

Deutsches Institut für Ernährungsforschung
Abteilung "Biochemie der Mikronährstoffe"

Sulforaphan und Selen

Einfluss auf Phase II Enzyme und Selenoproteine
sowie deren Effekt auf die entzündungsvermittelte
Dickdarmkanzerogenese

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin „Biochemie der Ernährung“

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Potsdam

von

MARIA LÖWINGER

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/>

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2011/5186/>
URN [urn:nbn:de:kobv:517-opus-51862](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-51862)
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-51862>

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 SULFORAPHAN (SFN).....	1
1.1.1 Vorkommen und Freisetzung aus Glucosinolaten.....	1
1.1.2 Aufnahme und Verteilung.....	2
1.1.3 Funktionen von SFN.....	2
1.1.4 Nrf2/Keap1 und die Induktion von Phase II Enzymen	4
1.1.4.1 NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase (NQO1)	5
1.1.4.2 Glutathion-S-Transferase (GST).....	6
1.2 SELEN (SE).....	7
1.2.1 Bedeutung und chemische Eigenschaften.....	7
1.2.2 Funktionen von Selenoproteinen	8
1.2.3 Biosynthese von Selenoproteinen	10
1.2.4 Regulation der Selenoproteinexpression durch Se	10
1.2.5 Glutathionperoxidasen (GPx)	12
1.2.5.1 Glutathionperoxidase 1 (GPx1)	12
1.2.5.2 Glutathionperoxidase 2 (GPx2)	13
1.2.6 Thioredoxinreduktasen (TrxR)	14
1.3 WECHSELWIRKUNG ZWISCHEN SFN UND SE.....	15
1.4 CHRONISCH ENTZÜNDLICHE DARMERKRANKUNGEN UND KANZEROGENESE DES COLON.....	16
1.4.1 Physiologie des Colon	16
1.4.2 Entzündungsvermittelte Colonkanzerogenese	16
1.5 ZIEL DER ARBEIT	19
2 METHODEN.....	20
2.1 <i>IN VITRO</i> UNTERSUCHUNGEN	20
2.1.1 Zellkultur	20
2.1.2 MTT-Test	20
2.1.3 Reportergenanalyse.....	21
2.1.3.1 Transiente Transfektion	21
2.1.3.2 Luziferase Messung.....	22
2.1.3.3 β -Galaktosidase-Messung.....	22
2.2 TIEREXPERIMENTELLE STUDIEN	22
2.2.1 Pilotversuch	23
2.2.1.1 Diät	23
2.2.1.2 Tiere und Versuchsablauf.....	23
2.2.2 Entzündungsverstärkte Colonkanzerogenese durch Applikation von AOM/DSS	24
2.2.2.1 Diät	24
2.2.2.2 Tiere und Versuchsablauf.....	24
2.2.2.3 Genotypisierung.....	26
2.3 BESTIMMUNG DES SELENGEHALTES IN ORGANISCHEM MATERIAL.....	27
2.4 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	28

2.4.1	Herstellung von Extrakten	28
2.4.1.1	Organaufarbeitung / Herstellung von Organlysaten	28
2.4.1.2	Herstellung von Zelllysat.....	28
2.4.1.3	Gewinnung von Kernextrakten.....	28
2.4.2	Proteinbestimmung nach Bradford	29
2.4.3	Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	29
2.4.3.1	NQO1-Aktivität	30
2.4.3.2	TrxR-Aktivität	30
2.4.3.3	GPx-Aktivität.....	31
2.4.3.4	GST-Aktivität.....	31
2.4.4	SDS PAGE und Western Blot	31
2.5	HISTOLOGIE UND IMMUNHISTOCHEMIE	33
2.5.1	H&E-Färbung	34
2.5.2	Immunhistochemie	34
2.5.3	Auswertung der immunhistochemischen Färbung.....	35
2.5.4	Erfassung des Entzündungsscores	36
2.5.5	Quantifizierung von Apoptosen und Mitosen.....	37
2.5.6	Erfassung von Tumoren und ACF	38
2.6	STATISTIK.....	39
3	ERGEBNISSE.....	40
3.1	ERMITTLUNG DER OPTIMALEN SFN-KONZENTRATION UND -FORM <i>IN VITRO</i>	40
3.1.1	Die nukleäre Translokation von Nrf2 ist abhängig von der Form und Konzentration von SFN	40
3.1.2	Die NQO1-Aktivität korreliert mit der SFN-induzierten Nrf2 Translokation	41
3.1.3	Die Aktivierung des GPx2 Promotors durch SFN und hydrolysiertes GRA ist vergleichbar	42
3.2	DIE EFFEKTE VON SYNTHETISCHEM SFN UND HYDROLYSIERTEM GRA AUF TYPISCHE PHASE II ENZYME UND SELENOPROTEINE SIND AUCH <i>IN VIVO</i> VERGLEICHBAR	42
3.3	WECHSELWIRKUNGEN VON SFN UND SE IM AOM/DSS-MODELL	44
3.3.1	Einstellung des Selenstatus im Plasma	44
3.3.2	SFN und Se haben keinen Einfluss auf den Gewichtsverlauf der Mäuse.....	45
3.3.3	Effekte von SFN und Se auf Phase II Enzyme und Selenoproteine unter physiologischen Bedingungen	46
3.3.3.1	NQO1.....	46
3.3.3.1.1	Aktivität	46
3.3.3.1.2	Proteinexpression von NQO1 im Ileum und Colon.....	48
3.3.3.2	TrxR.....	50
3.3.3.2.1	Aktivität	50
3.3.3.3	GPx	50
3.3.3.3.1	Gesamtaktivität.....	50
3.3.3.3.2	Proteinexpression von GPx1 und GPx2 im Ileum und Colon	51
3.3.3.4	GST.....	55
3.3.3.4.1	Gesamtaktivität	55
3.3.4	Einfluss der Entzündung auf cytoprotektive Enzyme.....	55
3.3.5	Die Auswirkung der Abwesenheit von GPx2 auf die Enzyme	56
3.3.6	Einfluss von SFN und Se auf die Zellproliferation im Colon.....	56
3.3.7	SFN moduliert den Verlauf der Entzündung selenabhängig.....	59
3.3.7.1	Gewichtsverlauf während der „akuten“ Versuchsphase.....	60
3.3.7.2	Entzündungsscore	61
3.3.8	Einfluss von SFN und Se auf die Bildung von ACF und Tumoren im Colon	66

4	DISKUSSION.....	69
4.1	SYNTHETISCHES SFN UND HYDROLYSIERTES GRA SIND IN IHRER EFFEKTIVITÄT AUF DIE NRF2-VERMITTELTE SIGNALTRANSDUKTION VERGLEICHBAR	69
4.2	EFFEKTE VON SFN SIND VON DER BEHANDLUNGSDAUER ABHÄNGIG	70
4.3	WECHSELWIRKUNGEN VON SFN UND SE AUF NRF2-REGULIERTE ENZYME	72
4.3.1	Physiologische Bedingungen	72
4.3.2	Einfluss der Entzündung	75
4.3.3	Kompensatorische Effekte	76
4.4	SFN UND SE BEEINFLUSSEN DIE APOPTOSE IM GESUNDEN COLONGEWEBE	77
4.5	SFN BEEINFLUSST DIE DSS-INDUZIERT E ENTZÜNDUNG ABHÄNGIG VOM SELENSTATUS	80
4.6	SFN BLOCKIERT DIE INITIATION DER COLONKANZEROGENESE IN ABHÄNGIGKEIT VON SE	85
4.7	AUSBLICK	93
5	ZUSAMMENFASSUNG	95
6	LITERATURVERZEICHNIS	97
	DANKSAGUNG	122
	ERKLÄRUNG	123

Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid/Bisacrylamid
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
ACF	<i>aberrant crypt foci</i>
AOM	Azoxymethan
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE	<i>antioxidant response element</i>
B6	C57/B6J
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CBB	Coomassie-Brilliant-Blue
CDNB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzol
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
COX	Cyclooxygenase
CYP	Cytochrom P450 abhängige Monooxygenase
DAB	Diaminobenzidin
DAN	2,3-Diaminonaphthalen
DCC	<i>deleted in colorectal carcinoma</i>
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
Dife	Deutsches Institut für Ernährungsforschung
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNP-S	Dinitrophenyl-S-Konjugat
DSS	Natrium-Dextransulfat
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
E2	Ubiquitin-conjugated enzyme
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
em	Emission
ex	Excitation
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	<i>fetal calve serum</i> (Fötales Kälberserum)
GIT	Gastrointestinaltrakt
GPx	Glutathionperoxidase
GRA	Glucoraphanin
GSH	Glutathion

GSSG	Glutathiondisulfid
GST	Glutathion-S-Transferase
H&E	Hämatoxylin&Eosin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
ITC	Isothiocyanat
IVC	<i>individual ventilation cage</i>
Jejunum d	distales Jejunum
Jejunum p	proximales Jejunum
kDa	Kilodalton
keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein-1</i>
KF	Kernfärbung
Ki-67	Proliferationsassoziiertes Antigen
KO	<i>knockout</i>
KP _i	Kaliumphosphatpuffer
KV	Kryptenviertel
MC	Morbus Crohn
MRP	<i>multidrug resistance protein</i>
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
MWV	Mikrowellen-Vorbehandlung
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)H	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat)
NF-κB	Nukleärer Faktor-κB
Nrf2	<i>NF-E2 related factor-2</i>
NQO1	NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase 1
OD	optische Dichte
ONPG	O-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid
p53	Tumorsuppressorprotein
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCOOH	Phosphatidylcholinhydroperoxid
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PM	Plasmamembran
POD	Meerrettich-Peroxidase
RDA	<i>recommended daily allowance</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur

SBP2	SECIS-bindendes Protein-2
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SECIS	<i>selenocysteine inserting sequence</i>
Se	Selen
Se-Cys	Selenocystein
Se-Met	Selenomethionin
SFN	Sulforaphan
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SPF	<i>specific pathogen free</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid
TGA	Thymin-Guanin-Adenin, Se-Cys codierendes Basentriplett
TNB	5'-Thionitrobenzoesäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer-RNA
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxinreduktase
TTBS	Tween-TBS
ü.N.	über Nacht
UC	Ulcerative Colitis
UTR	untranslatierte Region
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Versuchsablauf zur Untersuchung der entzündungsverstärkten Colonkanzerogenese	25
Abb. 2: <i>Colon swiss role</i> und Colonkrypte	36
Abb. 3: Apoptotische und mitotische Zellen im distalen Colon	38
Abb. 4: ACF im Colon	38
Abb. 5: Adenome im distalen Colon	39
Abb. 6: Translokation von Nrf2 in den Kern	41
Abb. 7: NQO1-Aktivität	41
Abb. 8: Transaktivierung des GPx2-Promotors	42
Abb. 9: Selengehalte im Plasma in Abhängigkeit von Se und SFN	45
Abb. 10: Gewichtsverlauf von GPx2 ^{+/+} Mäusen in Abhängigkeit vom Selenstatus und der SFN-Behandlung	45
Abb. 11: Basale NQO1 Aktivität in der Leber und entlang des GIT in Abhängigkeit vom Selenstatus	47
Abb. 12: NQO1-Aktivität in der Leber und entlang des GIT in Abhängigkeit von SFN und Se	47
Abb. 13: NQO1-Proteinexpression im Ileum und Colon	48
Abb. 14: Verteilung der NQO1-Expression im Verlauf des Colon und innerhalb der Krypten ..	49
Abb. 15: TrxR-Aktivität in der Leber und entlang des GIT in Abhängigkeit von SFN und Se ..	50
Abb. 16: GPx-Aktivität in der Leber und entlang des GIT in Abhängigkeit von SFN und Se ..	51
Abb. 17: GPx1- und GPx2-Proteinexpression im Ileum und Colon	52
Abb. 18: Verteilung der GPx1-Expression im Verlauf des Colon und innerhalb der Krypten ...	53
Abb. 19: Verteilung der GPx2-Expression im Verlauf des Colon und innerhalb der Krypten ...	54
Abb. 20: GST-Aktivität in der Leber und entlang des GIT in Abhängigkeit von SFN und Se ...	55
Abb. 21: Anzahl Mitosen in GPx2 ^{+/+} Tieren in Abhängigkeit von SFN und Se	57
Abb. 22: Anzahl Apoptosen in GPx2 ^{+/+} Tieren in Abhängigkeit von SFN und Se	58
Abb. 23: Apoptoserate im 4. Kryptenviertel in Abhängigkeit vom Genotyp, Selenstatus und SFN-Behandlung	59
Abb. 24: Körpergewichtsentwicklung der Mäuse in der akuten Versuchsphase	61
Abb. 25: Schweregrad der Entzündung	62
Abb. 26: Entzündungsscore in Abhängigkeit des Selenstatus, des Genotyps und SFN- bzw. AOM/DSS-Behandlung	63
Abb. 27: Schweregrad der Entzündung im Langzeitversuch in Abhängigkeit von SFN und Se sowie dem Genotyp	65
Abb. 28: Tumoranzahl in Abhängigkeit vom Se und SFN sowie dem Genotyp	68

