. Risk factors of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.*, 1996. 107: p. 44-48.
- [114] A. Risser, D. Donovan, J. Heintzman and T. Page. NSAID prescribing precautions. *Am. Fam. Physician*, 2009. 80(12): p. 1371-1378.
- [115] K. D. Cashman and F. Shanahan. Is nutrition an aetiological factor for inflammatory bowel disease? *Europ. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2003. 15: p. 607-613.
- [116] R. J. Shamberger. Relationship of selenium to cancer. I. Inhibitory effect of selenium on carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1970. 44(4): p. 931-936.

- [117] J. Kubota, W. H. Allaway, D. L. Carter, E. E. Cary and V. A. Lazar. Selenium in crops in the United States in relation to selenium-responsive diseases of animals. *J. Agric. Food Chem.*, 1967. 15(3): p. 448-453.
- [118] W. H. Allaway, J. Kubota, F. Losee and M. Roth. Selenium, molybdenum, and vanadium in human blood. *Arch. Environ. Health*, 1968. 16(3): p. 342-348.
- [119] W. Q. Wei, C. C. Abnet, Y. L. Qiao, S. M. Dawsey, Z. W. Dong, X. D. Sun, J. H. Fan, E. W. Gunter, P. R. Taylor and S. D. Mark. Prospective study of serum selenium concentrations and esophageal and gastric cardia cancer, heart disease, stroke, and total death. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004. 79(1): p. 80-85.
- [120] L. C. Clark, G.F. Jr. Combs, B. W. Turnbull, E. H. Slate, D. K. Chalker, J. Chow, L. S. Davis, R. A. Glover, G. F. Graham, E. G. Gross, A. Krongrad, J. L. Jr. Leshner, H. K. Park, B. B. Jr. Sanders, C. L. Smith and J. R. Taylor. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *JAMA*, 1996. 276(24): p. 1957-1963.
- [121] S. M. Lippman, E. A. Klein, P. J. Goodman, M. S. Lucia, I. M. Thompson, L. G. Ford, H. L. Parnes, L. M. Minasian, J. M. Gaziano, J. A. Hartline, J. K. Parsons, J. D. 3rd Bearden, E. D. Crawford, G. E. Goodman, J. Claudio, E. Winkquist, E. D. Cook, D. D. Karp, P. Walther, M. M. Lieber, A. R. Kristal, A. K. Darke, K. B. Arnold, P. A. Ganz, R. M. Santella, D. Albanes, P. R. Taylor, J. L. Probstfield, T. J. Jagpal, J. J. Crowley, F. L. Jr. Meyskens, L. H. Baker and C. A. Jr. Coltman. Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA*, 2009. 301(1): p. 39-51.
- [122] <http://www.thinkwell.eu/userfiles/Selenium+BrochureOct04.pdf>
- [123] L. Kiremidjian-Schuhmacher, M. Roy, R. Glickman, K. Schneider, S. Rothstein, J. Cooper, H. Hochster, M. Kim and R. Newman. Selenium and immunocompetence in patients with head and neck cancer. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2000. 73(2): p. 97-111.
- [124] Phase III Study of the Effects of Selenium on Adenomatous Polyp Recurrence, Prof. M.P. Lance, National Cancer Institute, NCT00078897
- [125] C. C. Clayton and C. A. Baumann. Diet and azo dye tumors; effect of diet during a period when the dye is not fed. *Cancer Res.*, 1949. 9(10): p. 575-582.
- [126] M. M. Jacobs, B. Jansson and A. C. Griffin. Inhibitory effects of selenium on 1,2-Dimethylhydrazine and Methylazoxynethanol acetate induction of colon tumors. *Cancer Lett.*, 1977. 2: p. 133-138.
- [127] A. Goel, F. Fuerst, E. Hotchkiss and C. R. Boland. Selenomethionine induces p53 mediated cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Cancer Biol. Ther.*, 2006. 5(5): p. 529-535.
- [128] Y. Dong, H. Zhang, L. Hawthorn, H. E. Ganther and C. Ip. Delineation of the molecular basis for selenium-induced growth arrest in human prostate cancer cells by oligonucleotide array. *Cancer Res.*, 2003. 60: p. 52-59.
- [129] W. Zhang, S. Yan, M. Liu, G. Zhang, S. Yang, S. He, J. Bai, L. Quan, H. Zhu, Y. Dong and N. Xu. β -catenin/TCF pathway plays a vital role in selenium induced-growth inhibition and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells. *Cancer Lett.*, 2010. p. 1-10.