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Humane Selenoproteine und ihre Funktionen.....	9
Tab. 2:	PCR-Ansatz zur Genotypisierung.....	26
Tab. 3:	Endprodukt der Enzymaktivitätsmessung und entsprechender molarer Extinktionsfaktor	29
Tab. 4:	Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel.....	32
Tab. 5:	Entwässerung	33
Tab. 6:	Rehydrieren und Dehydrieren der Schnitte.....	34
Tab. 7:	Im Western Blot (WB) und in der Histologie verwendete Antikörper.....	35
Tab. 8:	Histologischer Entzündungsscore.....	37
Tab. 9:	Vergleich der Induktion entsprechender Parameter in ausgewählten Organen durch hydrolysiertes GRA und synthetisches SFN	43
Tab. 10:	Inzidenz und Anzahl der ACF in Abhängigkeit von Se und SFN sowie dem Genotyp.....	66
Tab. 11:	Tumorinzidenz und -größe in Abhängigkeit vom SFN und Se sowie dem Genotyp...	67

1 Einleitung

1.1 Sulforaphan (SFN)

1.1.1 Vorkommen und Freisetzung aus Glucosinolaten

Der Verzehr von Obst und Gemüse steht in positivem Zusammenhang mit einer gesunden Ernährung und beugt der Entstehung verschiedener Krankheiten vor [1]. Dies liegt besonders an den enthaltenen Vitaminen und Mineralstoffen, Antioxidantien, Ballaststoffen und einer Vielzahl an sekundären Pflanzenstoffen. Die Zufuhr von Gemüse der Gattung *Brassica oleracea*, welcher Sorten wie Rosenkohl, Brokkoli, Blumenkohl, Pakchoi und Kohlrabi angehören, korreliert invers mit dem Risiko für verschiedene Krebsarten, speziell im Atmungs- und Verdauungstrakt [2]. Die genannten Gemüse sind reich an Glucosinolaten. Diese chemisch stabilen, schwefelhaltigen sekundären Pflanzenstoffe sind Vorstufen von aktiven Metaboliten, die durch Hydrolyse entstehen. Mechanisches Einwirken, wie Kauen oder Schneiden des Gemüses, bewirkt eine Zerstörung der pflanzlichen Zellen, wodurch das Enzym β -Thioglucosidase (Myrosinase, EC 3.2.3.1.) aus separaten Zellkompartimenten freigesetzt wird. Abhängig von den Reaktionsbedingungen und der Struktur des Aglykons entstehen nach Abspaltung des Zuckerrestes im Weiteren Isothiocyanate (ITC) bzw. Indole. Nitrile und Thiocyanate werden unter anderem bei niedrigen Temperaturen und saurem pH gebildet [3]. Die Spaltprodukte sind verantwortlich für die antioxidativen, antimikrobiellen, immunmodulatorischen sowie antikanzerogenen Effekte von Kohlgemüsearten und tragen zum Schutz der Pflanze vor Fraß und Pathogenen bei [4]. Das aliphatische ITC Sulforaphan (4-Methylsulfinylbutylisothiocyanat, SFN), ist eine der biologisch aktivsten und am besten untersuchten sekundären Pflanzenstoffe des Brokkoli und kommt natürlicherweise als das Vorläufer-Glucosinolat Glucoraphanin (GRA) vor. Vor allem in Brokkolisprossen ist GRA in großen Mengen zu finden [4]. SFN stellt eines der vielversprechendsten natürlichen Chemopräventiva dar [5].

1.1.2 Aufnahme und Verteilung

Der GRA-Gehalt in Brokkoli kann, abhängig von Sorte, Wachstumsbedingungen, Lagerung und Jahreszeit, stark divergieren (15-30 $\mu\text{mol/g}$ Trockengewicht). Die tägliche Glucosinolat-aufnahme in Deutschland beträgt durchschnittlich zwischen 13 und 16 mg, etwa 10% davon entsprechen GRA [6]. SFN ist im Gegensatz zu GRA relativ hydrophob, weswegen es im Darm eine hohe Bioverfügbarkeit besitzt. Nach Zufuhr erfolgt eine schnelle Absorption im oberen Gastrointestinaltrakt (GIT) durch passive Diffusion [7], 1-2 Stunden danach sind die höchsten Konzentrationen im Blut vorzufinden [8]. Bei Inaktivierung der Myrosinase, z.B. durch hohe Temperaturen oder ungünstige pH-Wert-Bedingungen, und fehlendem Abbau gelangt GRA unverändert in das Colon, wo es durch die Myrosinase der Mikrobiota gespalten wird. Dort direkt freigesetzt, kann SFN lokal wirken [9]. Absorbiertes SFN wird durch Glutathion-S-Transferasen (GST) mit GSH zu Dithiocarbamat konjugiert, eine rasche intrazelluläre Akkumulation ist möglich [10]. Der Polymorphismus der GST besitzt großen Einfluss auf den Metabolismus, die Bioverfügbarkeit und letztendlich die Effekte von SFN im Körper. SFN ist fähig, seinen eigenen Metabolismus über die Induktion von GST zu regulieren. Mit Hilfe von Transportern wird dieses Konjugat entweder basal über das *multidrug-resistance associated protein* (MRP)-1 der systemischen Blutzirkulation zugeführt oder über das P-glycoprotein-1 (Pgp-1) zurück ins Darmlumen transportiert [11]. Die Verteilung im Körper als Protein-gebundenes Dithiocarbamat oder in geringen Mengen als freies SFN geschieht schnell [8], eine Rezirkulation im enterohepatischen Kreislauf ist möglich [12]. Der Abbau zum N-Acetyl-S-Cysteinderivat (Mercaptursäure) erfolgt vorwiegend in der Niere, und ist 2-4 Stunden nach Verzehr von SFN im Urin nachweisbar [13]. 72 Stunden nach der Zufuhr von SFN sind sämtliche Metabolite eliminiert [8].

1.1.3 Funktionen von SFN

Antikanzerogene Effekte von SFN lassen sich hauptsächlich auf die Fähigkeit zurückführen, die Biotransformation von Fremdstoffen zu beeinflussen, was sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt wurde [14]. Enzyme der Phase I und II des Fremdstoffmetabolismus beeinflussen mit ihrer Aktivität die Metabolisierung von potentiell kanzerogenen bzw. mutagenen Substanzen und führen zunächst zur Bildung elektrophiler Zwischen-

stufen (metabolische Aktivierung in Phase I) bzw. verhindern diese (Deaktivierung in Phase II). Verschiedene Phase I Enzyme werden durch SFN gehemmt [15, 16], hingegen wird die Expression mehrerer Phase II Enzyme stark induziert [4, 17]. Auch die Ausscheidung von Fremdstoffen kann infolge einer Induktion von Transportproteinen durch SFN beeinflusst werden [18, 19].

Die Hemmung der Zellproliferation sowie ein Einfluss auf den Zellzyklus und die Apoptose konnte in verschiedenen Krebszelllinien gezeigt werden [20-22]. Eine konzentrationsabhängige Modulierung des MAPK-Effektors Activator Protein-1 (AP-1) durch SFN beeinflusst direkt die HT-29 Zellviabilität. Geringe Konzentrationen an SFN aktivieren AP-1 und damit die Zellproliferation, im Gegensatz dazu hemmen hohe Konzentrationen diesen Prozess [23]. Abhängig vom Zellsystem, der Dauer und Konzentration der SFN-Behandlung [24, 25] werden verschiedene Cycline, Checkpoint Kinasen und Phosphatasen beeinflusst, es kann zum Zellzyklusarrest sowohl in der G₁- [26] als auch in der vorwiegend betroffenen G₂/M-Phase [27] kommen. Die durch SFN induzierte Apoptose erfolgt durch eine Aktivierung von Bax und einer dadurch vermittelten Freisetzung von Cytochrom c, eine Reduzierung der die Apoptose hemmenden IAP-Proteine und Induktion von Apaf-1 [28]. Sowohl in p53^{+/+} als auch p53^{-/-} HCT116 Zellen führt SFN zur Aktivierung von Effektorcaspasen, Verschiebung des Verhältnisses proapoptotischer zu antiapoptotischer Bcl-2 Proteine und zur Spaltung von PARP [29]. Außerdem resultiert die Gabe von SFN in der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), ein weiterer proapoptotischer Schlüsselmechanismus [30].

Die Bindung von NF-κB Untereinheiten an die DNA wird durch SFN blockiert, wodurch dieser proinflammatorische Transkriptionsfaktor inaktiviert und die Sekretion inflammatorischer Mediatoren unterbunden wird [31]. Infolge einer reduzierten Cytokin-induzierten Produktion von H₂O₂ wird die Cytokintoxizität vermieden und der NF-κB-abhängige Zelltod gehemmt [32]. Eine antiinflammatorische Wirkung des SFN wird auch im Zusammenhang mit der Hemmung Agenzien-induzierter Entzündung beschrieben, wobei sowohl die durch LPS hervorgerufene Entzündungsreaktion in Makrophagen unterdrückt [33], als auch die durch UV-B-Strahlung vermittelte Expression inflammatorischer Gene reduziert werden kann [34]. Eine durch SFN verminderte p38 MAPK-

abhängige COX-2-Expression resultiert in geringerer Produktion proinflammatorischer Prostaglandine [35-37]. SFN hemmt des Weiteren die Histondeacetylase (HDAC) in der humanen colorektalen Krebszelllinie HCT116 als auch in muriner Colonmukosa und führt somit über eine gesteigerte Expression von Tumorsuppressorproteinen wie p21 zur Differenzierung und Apoptose in präkanzerösen Zellen [38, 39]. Die SFN-vermittelte Induktion von p21 erfolgt sowohl p53-abhängig als auch -unabhängig. Antimikrobielle Effekte von SFN [40], vor allem Wachstumshemmung von Mikroorganismen wie *Helicobacter pylori* [41], bieten Schutz vor Pathogenen und Infektionen.

Die chemopräventiven Effekte von SFN wurden in zahlreichen Tiermodellen bestätigt. Unter anderem vermindert SFN in Ratten die Azoxymethan (AOM)-induzierte Bildung von aberranten Kryptofoci (ACF) im Colon [42] und die Inzidenz von Dimethylbenzanthrazen (DMBA)-induzierten Mammakarzinomen [43]. In Mäusen wird die Entstehung Benzo(a)-pyren (B(a)P)-induzierter Lungenadenome [44] bzw. Magenkarzinome [45] und DMBA-induzierter Hauttumore [46] gehemmt, sowie die Bildung von Polypen im APC^{min}-Mausmodell durch Supplementation von SFN verringert [39, 47]. Sowohl die Prostatatumorinzidenz, das -volumen als auch die -metastasierung in die Lunge können durch die Gabe von SFN im PC-3 Xenograft-Nacktmausmodell verringert werden [48]. In syrischen Hamstern retardiert SFN die Initiation von Pankreashyperplasien und somit die Entwicklung von Typ I Diabetes [49].