- [130] C. Méplan, D. J. Hughes, B. Pardini, A. Naccarati, P. Soucek, L. Vodickova, I. Hlavatá, D. Vrána, P. Vodicka and J. E. Hesketh. Genetic variants in selenoprotein genes increase risk of colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 2010. 31(6): p. 1074-1079.
- [131] H. Vunta, B. J. Belda, R. J. Arner, C. Channa Reddy, J. P. Vanden Heuvel and K. Sandeep Prabhu. Selenium attenuates pro-inflammatory gene expression in macrophages. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2008. 52: p. 1316-1323.
- [132] B. A. Carlson, M. H. Yoo, Y. Sano, A. Sengupta, J. Y. Kim, R. Irons, V. N. Gladyshev, D. L. Hatfield and J. M. Park. Selenoproteins regulate macrophage invasiveness and extracellular matrix-related gene expression. *BMC Immunol.*, 2009. 10: p. 57.
- [133] M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976. 72: p. 248-254.
- [134] T. M. Sheehan and M. Gao. Simplified fluorometric assay of total selenium in plasma and urine. *Clin. Chem.*, 1990. 36(12): p. 2124-2126.
- [135] L. Schomburg, U. Schweizer, B. Holtmann, L. Flohé, M. Sendtner and J. Köhrle. Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *Biochem. J.*, 2003. 370(Pt 2): p. 397-402.
- [136] P. G. Falk, L. V. Hooper, T. Midtvedt and J. I. Gordon. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1998. 62: p. 1157-1170.
- [137] D. C. Savage, R. Dubos and R. W. Schaedler. The gastrointestinal epithelium and its autochthonous bacterial flora. *J. Exp. Med.*, 1968. 127: p. 67-76.
- [138] B. Deplancke and H. R. Gaskins. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2001. 73(6): p. 1131S-1141.
- [139] R. S. Esworthy, S. W. Binder, J. H. Doroshov and F. F. Chu. Microflora trigger colitis in mice deficient in selenium-dependent glutathione peroxidase and induce *Gpx2* gene expression. *Biol. Chem.*, 2003. 384: p. 597-607.
- [140] K. L. Madsen, D. Malfair, D. Gray, J. S. Doyle, L. D. Jewell and R. N. Fedorak. Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflamm. Bowel. Dis.*, 1999. 5: p. 262-270.
- [141] M. V. Tejada-Simon, Z. Ustunol and J. J. Pestka. *Ex vivo* effects of lactobacilli, streptococci and bifidobacteria ingestion on cytokine and nitric oxide production in a murine model. *J. Food Prot.*, 1999. 62: p. 162-169.
- [142] K. M. Lammers, U. Helwig, E. Swennen, F. Rizzello, A. Venturi, E. Caramelli, M. A. Kamm, P. Brigidi, P. Gionchetti and M. Campieri. Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells. *Am. J. Gastroenterol.*, 2002. 97: p. 1182-1186.
- [143] J. D. Taurog, J. A. Richardson, J. T. Croft, W. A. Simmons, M. Zhou, J. L. Fernández-Sueiro, E. Balish and R. E. Hammer. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J. Exp. Med.*, 1994. 180: p. 2359-2364.

- [144] L. Dianda, A. M. Hanby, N. A. Wright, A. Sebesteny, A. C. Hayday and M. J. Owen. T cell receptor- α β -deficient mice fail to develop colitis in the absence of a microbial environment. *Am. J. Pathol.*, 1997. 150: p. 91-97.
- [145] R. K. Sellon, S. Tonkonogy, M. Schultz, L. A. Dieleman, W. Grenther, E. Balish, D. M. Rennick and R. B. Sartor. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect. Immun.*, 1998. 66: p. 5224-5231.
- [146] A. Kipp, A. Banning, E. M. van Schothorst, C. Méplan, L. Schomburg, C. Evelo, S. Coort, S. Gaj, J. Keijer, J. Hesketh and R. Brigelius-Flohé. Four selenoproteins, protein biosynthesis, and Wnt signalling are particularly sensitive to limited selenium intake in mouse colon. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2009. 53(12): p. 1561-1572.
- [147] D. Behne, D. Alber and A. Kyriakopoulos. Long-term selenium supplementation of humans: selenium status and relationships between selenium concentrations in skeletal muscle and indicator materials. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2010. 24(2): p. 99-105.
- [148] R. Hokari, N. Nagata, C. Kurihara, C. Watanabe, S. Komoto, Y. Okada, A. Kawaguchi, S. Nagao, T. Hibi, K. Nagata, Y. Urade and S. Miura. Increased expression and cellular localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase in *Helicobacter pylori*-induced gastritis. *J. Pathol.*, 2009. 219(4): p. 417-426.
- [149] W. Yan and X. Chen. GPX2, a direct target of p63, inhibits oxidative stress-induced apoptosis in a p53-dependent manner. *J. Biol. Chem.*, 2006. 281(12): p. 7856-7862.
- [150] G. Bermano, J. R. Arthur and J. E. Hesketh. Role of the 3' untranslated region in the regulation of cytosolic glutathione peroxidase and phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase gene expression by selenium supply. *Biochem. J.*, 1996. 320(3): p. 891-895.
- [151] R. Brigelius-Flohé. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999. 27(9-10): p. 951-965.
- [152] X. G. Lei and W. H. Cheng. New roles for an old selenoenzyme: evidence from glutathione peroxidase-1 null and overexpressing mice. *J. Nutr.*, 2005. 135(10): p. 2295-2298
- [153] S. Roy, S. K. Dontamalla, A. K. Mondru, S. Sannigrahi and P. R. Veerareddy. Downregulation of Apoptosis and Modulation of TGF- β 1 by Sodium Selenate Prevents Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Renal Impairment. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2010. [Epub ahead of print]
- [154] W. Zhang, S. Yan, M. Liu, G. Zhang, S. Yang, S. He, J. Bai, L. Quan, H. Zhu, Y. Dong and N. Xu. Beta-Catenin/TCF pathway plays a vital role in selenium induced-growth inhibition and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells. *Cancer Lett.*, 2010. [Epub ahead of print]
- [155] A. J. Merrit, C. S. Potten, A. J. Watson, D. Y. Loh, K. Nakayama, K. Nakayama and J. A. Hickman. Differential expression of bcl-2 in intestinal epithelia: Correlation with attenuation of apoptosis in colonic crypts and the incidence of colonic neoplasia. *J. Cell Science*, 1995. 108: p. 2261-2277.