1.1.4 Nrf2/Keap1 und die Induktion von Phase II Enzymen

Der Focus der SFN-vermittelten Effekte lag lange Zeit auf der Induktion von antioxidativen und detoxifizierenden Enzymen wie der NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase (NQO1), Hämoxygenase 1 (HO-1), γ -Glutamylcysteinsynthetase (γ GCS) oder GST, welche über ein *antioxidant response element* (ARE) in der Promotorregion verfügen. Die Regulation dieser Gene wird über *nuclear factor E2-related factor 2* (Nrf2) vermittelt, ein basischer Leuzinzippertranskriptionsfaktor (bZIP) und einer der wichtigsten Regulatoren, welcher Zellen vor Kanzerogenen, Oxidantien und anderen toxischen Chemikalien schützt [50]. Nrf2-defiziente Mäuse reagieren empfindlicher auf den Einfluss von toxischen und kanzerogenen Substanzen, was mit einem deutlich geringeren

basalen Expressionsniveau bzw. einer fehlenden Induzierbarkeit für verschiedene Phase II Enzyme einhergeht [51, 52].

Die Regulation der Nrf2-vermittelten ARE-Transaktivierung beruht bislang auf verschiedenen Theorien und ist bisher nicht vollständig erfasst. Unter physiologischen Bedingungen ist Nrf2 am *kelch-like ECH-associated protein-1* (Keap1) assoziiert und wird von diesem für eine Ubiquitinierung und einen proteasomalen Abbau präsentiert [53, 54]. Dies verhindert die Translokation aus dem Cytoplasma [55]. Unter oxidativen Bedingungen gebildete ROS oder vorhandene elektrophile Verbindungen, wie SFN, reagieren mit reaktiven Sulfhydrylgruppen zweier Cysteinreste von Keap1, C273 und C288. Intermolekulare Disulfidbindungen entstehen und die Bindung zwischen Keap1 und Nrf2 wird durch die resultierende Konformationsänderung unterbrochen, was zur Hemmung der Keap1-vermittelten Ubiquitinierung von Nrf2 und, infolge einer konstitutiven Neusynthese, zu einem Anstieg an freiem Nrf2 führt. Nrf2 transloziert in den Kern, heterodimerisiert mit kleinen Maf- (musculoaponeurotic fibrosarcoma) und CBP- (CREB-bindenden) Proteinen und bindet an in der Promotorregion von Zielgenen liegende ARE-Regionen [56].

1.1.4.1 NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase (NQO1)

Das während Untersuchungen an NADH- und NADPH-Dehydrogenasen zufällig entdeckte Protein NQO1, auch als DT-Diaphorase bezeichnet, gilt als klassisches Nrf2-Zielgen und hat eine breite Substratspezifität [57]. Mit Hilfe eines 2-Elektronen-Transfers vom Chinon zum Hydrochinon verhindert die Flavin-haltige NQO1 die Entstehung radikalischer Zwischenstufen. Die Produkte der Oxidationsreaktion, wasserlöslichere Hydrochinone, werden rasch konjugiert und ausgeschieden [58]. Als Elektronendonatoren können mit gleicher Effektivität NADH oder NADPH genutzt werden [59]. Der Vitamin K-Antagonist Dicoumarol hemmt das Enzym. Die Reaktion des Homodimers NQO1 funktioniert über einen Ping-Pong-Mechanismus. Reduziertes Pyridinukleotid wird gebunden, reduziert seinerseits den Cofaktor FAD und bindet im oxidierten Zustand an das Substrat [58]. NQO1 ist durch verschiedene elektrophile oder oxidative Stimuli induzierbar und kann als Teil des Abwehrsystems gegen Stress angesehen werden. In der 5' flankierenden Region seines Genes liegt sowohl die Sequenz

ARE als auch die des *xenobiotic response elements* (XRE). Vorwiegend (>90%) cytosolisch vorkommend, wird es hauptsächlich in epithelalem und endothelalem Gewebe exprimiert [57]. Nukleäres NQO1 wurde jedoch auch in der Tumorzelllinie HT-29 detektiert, was aufgrund der Fähigkeit zur Bioaktivierung antikanzergener Substanzen ebenso eine Schutzfunktion schlussfolgern lässt [60]. Eine Formation reaktiver Metabolite durch die Metabolisierung von NQO1 ist jedoch ebenfalls möglich, ROS können generiert bzw. nucleophile Stellen alkyliert werden. Die Expression von NQO1 ist in humanen Tumorzellen sowie -geweben gesteigert [61, 62], was zur Folge hat, dass der Einsatz antikanzergener NQO1-Substrate bei der Therapie solcher Tumore diskutiert wird [63].

1.1.4.2 Glutathion-S-Transferase (GST)

Die Konjugation von GSH an Elektrophile, wie SFN, wird durch GST katalysiert, einer multigenen Isoenzymfamilie, welche durch diese Reaktion eine wichtige Rolle im Metabolismus und der Detoxifizierung von Fremdstoffen spielen [64]. Es existieren 6 Isoenzymklassen (α , μ , π , θ , σ , κ) die alle aus zwei Untereinheiten bestehen. Trotz überlappender Substratspezifitäten variiert die Reaktivität jedes Isoenzym für verschiedene Substrate [65].

Das den Metabolismus von SFN einleitende Enzym GST trägt aufgrund verschiedener Gen-Polymorphismen in einigen Subklassen wesentlich an der Fähigkeit des Organismus bei, Fremdstoffe zu detoxifizieren. In ca. 50% der Bevölkerung tritt der GSTT1-null Genotyp auf, die Defizienz an diesem Enzym ist damit recht häufig. Einigen Studien zufolge bietet dieser Genotyp aufgrund von länger andauernder Exposition und geringerer Eliminationsrate von SFN einen Schutz vor Krebserkrankungen in Lunge, Colon und Brust [66, 67]. Im Widerspruch dazu steht, dass der GSTM1-null Genotyp SFN schneller eliminiert und ein höheres Risiko aufweist, an Prostatakrebs zu erkranken [68].

1.2 Selen (Se)

1.2.1 Bedeutung und chemische Eigenschaften

Das nach der griechischen Mondgöttin *Seléne* benannte Element wurde 1817 von Jöns Jakob Berzelius (1179-1848) im Bleikammerschlamm einer schwedischen Schwefelsäurefabrik entdeckt und war vorerst als toxische Substanz bekannt. In der VI. Hauptgruppe des Periodensystems für Elemente stehend, kann Selen (Se^{34}) in Verbindungen die Oxidationszahlen -2, 0, +4, +6 annehmen und ist Schwefel hinsichtlich seiner chemischen und physikalischen Eigenschaften sehr ähnlich. Aufgrund einer größeren Atomhülle verfügt Se jedoch über eine höhere Nukleophilie und Reaktivität als Schwefel [69, 70]. Neben Tellur (*tellus*, griech.: Erde) kommt Se in Kupfer-, Blei-, Zink-, Silber- und Golderzen vor, der Gehalt im Boden variiert regional sehr stark. Erste Berichte über die *Alkali Disease* innerhalb des Viehbestandes in Nebraska belegen die toxische Wirkung von Se, welche 1933 bestätigt wurde [71]. Hingegen traten bei Vieh auf selenarmen Böden auch Mangelercheinungen auf (*White-Muscle-Disease*). Die Essentialität von Selen wurde 1957 von Schwarz und Foltz entdeckt. Sie beobachteten, dass durch Vitamin-E-defizientes Futter induzierte Lebernekrosen in Ratten durch Zusatz von Se verhindert werden konnten [72]. Wie wichtig eine adäquate Selenzufuhr für den Menschen ist, zeigen endemisch auftretende Krankheiten. Die Zufuhrempfehlung für einen erwachsenen Menschen in Deutschland liegt bei 30-70 μg Se pro Tag [73], tatsächlich ist aber die tägliche Aufnahme in Europa und anderen Ländern geringer. Moderater Selenmangel ($< 20 \mu\text{g}/\text{Tag}$) wird in Verbindung gebracht mit Infertilität [74], verminderter Immunität und größerer Anfälligkeit gegenüber Infektionskrankheiten [75]. Chronischer Selenmangel ($< 10 \mu\text{g}/\text{Tag}$) kann zu einer - vor allem junge Frauen und Kinder betreffende - Kardiomyopathie (Keshan-Erkrankung) [76], in Zusammenhang mit einer Coxsackie-Virus-Infektion sogar zu Myokarditis [77], oder zu einer degenerativen Gelenkentzündung (Kashin-Beck Erkrankung) führen [78]. Die Supplementation bzw. die Bodendüngung mit Se sind potentielle Therapiemöglichkeiten dieser Mangelkrankheiten. Auch andere chronische Krankheiten, wie Morbus Parkinson, Herz-Kreislaufkrankungen oder Alzheimer, können durch Selensupplementation in ihrem Ausmaß vermindert werden [79]. Des Weiteren senkte eine erhöhte Zufuhr von Se die Inzidenz von

Lungen-, Leber-, Colorektal- und Prostatakrebs [80]. Epidemiologische Befunde hierzu sind allerdings inkonsistent [81]. Die tägliche Selenaufnahme sollte 450-500 µg dennoch nicht überschreiten. Bereits 600 µg/Tag können bei einzelnen Individuen toxische Effekte hervorrufen, die sich in Symptomen wie Müdigkeit, Fingernagel- und Haarverlust sowie Depressionen äußern [82]. Seit im Nutritional Prevention of Cancer (NPC) Trial präventive Effekte im Hinblick auf die Reduktion der Krebsmortalität im Allgemeinen und der Inzidenz an Lungen-, Prostata- und Colorektalkrebs im Speziellen durch die Supplementation von 200 µg Se über viereinhalb Jahre beobachtet wurden [83], liegt besonderes Augenmerk auf der Erforschung der Mechanismen von Se als potentiell chemopräventiver Substanz. Neben der Induktion von Genen detoxifizierender Enzyme sowie der Hemmung aktivierender Enzyme bewirkt die Behandlung mit Se in supra-nutritiven Konzentrationen auch die Regulation von Genen, die im Prozess des Zellzykluses sowie der Apoptose involviert sind [84]. So werden durch Selenverbindungen wie Selenit oder Selenocystein (Se-Cys) bzw. Vorstufen von Methylselenol oder Selenwasserstoff Caspasekaskaden aktiviert und Apoptose induziert, Zellen in bestimmten Phasen des Zellzyklus arretiert, oder das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren gehemmt [85, 86]. Se ist gleichwohl essentiell für das Wachstum von Zellen [87]. Vor allem erfüllt Se seine Funktionen in Form von Selenoproteinen, welche zudem in antioxidativen, antiinflammatorischen und antiviralen Prozessen beteiligt sind [88].

1.2.2 Funktionen von Selenoproteinen

Die ersten Selenoproteine wurden 1973 in Bakterien [89] und Säugerzellen entdeckt [90, 91]. Sie kommen jedoch nicht in Hefen und Pflanzen vor [92]. Durch den cotranslationalen Einbau der 21. proteinogenen Aminosäure Se-Cys in die Polypeptidkette von Selenoproteinen ist Se ein eher untypisches Spurenelement [88]. Die Selenolgruppe des Se-Cys weist im Vergleich zur Thiolgruppe des Cysteins einen geringeren pK-Wert (pKa 5,2) auf. Im Gegensatz zum protonierten Cystein liegt Se-Cys im physiologischen pH-Bereich vorwiegend in ionisierter Form vor und ist somit reaktiver [93]. Insgesamt wurden 25 humane Gene gefunden, die für Selenoproteine codieren. Splicevarianten und weitere posttranslationale Modifikationen führen zur Expression weiterer Selenoproteine. 17 Selenoproteinfamilien mit zum Teil mehreren Genen umfasst das huma-

ne Selenoproteom [94]. Die Glutathionperoxidasen (GPx) besitzen fünf Gene, die Thioredoxinreduktasen (TrxR) 3 Gene, die Iodothyronideiodinasen (DIO) ebenfalls drei Gene und sind, neben der Selenophosphatsynthetase 2 (SPS2), am besten charakterisiert. Die restlichen Selenoproteine wurden in alphabetischer Reihenfolge benannt (Tab. 1, Übersicht in [95]).

Tab. 1: Humane Selenoproteine und ihre Funktionen

Selenoprotein	Vorkommen	Funktion	Referenz
Glutathionperoxidase (GPx)			
GPx1, cGPx	ubiquitär, cytosolisch	Reduktion von Hydroperoxiden	[90]
GPx2, GI-GPx	GIT, Krebszellen, cytosolisch, nukleär	Reduktion von Hydroperoxiden, Einfluss auf Entzündung und Krebs	[96, 97]
GPx3, pGPx	Plasma	Reduktion von Hydroperoxiden	[98, 99]
GPx4, PHGPx	ubiquitär	Reduktion von organ. Hydroperoxiden, Spermienreifung, embryonale Entwicklung	[100, 101]
GPx6	olfaktorisches Epithel	antioxidativer Schutz	[102]
Thioredoxinreduktasen (TrxR)			
TrxR1	ubiquitär, cytosolisch, nukleär	Reduktion des oxidierten Thioredoxin (Trx)	[103]
TrxR2	ubiquitär, mitochondrial	Reduktion des Trx	[104]
TrxR3 (TGR)	Testis	Reduktion des Trx, Glutathion- und Glutaredoxinreduktaseaktivität	[105]
Dejodinasen (DIO)			
Dio1	Leber, Niere, Schilddrüse, Hypophyse, PM	T3-Synthese, Abbau von T3 und T4	[106]
Dio2	Schilddrüse, Hypophyse, Muskel, ZNS, braunes Fettgewebe, ER-Membran	T3-Synthese	[107]
Dio3	Plazenta, ZNS, Haut, PM	Abbau von T3 und T4	[108]
Selenophosphat-Synthetase-2 (SPS2)	ubiquitär	Selenophosphatsynthese für die Translation von Selenoproteinen	[109]
Selenoprotein H	ubiquitär	Redox-sensitives DNA-Bindeprotein, Redoxin-Familie	[110, 111]
Selenoprotein I	ubiquitär	in E.coli spezifische Ethanolamin-Phosphotransferase-Aktivität	[112]
Selenoprotein K	ubiquitär, im ER	antioxidative Funktion im Herz, Proteinfaltung	[113]
Selenoprotein M	ubiquitär, im ER	Redoxin-Familie, Proteinfaltung	[114, 115]
Selenoprotein N	ubiquitär, ER-Membran	Ca-Homöostase, embryonale Entwicklung	[116, 117]
Selenoprotein O	ubiquitär	unbekannt	[118]
Selenoprotein P	Plasma	Selentransport und -homöostase	[119]
Selenoprotein S	ubiquitär, im ER	Glucose-reguliert, zelluläres Redox-Gleichgewicht, Immunabwehr, Proteinfaltung	[120, 121]
Selenoprotein T	ubiquitär, im ER	Ca-Homöostase, neuroendokrine Sekretion, Redoxin-Familie, Proteinfaltung	[122]
Selenoprotein V	Testis, Gehirn	Testisspezifische Form von SelW, Redoxin-Familie	[94]
Selenoprotein W	ubiquitär	Funktion in Muskel und Herz, Redoxin-Familie	[123]
Selenoprotein X (SelR)	ubiquitär	Methionin-R-Sulfoxid-Reduktase	[124, 125]
Selenoprotein 15	ubiquitär, im ER	Proteinfaltung im ER, aktiviert Apoptose, Redoxin-Familie	[126]

Die C- bzw. N-terminale Lage des Sec ermöglicht eine Einteilung der Selenoproteine in weitere zwei Gruppen.

1.2.3 Biosynthese von Selenoproteinen

Ein spezifischer Mechanismus ist nötig, um das für Se-Cys codierende Basentriplett UGA [127, 128] - primär für die Termination der Translation zuständig [129] - für die Inkorporation von Se in ein Selenoprotein zu nutzen. Zunächst ist eine spezielle Haarnadelstruktur notwendig, die sich, anders als im offenen Leseraster von Prokaryoten, in Selenoproteinen von Eukaryoten in der 3'-UTR der mRNA befindet. Als *selenocysteine inserting sequence* (SECIS) bezeichnet, verhindert sie die vorzeitige Termination. Die Synthese von Se-Cys findet, anders als die der anderen 20 Aminosäuren, an der spezifischen tRNA^{(ser)sec} statt. Mit Hilfe der Selenophosphatsynthetase 2 (SPS2) wird zunächst Selenid mit ATP zu Selenophosphat aktiviert [109, 130]. Die tRNA wird nach Beladung mit einem Serylrest und Aktivierung zu Phosphoseryl-tRNA^{(ser)sec} mit Hilfe der entsprechenden Kinase mit Selenophosphat zu Selenocysteyl-tRNA^{(ser)sec} umgewandelt. In Eukaryoten wird diese Umwandlung durch die Selenocysteinsynthetase *soluble liver antigen protein* (SLA) katalysiert [131]. Weiterhin sind folgende Komponenten am Synthesekomplex beteiligt: der selenocysteinspezifische Elongationsfaktor (eEFsec), welcher die Selenocysteyl-tRNA^{(ser)sec} erkennt und zu den Ribosomen transportiert, das SECIS bindende Protein 2 (SBP2), welches den Transport der mRNA zu den Ribosomen bewirkt und dort an EFsec und das ribosomale Protein L30 (Rpl30) bindet [132], und das 43-kDa RNA-bindende Protein (Secp43), welches die Interaktion und Lokalisation der o.g. Faktoren beeinflusst und somit den Einbau von Se-Cys fördert [133].

Die Deletion von *Trsp*, dem Gen der tRNA^{(ser)sec}, ist embryonal letal. Eine Expression von Selenoproteinen wäre unmöglich [134].

1.2.4 Regulation der Selenoproteinexpression durch Se

Die Verfügbarkeit von Se beeinflusst wesentlich den Ablauf der Selenoproteinsynthese. Im Selenmangel ist die Bildung von tRNA^{(ser)sec} limitiert und die weitere Proteinsynthese wird am sonst für Se-Cys codierenden UGA gestoppt. Die Selenversorgung bedingt

ferner das Verhältnis der tRNA^{(ser)sec} Isoformen. Die sich in einer einzelnen Methylgruppe in Position 34 unterscheidenden Isoformen haben verschiedene physiologische Funktionen. 5'-Methylcarboxymethyl-2'-O-methyluridin (mcm⁵Um) wird bei Vorhandensein von Se aus Methylcarboxyl-5'-Methyluridin (mcm⁵U) gebildet, durchläuft dadurch eine Konformationsänderung und stellt die reife Form der tRNA^{(ser)sec} dar [135]. Besonders stress-responsive Selenoproteine, wie GPx1, GPx3, SelW oder SelS werden von der methylierten tRNA gebildet und bei limitierter Selenversorgung nicht translatiert. *Housekeeping* Selenoproteine, wie TrxR1, TrxR3 und GPx4 hingegen sind davon weitestgehend unbeeinflusst, da sie durch die unmethylierte tRNA^{(ser)sec}-Isoform synthetisiert werden [136]. Die unterschiedliche Instabilität der mRNA von Selenoproteinen bei Selenmangel ergibt sich ferner aus dem *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD), der eintritt, sobald das Selenocysteincodon als solches erkannt wird [137].

Die Hierarchie der Selenoproteine umschreibt die differenzierende Reaktion einzelner Selenoproteine auf die Selenverfügbarkeit. Eine verminderte Synthese von den hoch in der Hierarchie angesiedelten Proteinen GPx2, GPx4, der Thioredoxinreduktasen und Dejodinasen setzt einen lang anhaltenden, schwerwiegenden Mangel an Se voraus, wohingegen die mRNA-Menge der niedrig in der Hierarchie der Selenoproteine stehenden GPx1 bei Selenunterversorgung am stärksten reduziert wird und die Synthese verzögert erfolgt, wenn Se wieder ausreichend zur Verfügung steht [97, 138]. Die Translation stress-responsiver Selenoproteine wird im Selenmangel ferner über die Bindung des Initiationsfaktors eIF4a3 an das SECIS Element temporär unterbunden. Bei Selenrepletion wird dieser Faktor freigesetzt bzw. in seiner Expression vermindert, wodurch SECIS für SBP2 zugänglich wird. Dies ermöglicht die Selenoproteinsynthese [139].

Die Deckung einer adäquaten Versorgung für optimal protektive Effekte wird noch diskutiert. Neuen Erkenntnissen zufolge ist beispielsweise der, in Erythrocyten ermittelte bisher übliche Biomarker GPx1 nicht mehr ausreichend, da Selenoproteine existieren, die noch empfindlicher auf einen Selenmangel reagieren [140]. So ist beispielsweise die Konzentration von SelP im Plasma ein geeigneter Biomarker für die Ermittlung einer optimalen Selenoproteinexpression [141].

1.2.5 Glutathionperoxidasen (GPx)

Bisher wurden im Menschen sieben Mitglieder der GPx identifiziert, fünf davon sind Selenoproteine (Tab. 1). Sie reagieren mit Wasserstoffperoxid und organischen Hydroperoxiden und reduzieren diese zu den entsprechenden Alkoholen. Die Reduktion von Selenensäure zum Selenol erfolgt unter Verbrauch zweier Thiole, vorwiegend Glutathion (GSH), aber auch Glutaredoxin bzw. Thioredoxin im Falle der GPx3 oder Proteinthiole im Falle von GPx4 [142]. Makromoleküle und Biomembranen können somit vor oxidativen Schäden geschützt werden. Das aktive Zentrum besteht aus Se-Cys, Glutamin und Tryptophan [143, 144]. Mit Ausnahme der monomeren GPx4 liegen die restlichen GPx als Homotetramere vor. Auch in Bezug auf Substratspezifität sowie Lokalisation, Funktion (Tab. 1) und Regulation unterscheiden sich die GPx. GPx1 und GPx2 reagieren nur mit löslichen Hydroperoxiden. GPx4, sowie GPx3 zu geringem Anteil, können außerdem in Lipiden komplex gebundene Hydroperoxide umsetzen [142]. Die GPx2 besitzt innerhalb der GPx die stabilste mRNA und nimmt den höchsten Rang in der Hierarchie ein. Danach folgt die GPx4. GPx1 und GPx3 reagieren hinsichtlich ihrer Anfälligkeit gegenüber einer Unterversorgung an Se ähnlich stark [97, 144]. Der Rang der einzelnen GPx innerhalb dieser Hierarchie reflektiert ebenso deren biologischen Stellenwert.

1.2.5.1 Glutathionperoxidase 1 (GPx1)

Als erstes Selenoprotein identifiziert [90, 91], ist das ubiquitär exprimierte cytosolische Enzym vor allem für die Reduktion von oxidativem Stress verantwortlich [145]. Eine Unterversorgung an Se spiegelt sich aufgrund einer relativ instabilen mRNA sehr schnell im reduzierten Gehalt an GPx1 wider. Die GPx1 hat, abhängig vom Organ, einen Anteil von 50-80% an der GPx Gesamtaktivität [146]. Dass GPx1 ein wichtiges antioxidatives Enzym darstellt und in der Lage ist, vor pathogenen Effekten ROS-induzierter Erkrankungen zu schützen, zeigen Untersuchungen an GPx1 Knockout (GPx1^{-/-}) Mäusen [147]. In Folge von schwerem oxidativem Stress sterben diese trotz Selensupplementation, wohingegen Tiere des Wildtyp überleben. Gering gestresste GPx1^{-/-} Tiere weisen eine gesunde und fertile Entwicklung auf. Reduzierte GPx1 Gehalte führen durch eventuelle Veränderungen in DNA-Reparaturmechanismen zu einem

höheren Risiko für Krebsentstehung [148]. Transgene Mäuse mit mutiertem tRNA^{(ser)sec} Gen und einer daraus resultierenden gehemmten Bildung der reifen mcm⁵Um-Form zeigen aufgrund der selektiv verminderten Selenoproteinexpression stark reduzierte GPx1-Expressionen und eine vermehrte AOM-induzierte Bildung von ACF [149]. GPx1-überexprimierende humane endothelähnliche Zellen haben eine geringere Hydroperoxid-induzierte Apoptoserate resultierend aus einem verminderten Verhältnis des proapoptotischen Bax zum antiapoptotischen Bcl-2 [150]. Die Rolle einer veränderten GPx1-Expression in der Kanzerogenese sowie der Entwicklung kardiovaskulärer, neurodegenerativer und metabolischer Erkrankungen wird diskutiert [151].