- [156] C. H. Tsai, M. Hill, S. L. Asa, P. L. Brubaker and D. J. Drucker. Intestinal growth-promoting properties of glucagon-like peptide-2 in mice. *Am. J. Physiol.*, 1997. 273: p. E77-E84.
- [157] I. Okayasu, S. Hatakeyama, M. Yamada, T. Ohkusa, Y. Inagaki and R. Nakaya. Novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, 1990. 98: p. 694-702.
- [158] T. Tanaka, H. Kohno, R. Suzuki, Y. Yamada, S. Sugie and H. Mori. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci.*, 2003. 94(11): p. 965-973.
- [159] H. A. Arnett and J. L. Viney. Gatekeepers of intestinal inflammation. *Inflamm. Res.*, 2010. 59(1): p. 1-14.
- [160] J. D. Schulzke, C. Bojarski, S. Zeissig, F. Heller, A. H. Gitter and M. Fromm. Disrupted barrier function through epithelial cell apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2006. 1072: p. 288-299.
- [161] J. D. Schulzke, S. Ploeger, M. Amasheh, A. Fromm, S. Zeissig, H. Troeger, J. Richter, C. Bojarski, M. Schumann and M. Fromm. Epithelial tight junctions in intestinal inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2009. 1165: p. 294-300.
- [162] R. Hansen, J. M. Thomson, E. M. El-Omar and G. L. Hold. The role of infection in the aetiology of inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.*, 2010. 45(3): p. 266-276.
- [163] S. Shilo, M. Aharoni-Simon and O. Tirosh. Selenium attenuates expression of MnSOD and uncoupling protein 2 in J774.2 macrophages: molecular mechanism for its cell-death and antiinflammatory activity. *Antioxid. Redox Signal.*, 2005. 7(1-2): p. 276-286.
- [164] A. Banning, S. Florian, S. Deubel, S. Thalmann, K. Müller-Schmehl, G. Jacobasch and R. Brigelius-Flohé. GPx2 counteracts PGE2 production by dampening COX-2 and mPGES-1 expression in human colon cancer cells. *Antioxid. Redox Signal.*, 2008. 10(9): p. 1491-1500.
- [165] S. Zeissig, C. Bojarski, N. Buergel, J. Mankertz, M. Zeitz, M. Fromm and J. D. Schulzke. Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumour necrosis factor- α antibody treatment. *Gut*, 2004. 53: p. 1295-1302.
- [166] S. M. Wilhelm, K. A. McKenney, K. N. Rivait and P. B. Kale-Pradhan. A review of infliximab use in ulcerative colitis. *Clin. Ther.*, 2008. 30(2): p. 223-230.
- [167] W. Strober, I. J. Fuss and R. S. Blumberg. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu. Rev. Immunol.*, 2002. 20: p. 495-549.
- [168] H. Y. Won, J. H. Sohn, H. J. Min, K. Lee, H. A. Woo, Y. S. Ho, J. W. Park, S. G. Rhee and E. S. Hwang. Glutathione peroxidase 1 deficiency attenuates allergen-induced airway inflammation by suppressing Th2 and Th17 Cell development. *Antioxid. Redox Signal.*, 2010. 13(5): p. 575-587.
- [169] C. D. Gillen, R. S. Walmsley, P. Prior, H. A. Andrews and R. N. Allan. Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut*, 1994. 35: p. 1590-1592.