1.2.5.2 Glutathionperoxidase 2 (GPx2)

Zunächst als Epithelium-spezifische gastrointestinale GPx identifiziert [96, 152], wurde die GPx2 als Barriere gegen eine Hydroperoxidabsorption angesehen [153]. Durch die extrem hohe mRNA Stabilität im Selenmangel nimmt sie einen der höchsten Ränge in der Hierarchie der Selenoproteine ein [97]. In Nagern ist das Protein vor allem im mittleren und unteren GIT zu finden, mit höchsten mRNA Konzentrationen im Ileum und Cäcum [96]. Die Expression von GPx2 erfolgt im Ileum vorwiegend in den Panethzellen, im Colon und Rektum ist sie am stärksten im Kryptengrund [154], was darauf hindeutet, dass GPx2 - als ein Zielgen des Wnt-Signalweges [155] - eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Epithelzellerneuerung spielt. Auch in der humanen Leber wird GPx2 exprimiert [96]. Pathologisch wird die GPx2 vermehrt in Brustkrebszelllinien [156], während der neoplastischen Transformation squamöser Epithelzellen [157], im prämaligen Stadium des Barrett's Ösophagus [158] sowie in colorektalen Adenomen [154, 159, 160] exprimiert, was auf eine Funktion in Zellproliferation und -differenzierung sowie eine Relevanz in der Kanzerogenese [80] schließen lässt. Untersuchungen an GPx1/GPx2 Doppelknockout-Mäusen (GPx1^{-/-}GPx2^{-/-}), welche eine durch Bakterien hervorgerufene Colitis [161] und Tumore im Ileum entwickeln [162], bestätigen einen Einfluss auf inflammatorische und kanzerogene Prozesse. Heterozygote Mäuse mit einem Allel für *GPx1* (GPx1^{+/-}GPx2^{-/-}) zeigen die selben Symptome, die für *GPx2* (GPx1^{-/-}GPx2^{+/-}) hingegen nicht [163]. GPx1 oder GPx2 Knockout-Mäuse sind unter physiologischen Bedingungen phänotypisch unauffällig [146]. Eine an-

tiinflammatorische Funktion der GPx2 ist die Hemmung der COX-2-Expression [164], möglicherweise durch Eliminierung von Hydroperoxiden, welche für die Aktivität von COX-2 nötig sind [165]. Die so erfolgte Verhinderung der PGE₂ Produktion inhibiert ebenfalls die COX-2-Expression [166]. Auch die dadurch vermittelte Hemmung der Migration und Invasion von HT-29 Zellen [167] spricht für eine antikanzerogene Funktion. Auf eine prokanzerogene Wirkung hinweisend, wird GPx2 durch den Wnt-Signalweg reguliert [155] und unterstützt die Tumorbildung von HT-29 Zellen in Nacktmäusen [167]. Die Rolle der GPx2 in der Kanzerogenese ist also abhängig vom entsprechenden Stadium [168]. Eine weitere protektive Funktion aufzeigend, wird die GPx2, welche ein funktionelles ARE in der Promotorregion enthält, über Nrf2 transaktiviert [169].

1.2.6 Thioredoxinreduktasen (TrxR)

Die FAD-enhaltenden homodimeren Selenoproteine gehören zur Flavoproteinfamilie der Pyridin-Nukleotid-Oxidoreduktasen [103]. Die TrxR katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion des ubiquitär vorkommenden Thioredoxin (Trx) und bildet mit diesem eines der wichtigsten Redoxsysteme. Obwohl als *housekeeping* Proteine angesehen, stellen die TrxR aufgrund des niedrigen pKa der Selenolgruppe sehr reaktive Enzyme dar und werden leicht durch elektrophile Substanzen beeinflusst. Von den 3 bisher identifizierten TrxR besitzt die Testis-spezifische Thioredoxin-Glutathionreduktase TrxR3 (TGR) außerdem die Fähigkeit, GSSG und Glutaredoxin zu reduzieren. Die dominante cytoplasmatisch/nukleäre Isoform TrxR1 besitzt eine ARE-Sequenz in ihrer Promotorregion, welche über Nrf2 transaktiviert wird [170]. Die TrxR1 ist durch SFN in verschiedenen Zellsystemen induzierbar [171-174], hingegen ist die mitochondriale TrxR2 durch SFN unbeeinflusst. Da ausschließlich TrxR oxidiertes Trx reduzieren, resultiert eine Veränderung in ihrer Aktivität auch in der Veränderung von Trx-vermittelten Effekten, wie der Synthese von Desoxyribonukleotiden, der Regulation von Transkriptionsfaktoren, der Induktion von Zellproliferation [175] oder der Hemmung von Apoptose [176]. So werden beispielsweise NF-κB, AP-1 und p53 durch die Oxidation von Trx beeinflusst [177]. Die Gendeletion von sowohl Trx als auch TrxR1 und TrxR2 resultieren in embryonaler Letalität [178] und verdeutlichen die zentrale Rolle des Systems in Wachstum und Entwicklung. Eine duale Rolle des Selenoproteins auf-

zeigend, ist in vielen malignen Zellen und aggressiven Tumoren die Expression des Trx/TrxR Systems deutlich erhöht [179-181]. Hinweise bestehen, dass die TrxR als potentielle Ansatzstellen für antikanzerogene Therapeutika genutzt werden könnten. In verschiedenen Krebszelllinien konnten maligne Eigenschaften verändert und somit der tumorigene Phänotyp aufgehoben werden, indem mit Hilfe von TrxR1 Inhibitoren die Expression des Enzyms reduziert wurde [182, 183].

1.3 Wechselwirkung zwischen SFN und Se

Ein enges Zusammenspiel existiert zwischen den beiden chemopräventiven Substanzen SFN und Se. Nicht nur die Tatsache, dass SFN die Selenoproteine GPx2 [169] und TrxR1 [170] induziert, deutet auf eine synergistische Wirkung hin. Da GPx2, eine extrem stabile mRNA besitzend, nur wenig durch eine Veränderung des Selenstatus moduliert werden kann, könnte eine Expressionssteigerung über den Einfluss des ITCs erfolgen. Verschiedene protektive Effekte der Kombination aus Se und SFN werden postuliert. Neben der Induktion von detoxifizierenden Enzymen [184] werden durch Brokkoli der Lipoproteinstoffwechsel beeinflusst [185] und kardioprotektive Effekte erzielt [186]. Fütterung mit Se-angereichertem Brokkoli bewirkt in Ratten eine Verminderung der Inzidenz von Brusttumoren [187] und eine Hemmung chemisch induzierter ACF [188]. In Min-Mäusen kann selenreicher Brokkoli die Entwicklung von intestinalen Tumoren hemmen [189]. Ob sich diese Effekte aus der Wechselwirkung zwischen Se und SFN ergeben oder durch Se allein verursacht sind, geht aus den Arbeiten nicht hervor. Hinweise auf eine inverse Beziehung der Pflanzeninhaltsstoffe bestehen ebenfalls. Se und Schwefel konkurrieren bei der Akkumulation im Brokkoli miteinander. Deshalb verändert eine Anreicherung des Bodens mit Se die Zusammensetzung anderer Pflanzeninhaltsstoffe, wobei vor allem der Glucosinolatgehalt durch einen hohen Gehalt an Se vermindert wird [190]. Dies führt zum Beispiel zu einer Reduzierung der Induktion von Phase II Enzymen durch selenreichen Brokkoli [191].

Se beeinflusst maßgeblich die Aktivität des Transkriptionsfaktors Nrf2. Im Selenmangel werden ARE verstärkt transaktiviert und Nrf2-Zielgene induziert [192]. Auch die Reduktion der Aktivität von Selenoproteinen durch einen konditionalen Knockout von

Trsp führt zu erhöhtem oxidativem Stress und wird kompensiert durch eine Nrf2-vermittelte Induktion von GST π 1 und NQO1 [193]. Der Einfluss von SFN bei Selenmangel bzw. einer reduzierten Selenoproteinexpression - im Hinblick auf die Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges - wurde bisher nicht untersucht.

1.4 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen und Kanzerogenese des Colon

1.4.1 Physiologie des Colon

Die aus einzelnen Krypten aufgebaute Colonmukosa (Tunica mucosa) besteht überwiegend aus epithelialen Zellen, der Lamina propria bzw. Lamina muscularis mucosae aufsitzend, und wird von der nach außen abschließenden Tunica muscularis durch die Tunica submucosa abgegrenzt. Die Erhaltung einer gesunden Mukosa ist durch das Gleichgewicht aus Proliferation von im Kryptengrund lokalisierten Stammzellen, einer stufenweisen Differenzierung und Migration in Richtung Kryptenspitze sowie kontrollierten Apoptose, die vor allem an der Kryptenspitze stattfindet, möglich [194]. Bei einer gesteigerten unkontrollierten Proliferation bzw. modifizierten Differenzierung ist dieser Prozess der Kryptenregeneration gestört, Hyperplasien und maligne Entartungen entstehen. Auch eine veränderte Apoptoserate geht mit einem Ungleichgewicht oder oxidativem Stress einher. Die Einleitung der stress-induzierten bzw. spontanen Apoptose erfolgt entweder extrinsisch über eine Ligandenbindung an einen Rezeptor der TNF-Rezeptorfamilie und die daraus resultierende Aktivierung der Caspasekaskade oder intrinsisch über die mitochondriale Caspasekaskade. Merkmale der Apoptose sind im Allgemeinen ein gesteigertes Verhältnis proapoptotischer zu antiapoptotischen Bcl-2 Proteine, die Spaltung der Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP), die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien sowie cytoplasmatische Histon-assoziierte DNA-Fragmente [195]. Für sowohl SFN als auch Se sind pro- und antiapoptotische Effekte bekannt [20, 21, 27, 85, 196].

1.4.2 Entzündungsvermittelte Colonkanzerogenese

Mit einer Inzidenz von ca. 69.000 Fällen pro Jahr stellt das Colonkarzinom mit 16% die zweithäufigste Krebserkrankung dar und gehört mit einer Mortalität von ca. 27.500 (12-

14%) pro Jahr zur zweithäufigsten Krebstodesursache in Deutschland. Die Kanzerogenese allgemein ist ein mehrstufiger Prozess, welcher in 3 mechanistische Phasen eingeteilt werden kann. Die Initiation führt zu stabilen genomischen Veränderungen mit dem Erwerb eines Wachstumsvorteils, die Promotion geht mit der Proliferation der genetisch veränderten Zellen und einer möglichen Akquisition weiterer Mutationen einher und die Progression umfasst die Vergrößerung und Vermehrung des Tumors und den Erwerb neuer zusätzlicher genetischer Veränderungen [197]. Der Verlust der APC-Funktion und die Aktivierung von K-ras gehören zu initialen Ereignissen der colorektalen Kanzerogenese, gefolgt von der Deletion von DCC, p53 und weiteren Allelverlusten. Schon 1863 beschrieb Rudolf Virchow den Ursprung von Krebserkrankungen an Stellen chronischer Entzündung [198].

Oxidativer Stress spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen Erkrankungen des Colon. Dabei können auf die dauerhafte Beanspruchung des Immunsystems chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED), wie Morbus Crohn (MC) oder Ulzerative Colitis (UC) folgen. Die beiden Krankheitsbilder unterscheiden sich stark in Ursprung und Lokalisation, wobei Entzündungen bei MC verstreut im gesamten GIT zu finden sind, hingegen bei der UC typischerweise zunächst im distalen Colon auftreten und sich nach proximal ausbreiten können. Symptomatisch für die in intermittierenden Schüben auftretende UC sind blutige und schleimige Diarrhoen, die aus der Beeinträchtigung der natürlichen Barrierefunktion der Darmmukosa, der verstärkten Rekrutierung von Immunzellen sowie deren Einwanderung in die Mukosa und dem Einfluss proinflammatorischer Mediatoren resultieren [199]. Die bei einer Colitis auftretenden dysplastischen Veränderungen niedrigen Grades können weiter entarten und stellen ein hohes Risiko für die Entstehung von Dickdarmkrebs dar. Nach einer Erkrankungsdauer von 30 Jahren beträgt das Risiko für die Entwicklung eines colorektalen Karzinoms auf dem Boden einer CED 18% [200].

Die Kombination aus der Applikation des chemischen Kanzerogens Azoxymethan (AOM) und des Colitis-induzierenden Natrium-Dextransulfat (DSS) bildet die Grundlage für das Modell der entzündungsgetriebenen Colonkanzerogenese [201] und ist in ihrer Auswirkung mit der akuten und chronischen UC beim Menschen vergleichbar. Aus

AOM, in der Leber zu Methylazoxymethanol hydroxyliert und spontan zu Methyldiazonium zerfallend, wird im Colon ein reaktives Methylcarboniumion gebildet [202, 203], welches in der Lage ist, Nukleinsäuren und Proteine zu alkylieren. Betroffen ist davon im Besonderen das in 30% aller humanen Krebsarten mutierte Onkogen K-ras, welches durch eine Transition von G zu A auf Codon 12 und 13 aktiviert wird [204]. Auch β -Catenin stellt einen Hotspot dar, welches aufgrund der gleichen Punktmutation in Codon 33 und 41 - Phosphorylierungsstellen für GSK-3 β darstellend - sowie Codon 32 und 34 vermehrt in den Kern transloziert [205]. Beide Mutationen steigern die Expression der Protoonkogene Cyclin D1 und c-myc sowie der proinflammatorischen Enzyme iNOS und COX-2 und begünstigen die Promotion der Zellproliferation und maligne Veränderungen [206]. Vor allem führen diese durch AOM induzierten Mutationen in der DNA des Colongewebes zur Bildung von präneoplastischen Läsionen, Herde dysplastischer Zellen, sogenannten aberranten Krypten. ACF sind die erste Stufe der Neoplasie und mikroskopisch erkennbar. Sie gelten als Vorstufe für Adenome. Eine Subpopulation, *mucin-depleted foci* (MDF), hat das Potential zur malignen Entartung [207]. Eine nach AOM-Applikation erfolgende zusätzliche Gabe von DSS erhöht die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von ACF und deren Entwicklung zu Tumoren durch die Induktion einer schweren Colitis. Diese geht einher mit einer erhöhten Infiltration sowie Aktivität von Makrophagen sowie der Veränderung der Mikrobiota [208]. Mögliche direkte toxische Effekte auf Kryptenzellen und deren Untergang resultieren im Verlust gesamter Colorkrypten, ulzerative Areale entstehen, was durch den Versuch der Kryptenregeneration zur Entstehung neoplastischer Herde führen kann. Diese Vorgänge finden vor allem im mittleren und distalen Colon statt [209].

Zahlreiche epidemiologische [68, 210-212] sowie experimentelle Studien [213] mit Glucosinolaten bzw. deren Metaboliten, deuten auf krebspräventive Effekte durch den Konsum von *Brassica* Gemüse, vor allem durch Brokkoli, hin. Ein Eingriff in die Entstehung von Krebs durch SFN ist an vielen Stellen in allen 3 Phasen möglich [214], wobei die molekularen Ziele vom Stadium der Entdifferenzierung und vom Zielgewebe abhängig sind. Am stärksten werden jedoch frühe Prozesse der Krebsentstehung beeinflusst [212].

1.5 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Wechselwirkungen von SFN und Se untersucht werden. Dazu sollten *in vitro* sowie *in vivo* zunächst SFN-Formen unterschiedlicher Herkunft verglichen und eine geeignete Konzentration gefunden werden. Die dadurch erzielten optimalen präventiven Effekte im Sinne einer Induktion von GPx2 und NQO1 und einer Steigerung der Aktivität weiterer Nrf2-Zielgene waren Voraussetzung für die Untersuchung der Wechselwirkung beider chemopräventiv wirksamen Komponenten im entzündungsverstärkten Colonkrebsmodell.

Die Behandlung mit SFN sollte Aufschluss über eine mögliche Überexpression der induzierbaren GPx2 geben. Eventuell durch SFN induzierte kompensatorische Effekte in Tieren mit gezieltem Knockout von GPx2 sollten beleuchtet werden.

Die Auswirkung der Kombination von SFN und 3 verschiedenen Selendiäten auf die physiologische Lokalisation der Proteinexpression von Phase II Enzymen und Selenoproteinen sowie Apoptoseprozesse im Colon sollten analysiert werden.

Besonderes Augenmerk lag auf der Untersuchung des Zusammenspiels von SFN und Se in der, durch AOM/DSS induzierten, entzündungsvermittelten Colonkanzerogenese. Die Kombination aus SFN und verschiedenen Selendiäten, basierend auf dem Status einer eventuell induzierten bzw. fehlenden GPx2, sollten hinsichtlich ihres Effektes auf die Entzündung sowie die Ausbildung präneoplastischer Läsionen und Tumoren betrachtet werden. Außerdem sollte der Beginn der SFN-Behandlung zu unterschiedlichen Zeitpunkten Auskunft darüber liefern, ob SFN präventiv wirkt oder vielmehr eine Initiation der Kanzerogenese blockiert.

2 Methoden

2.1 *In vitro* Untersuchungen

2.1.1 Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurde die humane Leberkarzinomzelllinie HepG2 (ATCC HB8065), epithelialen Ursprungs, verwendet. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37°C, in 95% gesättigter Wasserdampfatosphäre und 5% CO₂-Partialdruck. Bei der Durchführung sämtlicher Zellkulturarbeiten wurde auf sterile Bedingungen geachtet. HepG2 Zellen erhielten RPMI 1640 (pH 7,1; Gibco Life Technologies, Karlsruhe), angereichert mit 10% selenarmem, hitzeinaktiviertem FCS (Sigma-Aldrich, München) sowie 2 mM L-Alanyl-L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (alle Gibco).

Die Passage der adhärenen Zellen erfolgte alle 3-4 Tage, indem der Zellrasen zunächst mit PBS (140 mM NaCl; 10 mM Na₂HPO₄; 3 mM KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin (Biochrom, Berlin); 0,02% EDTA in PBS, pH 7,4) bei 37°C im Brutschrank inkubiert wurden. Nach 3-5 min wurde durch Zugabe von serumhaltigem Medium die proteolytische Reaktion des Trypsin gestoppt und die Zellen für 5 min bei 250 x g und RT abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in frischem Medium resuspendiert, verdünnt und die Zellen in entsprechender Dichte ausgesät. Die Zellzahl wurde nach Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau-Lösung (0,4% Trypanblau (Sigma, Steinheim) 1:3 verdünnt in PBS) im Verhältnis 1:2 mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt, tote Zellen waren durch den aufgenommenen Farbstoff von vitalen unterscheidbar.

2.1.2 MTT-Test

Zur Ausgrenzung zytotoxischer Konzentrationen von Substanzen wurde der MTT-Test durchgeführt [215]. Die Menge an umgesetztem wasserlöslichen Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT; Sigma) zu einer was-

serunlöslichen Formazanverbindung, durch mitochondriale Dehydrogenasen katalysiert, wird photometrisch ermittelt und gilt als Maß für vitale Zellen. Nach Aussaat von 4×10^4 Zellen pro Loch in 96-Loch-Platten und Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen für 24 h wurden jeweils 20 μ l MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS) hinzugegeben und für 40 min bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde anschließend entfernt und die Zellen für 10 min in 100 μ l Lysepuffer (95% Isopropanol; 5% Methansäure) unter Schütteln lysiert. Bei einer Wellenlänge von 550 nm sowie einer Referenzwellenlänge von 690 nm wurde die Extinktion im Plattenphotometer *Synergy 2* (Biotek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall) gemessen.

2.1.3 Reporteranalyse

2.1.3.1 Transiente Transfektion

HepG2 Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die ein Reporter-System enthielten. Als Leervektor ohne Promotor, und somit Kontrolle, diente pGL3 basic (Promega, Mannheim) mit vorhandenem Reporter-Gen für die *Firefly*-Luciferase, zur Bestimmung der basalen Expression. In diesen Vektor wurden 2.111 Basen des GPx2 Promotors (GI-prom 1) kloniert. Kotransfiziert wurden ebenso pSV β -Galaktosidase (Promega) zur Normalisierung der *Firefly*-Luciferaseaktivität.

$2,5 \times 10^5$ Zellen wurden in 24-Loch-Platten ausgesät und 24 h danach mit einem Standardansatz von 0,15 μ g Reporter-Genplasmid und 0,5 μ g pSV β -Galaktosidase je Loch transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde TfxTM20 (Promega) nach Anleitung des Herstellers benutzt und entsprechend in 1,5-facher Menge der DNA-Konzentration eingesetzt. Die Stimulation mit den Substanzen SFN bzw. hydrolysiertem GRA (in entsprechenden Konzentrationen) erfolgte 24 h nach Transfektion in serumfreiem Medium. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen in je 150 μ l 1 x Reporter-Lysepuffer geerntet und bei -80°C aufbewahrt. Nach Zentrifugation des Lysates für 2 min bei 11.000 x g und 4°C konnten die Aktivitäten der β -Galaktosidase bzw. *Firefly*-Luciferase am Lumiscan Ascent (Labsystems, Finnland) gemessen werden.

2.1.3.2 Luziferase Messung

500 μ l eines Luciferingemisches (5 ml 100 mM Tris (pH 7,8); 6,2 mg Coenzym A (Sigma); 4,3 mg Luciferin (P.J.K., Kleinbittersdorf); 8,84 mg ATP (Sigma)), nach Herstellung zunächst aliquotiert und lyophilisiert, wurden in 3 ml Luciferase-Puffer (20 mM Tricin; 1,07 mM $MgCO_3$; 0,1 mM EDTA; 2,67 mM $MgSO_4$; 33,3 mM DTT, pH 7,8-8) aufgenommen und lichtgeschützt bei 37°C inkubiert. 20 μ l Lysat der transfizierten Zellen wurden in eine blickdichte 96-Loch-Platte pipettiert, mit 100 μ l Luciferin-Mix versetzt und das entstandene Lichtsignal im Luminoscan Ascent sofort erfasst.

2.1.3.3 β -Galaktosidase-Messung

Die Luciferaseaktivität konnte durch Division gemessener β -Galaktosidaseaktivität und somit Ausschluss einer schwankenden Transfektionseffizienz sowie Zellvitalität korrigiert werden. In einer 96-Loch-Platte wurden je 50 μ l des nach Transfektion gewonnenen Lysates mit 70 μ l β -Galaktosidasepuffer (120 mM Na_2HPO_4 ; 80 mM NaH_2PO_4 ; 20 mM KCl; 2 mM $MgCl_2$; 100 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,3) und 30 μ l O-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid (ONPG)-Lösung (4 mg/ml ONPG in 60 mM Na_2HPO_4 , pH 7,5) versetzt. Nach Inkubation der Platte bei 37°C wurde, nach sichtbarer Gelbfärbung, der Umsatz von ONPG zu O-Nitrophenol photometrisch bei 405 nm im Plattenphotometer MR 5000 (Dynatech, Denkendorf) bestimmt.

2.2 Tierexperimentelle Studien

Nach Genehmigung durch die zuständige Behörde erfolgten die im Folgenden beschriebenen Tierversuche entsprechend den Festlegungen des Ministeriums für Landwirtschaft, Umweltschutz und Raumordnung des Landes Brandenburg sowie den gesetzlichen Bestimmungen der *Federation of European Laboratory Animal Science Association* (FELASA). Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen (Temperatur 22°C, relative Luftfeuchte 50-60%, 12 h Tag-Nacht-Rhythmus) gehalten und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.

2.2.1 Pilotversuch

2.2.1.1 Diät

Grundlage bildete das von Altromin (C1045 enthält 50% Kohlenhydrate, 17% Protein, 5% Fett, 4% Ballaststoffe, Mikronährstoffe; Altromin, Lage) erworbene selenarme Futter auf Basis von Torulahefe, mit einem Selengehalt von 0,086 mg/kg Futter. Durch das Zumischen von Seleno-L-Methionin (Acros, Geel, Belgien) wurde selenadäquates Futter mit einem Selengehalt von 0,15 mg/kg Futter hergestellt, was dem RDA für Mäuse entspricht [216]. Der Selengehalt des Futters wurde fluorimetrisch überprüft. Beide Futtersorten wurden anschließend pelletiert.