- [170] A. Ekblom, C. Helmick, M. Zack and H. O. Adami. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N. Engl. J. Med.*, 1990. 323: p. 1228-1233.
- [171] T. P. Pretlow, M. A. O'Riordan, T. G. Pretlow and T. A. Stellato. Aberrant crypts in human colonic mucosa: putative preneoplastic lesions. *J. Cell Biochem. Suppl.*, 1992. 16G: p. 55-62.
- [172] L. Roncucci, D. Stamp, A. Medline, J. B. Cullen and W. R. Bruce. Identification and qualification of aberrant crypt foci and adenoma in the human colon. *Hum. Pathol.*, 1991. 22: p. 287-294.
- [173] G. Caderni, A. P. Femia, A. Giannini, A. Favuzza, C. Luceri, M. Salvadori, P. Dolara. Identification of mucin-depleted foci in the unsectioned colon of azoxymethanetreated rats: correlation with carcinogenesis. *Cancer Res.*, 2003. 63: p. 2388-2392.
- [174] J. W. Carter, H. K. Lancaster, W. E. Hardman and I. L. Cameron. Distribution of intestine-associated lymphoid tissue, aberrant crypt foci, and tumors in the large bowel of 1, 2-dimethylhydrazine-treated mice. *Cancer Res.*, 1994. 54: p. 4304-4307.
- [175] Y. Zheng, P. M. Kramer, R. A. Lubet, V. E. Steele, G. J. Kelloff and M. A. Pereira. Effect of retinoids on AOM-induced colon cancer in rats: modulation of cell proliferation, apoptosis and aberrant crypt foci. *Carcinogenesis*, 1999. 20(2): p. 255-260.
- [176] J. Gromadzińska, E. Reszka, K. Bruzelius, W. Wasowicz and B. Akesson. Selenium and cancer: biomarkers of selenium status and molecular action of selenium supplements. *Eur. J. Nutr.*, 2008. 47(Suppl. 2): p. 29-50.
- [177] M. P. Raymann. Selenoproteins and human health: insights from epidemiological data. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009. 1790(11): p. 1533-1540.
- [178] R. Brigelius-Flohé and A. Kipp. Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009. 1790(11): p. 1555-1568.
- [179] D. Bockelmann. Klinik und Prognose der Kolon- und Rektum-Karzinome. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 1972. 97: p. 1590.

7. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Regina Brigelius-Flohé für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, die stets gewährte Hilfe, Unterstützung und Diskussionsanregung.

Allen Gutachtern bin ich für ihre Bereitschaft zur Übernahme der Gutachtertätigkeit dankbar.

Prof. Dr. Henning Läuter und Prof. Dr. Hannelore Liero danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Ich danke ALLEN ehemaligen und jetzigen Mitarbeiter/-innen der Abteilung „Biochemie der Mikronährstoffe“ des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung für jegliche Hilfestellungen sowie für das sehr angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima. Ich habe sehr gerne mit euch zusammen gearbeitet!

Ich danke den technischen Mitarbeiter/-innen Elvira Krohn, Jörg-Uwe Bittner, aber ganz besonders danke ich Stefanie Deubel für die stetige Hilfe und für die Unterstützung bei den Tier-OPs! Danke für deine ansteckende gute Laune! Bei meiner ehemaligen Betreuerin Antje Banning bedanke ich mich für die hervorragende Einarbeitung in das Thema und in die Versuchstierplanung. Ohne deine Unterstützung hätten wir das nie geschafft! Mein besonderer Dank gilt meiner Mitsstreiterin Maria Löwinger. Es war ein langer Weg mit vielen Bergen - aber wir haben es geschafft! Danke für deine Zuverlässigkeit! Sandra Nell danke ich für die Aufmunterungen und die guten Ratschläge! Anna Kipp danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft sowie für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Besonders danke ich Simone Florian für die Hilfe und Unterstützung beim Mikroskopieren, für ihr immer offenes Ohr und ihre Anregungen.

Für die Betreuung der Mausversuche möchte ich mich beim gesamten MRL-Team und ganz besonders bei Swetlana König, Astrid Wagner-Hopf, Elke Thom und Elisabeth Meyer bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an meine Freunde, meine Familie und meinen Freund Dirk für die permanente Aufmunterung in schwierigen Phasen. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt!

YOU'LL NEVER WALK ALONE!

FRANK SINATRA