2.2.1.2 Tiere und Versuchsablauf

80 männliche, 3 Wochen alte Mäuse vom Stamm C57/B6J (Charles River, Sulzfeld), wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten. Die Tiere wurden hinsichtlich Selendiät und SFN-Gabe eingeteilt, so dass jede Gruppe 5 Tiere zählte. 4-5 Wochen nach Vorfütterung mit entsprechender Selendiät, und dadurch eingestelltem Selenstatus, begann die orale Applikation mit SFN in nichtgefastetem Zustand. 2,5, 5 oder 10 μmol SFN, entweder durch Hydrolyse von GRA oder Synthese (Prof. L. Wessjohann, Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie, Halle) entstanden, und in 100 μl Kaliumphosphatpuffer (KP_i -Puffer; 10 mM pH 7,4) pro Tier und Tag gelöst, wurden täglich über einen Zeitraum von 1 Woche per Schlundsonde appliziert. Zugehörige Kontrollgruppen erhielten jeweils 100 μl KP_i -Puffer. Am 5. Applikationstag wurden die Tiere über 24 h in Stoffwechselkäfigen gehalten, um Urin und Fäzes zu sammeln. Die Tiere wurden direkt nach Ende der SFN-Applikation in tiefer Isoflurannarkose (Abbot, Wiesbaden) durch zervikale Dislokation getötet und sämtliche Organe des GIT, Leber, Niere und Blase entnommen, sofort mit einer in flüssigem Stickstoff gekühlten Gefrierzange schockgefroren und bis zur Organaufarbeitung bei -80°C gelagert.

Die Hydrolyse von GRA (Prof. R. Iori, Centro di ricerca per le colture industriali CRA-CIN, Bologna, Italien) mittels Myrosinase (38 U/ml in Wasser; Sigma) wurde in Kaliumphosphatpuffer (100 mM) bei konstantem pH von 7,2 für 4 h bei 37°C durchgeführt. Zur Überprüfung des korrekten Reaktionsverlaufes wurden zu Beginn der Hydrolyse

und jede weitere Stunde 20 µl für die Analytik mittels HPLC (LichroCART® RP-18e; Laufmittel Isopropanol/Wasser (10/90), UV-Detektor L7400; Merck-Hitachi, Darmstadt-Tokio) entnommen und mit einer Flussrate von 0,5 ml/min und einem Druck von 90 bis 95 bar bei 238 nm analysiert. Die Lagerung der Aliquots erfolgte nach Einstellung der entsprechenden Konzentrationen bei -20°C.

2.2.2 Entzündungsverstärkte Colonkanzerogenese durch Applikation von AOM/DSS

2.2.2.1 Diät

Auf Basis des selenarmen Futters (s. unter 2.2.1.1.) wurde auch für diesen Versuch mit Hilfe von Seleno-L-Methionin selenadäquates Futter hergestellt, sowie selensupplementiertes Futter mit einem Selengehalt von 0,6 mg/kg Futter. Alle Futtersorten wurden pelletiert. Die Einstellung des Selenstatus erfolgte durch Fütterung der Tiere für mindestens 4 Wochen vor eigentlichem Versuchsbeginn mit entsprechendem Futter.

2.2.2.2 Tiere und Versuchsablauf

Zur Versuchsdurchführung wurden Mäuse des Stammes C57/B6J gewählt, da die GPx2 KO (GPx2^{-/-}) Tiere, von Dr. Fong Fong Chu (Duarte, CA, USA) zur Verfügung gestellt, diesen Hintergrund haben. Mit Hilfe des Vektors pPNT ersetzten Chu und Mitarbeiter das Exon 1 des GPx2 Genes durch ein Neomycin Gen [146]. Nach Transfektion und Selektion dieses Genkonstruktes in embryonalen Stammzellen des Stammes 129S3/SvImJ erfolgte die Generierung von für diese Mutation homozygoten C57/B6J GPx2 KO sowie entsprechenden Wildtyp Wurfgeschwistern. Somit besaßen alle Mäuse den selben genetischen Hintergrund, B6.129S3-GPx2tm.

Die Zucht erfolgte im eigenen Institut, die Tiere wurden in IVC-Käfigen unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten. In Vorversuchen wurde das Modell der AOM/DSS-induzierten Colonkanzerogenese an männlichen C57/B6J Mäusen etabliert. Der Versuchsablauf gestaltete sich nach folgendem Design:

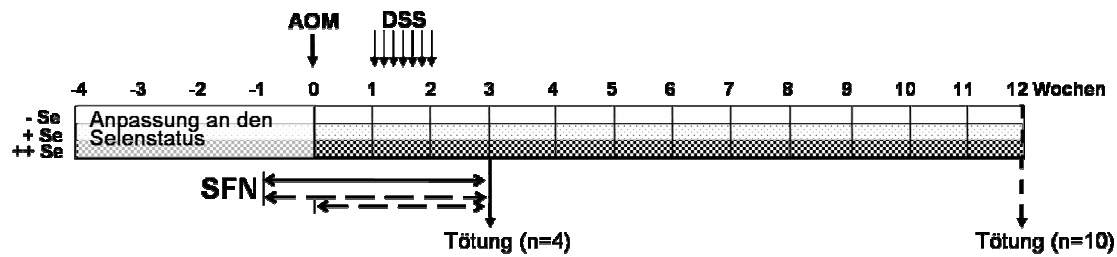


Abb. 1: Versuchsablauf zur Untersuchung der entzündungsverstärkten Colonkanzerogenese.

Se-arme (-Se), -adäquate (+Se) und -supplementierte (++Se) Mäuse wurden einmalig mit AOM i.p. injiziert und erhielten eine Woche lang DSS im Trinkwasser. SFN bzw. KPi-Puffer, als Kontrolle, wurde 2täglich verabreicht, im Kurzzeitversuch (durchgezogene Linie) über 4 Wochen bzw. im Langzeitversuch (gestrichelte Linie) über 3 bzw. 4 Wochen. 4 Mäuse pro Gruppe wurden direkt nach Beendigung der SFN-Gabe getötet um den Entzündungsstatus zu bewerten und die Apoptoserate und Enzymexpression zu bestimmen. 12 Wochen nach AOM-Applikation wurden 10 Mäuse pro Gruppe zur Auszählung von ACF und Tumoren im Colon getötet.

Die Einteilung der Tiere erfolgte hinsichtlich Genotyp, Selendiät, SFN-Gabe und AOM/DSS-Gabe in 30 Gruppen. Nach der 4-wöchigen Adaptationszeit und Einstellung des Selenstatus erhielten die Tiere alle zwei Tage über einen Zeitraum von 3 (Zeitpunkt 0) bzw. 4 Wochen (Zeitpunkt -1) 10 μmol SFN in 100 μl Kaliumphosphatpuffer (10 mM, pH 7,4) per os, die entsprechenden Kontrolltiere erhielten 100 μl des Vehikels. Eine einmalige i.p. Applikation von 10 mg AOM (Sigma) pro kg Körpergewicht, gelöst in physiologischer NaCl-Lösung (0,09%), erfolgte zum Zeitpunkt 0, die Kontrollen erhielten das entsprechende Vehikel. Eine Woche nach dieser Applikation wurde den mit AOM behandelten Tieren 1% DSS (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) im Trinkwasser über eine Dauer von 7 Tagen verabreicht, das Trinkwasser der Kontrolltiere enthielt keine Zusätze. Die Tötung der 10 Tiere erfolgte 12 Wochen nach AOM-Applikation (Zeitpunkt 12; Langzeit). Zusätzlich wurden 4 Tiere von jeder Gruppe nach exakt gleicher Behandlung direkt nach Ende der SFN-Applikation (Zeitpunkt 3; Kurzzeit) getötet um auf klinischer und histologischer Ebene Aussagen über den Entzündungsstatus in der akuten Phase zu erhalten sowie direkte Effekte von SFN auf biochemischer Ebene zu untersuchen. Das Körpergewicht wurde während der Dauer der SFN-Applikation zweitäglich notiert, später wöchentlich, des Weiteren wurde das Verhalten der Tiere beobachtet, um eventuell zu starke Leiden zu unterbinden.

Nach Narkotisierung mit Isofluran (Abbot, Wiesbaden) erfolgte eine Blutentnahme durch retrobulbäre Punktion mit heparinisierten Kapillaren. Durch zervikale Dislokation

wurden die Tiere anschließend getötet. Leber, der gesamte GIT, Nieren und Blase sowie weitere Organe wurden entnommen und bei -80°C gelagert. Für histologische Untersuchungen wurde jeweils ein Stück 1 cm vom proximalen Ende des Duodenum, vom distalen Ende des proximalen Jejunum und vom distalen Ende des Ileum in 4%ige Formaldehydlösung ((w/v) phosphatgepuffert pH 7,4; Roth, Karlsruhe) fixiert. Vom Colon wurden im Kurzzeitversuch 2 cm proximal für biochemische Untersuchungen bei -80°C gelagert, der Rest für immunhistochemische Färbungen (s. 2.5), zur Ermittlung der Apoptoserate (s. 2.5.5) sowie zur Beurteilung des Entzündungsstatus gerollt (s. 2.5.4). Im Langzeitversuch wurde das Colon zur Auszählung von Tumoren und ACF (2.6.3.) aufgespannt und in 4%ige Formaldehydlösung bis zur weiteren Bearbeitung asserviert. Nach 10-minütiger Zentrifugation der festen Blutbestandteile bei $3.000 \times g$ und 4°C wurde das Plasma abgenommen und ebenfalls bei -80°C gelagert.

2.2.2.3 Genotypisierung

Die Schwanzbiopsie einer jeden Maus im Alter von wenigen Tagen diente zur Genotypisierung. Nach proteolytischem Verdau mit einem Mix aus $39,5 \mu\text{l}$ sterilem Wasser, $5 \mu\text{l}$ $10 \times$ Gitschierpuffer (670 mM Tris-HCl pH 8,8; 166 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 65 mM MgCl_2 ; $0,5\%$ Triton X-100), $5 \mu\text{l}$ Proteinase K (10 mg/ml) und $0,5 \mu\text{l}$ β -Mercaptoethanol für mindestens 3 h bei 50°C und 1.000 U/min erfolgte die Hitzeinaktivierung der Proteinase K für 10 min bei 95°C . In der anschließenden PCR wurde $1 \mu\text{l}$ der genomische DNA als Template eingesetzt und mit für den Genotyp spezifischen Primerpaaren das entsprechende Fragment amplifiziert. Jeder PCR-Mix pro Probe bestand aus folgendem Ansatz:

Tab. 2: PCR-Ansatz zur Genotypisierung

Reagenzien	V [μl]	Endkonzentration	Firma /Sequenz der Oligonukleotide
10 x Green Puffer	2,5	1,5 mM	Fermentas, Leon-Rot
MgCl_2 (25 mM)	1,5	0,25 μM	Sigma
dNTPs (je 2,5 mM)	0,5	je 50 μM	Fermentas, Leon-Rot
Primer MPxin09 (25 mM)	0,5	0,25 μM	5'-TCCATGCCAACGTAGTGATT-3'
Primer GIGPx fwd (25 mM)	0,5	0,25 μM	5'-CCCACCTGTCTAGAGGACTTA-3'
Primer pNTpgK1 (25 mM)	0,5	0,25 μM	5'-CAGTTTCATAGCCTGAAGAACGAGAT-3'
H_2O ad 25 μl	18,27		
Taq-Polymerase (5 U/ μl)	0,125	0,625 U	(True Start) Fermentas, Leon-Rot
template	1		

Der einmaligen Denaturierung für 2 min bei 95°C folgten 40 sich wiederholende Zyklen aus: 30 s 95°C, 30 s 61°C, 45 s 72°C sowie eine abschließende Elongation für 10 min bei 72°C. In einem 1,5%igen Agarosegel in TBE-Puffer (89 mM Tris; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA pH 8) wurden 10 µl der PCR-Produkte, mit 3 µl 10 x DNA-Ladepuffer (20 % (w/v) Ficoll®400; 0,1 M EDTA pH 8; 1% SDS; 0,025% Bromphenolblau) versetzt, bei 80 V aufgetrennt. Das Gel wurde nach dieser Flachbettgelelektrophorese (Biometra, Göttingen) 5 min mit Ethidiumbromid (5 µg/ml in TBE-Puffer) angefärbt und 2 x 5 min in Wasser entfärbt. Mit Hilfe des GelDoc™ 2000 Systems und der Software QuantityOne 4.2.3 (BioRad, München) konnten die Genotypen der Mäuse festgestellt werden: die WT-PCR mit der Primerkombination MPxin09 und GIGPx forward ergab ein 450 bp großes Produkt, die KO-PCR mit der Primerkombination MPxin09 und pNTpgK1 hingegen ein Fragment mit 480 bp.

2.3 Bestimmung des Selengehaltes in organischem Material

Zur fluorimetrischen Bestimmung des Selengehaltes in Futter und Plasma ist das Vorhandensein von Se in freier Form notwendig [217]. Durch Zugabe von 500 µl Säuremix (65%ige HNO₃ / 70%ige HClO₄, 4:1, v/v) zu 60-80 mg Futter bzw. 30 µl Plasma, verdünnt mit 100 µl Wasser, für 30 min bei 100°C, 30 min bei 120°C und 120 min bei 190°C (Thermostat VLM 4.0 Heizblock, VLM GmbH, Leopoldshöhe), wurde das organisch oder anorganisch gebundene Se gelöst und zu Se (VI) oxidiert. Nach Zugabe von 500 µl HCl (37%) zu den auf RT abgekühlten Proben wurden sie abermals für 15 min bei 90°C und 45 min bei 150°C erhitzt, wodurch eine Reduktion von Se (VI) zu Se (IV) erfolgte. 2 ml EDTA (2,5 mM pH 8) und 500 µl DAN (6,3 mM in 0,1 M HCl) wurden zu den abgekühlten Proben gegeben, die Inkubation für 30 min bei 55°C führte zur Bildung eines Komplex zwischen DAN und Se. 24 h nach der Extraktion mit Cyclohexan erfolgte die fluorimetrische Analyse der Proben am AB2 Lumineszenzspektrometer (SLM-AMINICO®) bei λ_{ex} 346 nm/ λ_{em} 520 nm. Eine Standardreihe aus einer AAS-Standardlösung (Sigma-Aldrich, München) mit Konzentrationen von 0 bis 450 µg Se/l diente der Quantifizierung des gemessenen Selengehaltes.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Herstellung von Extrakten

2.4.1.1 Organaufarbeitung / Herstellung von Organlysaten

Zur Gewinnung von Proteinlysaten wurden 20-30 mg homogenes Gewebepulver in 500 μ l Homogenisationspuffer (100 mM Tris; 300 mM KCl; 0,1% Triton X-100, pH 7,6) und 4 μ l *Protease Inhibitor Cocktail* (Calbiochem, Bad Soden) eingewogen und mit Hilfe einer sterilen Metallkugel im *Tissue Lyzer* (Qiagen, Hilden) aufgeschlossen. Dabei wurde darauf geachtet, dass alle verwendeten Materialien und Proben gekühlt waren. Nach Zentrifugation für 15 min, bei 15.000 x g und 4°C wurde der Überstand abgenommen und die Lysate bei -80°C gelagert.

2.4.1.2 Herstellung von Zelllysate

Nach Absaugen des Mediums und 2maligem Waschen des Zellrasens mit PBS wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin/EDTA Lösung geerntet. Das Zellpellet, durch Zentrifugation für 5 min bei 250 x g bei 4°C gewonnen, wurde nach Waschen mit PBS und wiederholter Zentrifugation in 200 μ l Homogenisationspuffer resuspendiert. Eine Ultraschallbehandlung (Ultraschallprozessor UP 50H, Teltow) über 10 Stöße bei einer Amplitude von 70% und einer Frequenz von 0,5 s erfolgte vor Abtrennung der Zelltrümmer durch Zentrifugation für 15 min bei 21.000 x g und 4°C und Überführung des cytosolischen Überstandes in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf).

2.4.1.3 Gewinnung von Kernextrakten

Der Zellrasen wurde 2mal mit PBS gewaschen, abgeschabt und in 2 x 5 ml eiskaltem PBS in 15 ml Reaktionsgefäße aufgenommen. Nach Zentrifugation für 5 min bei 250 x g und 4°C und Resuspension des Pellets in 400 μ l hypotonischem Homogenisationspuffer (20 mM HEPES; 1 mM EDTA; 1 μ l/ml Protease-Inhibitor Cocktail Set III (Merck, Darmstadt); 200 nM Na_4VO_3 , pH 7,5) wurde mit Hilfe des Potter-S-Homogenisators (B. Braun Biotech International, Melsungen) mechanisch (50 x, auf Eis) ein Homogenat hergestellt. Eine Trennung des Cytosols von den Kernen erfolgte durch Zentrifugation

für 30 min bei 720 x g und 4°C, das dabei entstandene Pellet wurde wiederum in 200 µl hypotonem Homogenisationspuffer resuspendiert. Ein Aufschluss der Kerne wurde mit 20 Stößen Ultraschall bei einer Amplitude von 80% und Frequenz von 0,5 s erreicht, so dass der Überstand nach Zentrifugation für 30 min bei 720 x g und 4°C als Kernextrakt verwendet werden konnte.

2.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde nach der von Bradford beschriebenen Methode bestimmt [218]. In einer 96-Loch-Platte wurden 10 µl einer jeden vorher verdünnten Probe in Triplikaten mit 200 µl Bradford-Färbelösung (1:5 verdünnt, BioRad, München) für 15 min bei RT inkubiert. Die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 630 nm erfolgte im Plattenphotometer *Synergy 2* (Biotek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall). Die Eichgerade einer BSA-(Protein Assay Standard II, BioRad) Standardreihe mit bekannten Konzentrationen von 20 bis 300 µg/ml, in Wasser gelöst, diente der Quantifizierung.

2.4.3 Bestimmung von Enzymaktivitäten

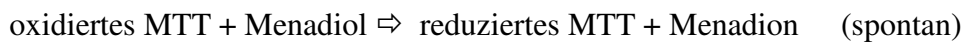
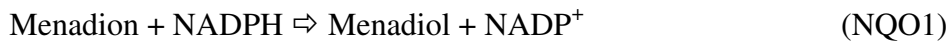
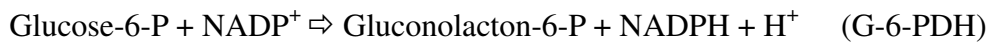
Alle Enzymaktivitäten, in Triplikaten pipettiert, wurden mit Hilfe des Plattenphotometers *Synergy 2* (Biotek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall) in 96-Loch-Platten gemessen. Die gemessenen Werte wurden auf 1 cm Füllhöhe korrigiert um das Lambert-Beer'sche Gesetz anwenden zu können. Die ermittelten Extinktionsänderungen pro Minute bildeten die Grundlage zur Berechnung der Enzymaktivitäten in mU/mg Protein unter Nutzung des entsprechenden millimolaren Extinktionskoeffizienten (Tab. 3).

Tab. 3: Endprodukt der Enzymaktivitätsmessung und entsprechender molarer Extinktionsfaktor

Enzymaktivität	Messung	Molarer Extinktionskoeffizient ϵ [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
NQO1	Bildung von Formazan	11,961
TrxR	Bildung von TNB	13,6
GPx	Abnahme von NADPH	6,3
GST	Bildung von DNP-S-Glutathion	9,6

2.4.3.1 NQO1-Aktivität

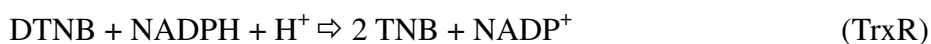
Die NQO1-Aktivität basiert auf der Reduktion von 3-(4,5-Dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid (MTT) zum blauen Formazan, welche NAD(P)H-abhängig durch Menadion vermittelt wird [219, 220]:



3 µl Probenlysat wurden in Triplikaten in einer 96-Loch-Platte mit 50 µl Wasser bzw. Stopplösung (0,3 mM Dicumarol; 0,5% DMSO; 0,5 mM KP_1 (pH 7,4)) und 197 µl Reaktionsmix (25 mM Tris-HCl (pH 7,4); 665 mg/l BSA; 9,9% Tween 20; 5 µM FAD; 1 mM Glucose-6-Phosphat; 30 µM NADP; 300 mg/l MTT; Zugabe von 0,3 U/µl Glucose-6-Phosphatdehydrogenase und 50 µM Menadion erst direkt vor Messbeginn) versetzt. Die Messung der Absorptionsänderung erfolgte über einen Zeitraum von 5 min bei 590 nm. Die Bestimmung der NQO1-Aktivität in vitro fand nach Inkubation der HepG2-Zellen mit 50 µl Lysepuffer (0,8% Digitonin; 2 mM EDTA pH 7,8) für 10 min bei 37°C und 10 min schüttelnd bei RT nach gleichem Prinzip durch Zugabe von Wasser bzw. Stopplösung und 200 µl Reaktionsmix statt. Die Aktivität wurde dann auf die Zellviabilität durch die Behandlung, via MTT ermittelt, bezogen.

2.4.3.2 TrxR-Aktivität

TrxR setzt unter Verbrauch von NADPH DTNB zu TNB um [221]:

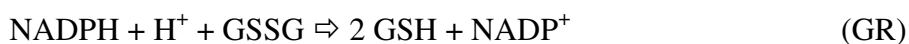
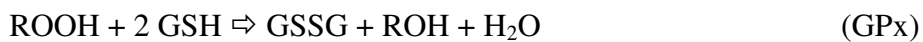


25 µl Probenlysat wurden mit 185 µl Reaktionspuffer (100 mM Kaliumphosphat; 2 mM EDTA, pH 7,4) und 15 µl DTNB (50 mM in DMSO) in einer 96-Loch-Platte gemischt. Durch Zugabe von 25 µl NADPH (2 mM in Reaktionspuffer) mittels Dispenser des auf 25°C temperierten Plattenphotometers wurde die Reaktion gestartet und die Änderung der Absorption durch entstandenes TNB bei 412 nm über 2 min gemessen. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der unspezifischen, TrxR-unabhängigen Umwandlung von

DTNB zu TNB, ohne Zugabe von NADPH. Diese Messwerte wurden bei der Ermittlung der TrxR-Aktivität berücksichtigt.

2.4.3.3 GPx-Aktivität

Ein Glutathionreduktase (GR)-gekoppelter Test mit folgenden zugrunde liegenden Reaktionen wurde zur Messung der GPx Gesamtaktivität genutzt [222]:



17,5 μl Probenlysat und 222,5 μl Reaktionsmix (100 mM Tris/HCl, pH 7,6; 5 mM EDTA; 1 mM NaN_3 ; 3 mM GSH; 0,1 mM NADPH; 0,1% Triton X-100; 600 mU GR (Sigma)) wurden in einer 96-Loch-Platte für 10 min bei 37°C inkubiert. Mit Hilfe des Dispensers des Plattenphotometers *Synergy 2* wurden 10 μl H_2O_2 (finale Konzentration 50 μM) zugegeben und die durch Verbrauch von NADPH resultierende Änderung der Absorption bei 340 nm über einen Zeitraum von 2 min gemessen. Für die Messung der spezifischen GPx4-Aktivität wurde als Substrat PCOOH verwendet.

2.4.3.4 GST-Aktivität

Die GST Gesamtaktivität wurde über die Konjugation von CDNB mit GSH nach der Methode von Habig [223] verfolgt:



Je Loch einer 96-Loch-Platte wurden 180 μl CDNB-Lösung (30 mM in Ethanol; 100 mM NaP_i , pH 6,5) vorgelegt und 10 μl Probenlysat hinzugegeben. Durch Zugabe von 10 μl reduziertem GSH (100 mM in NaP_i , pH 6,5) mittels Dispenser wurde die Reaktion gestartet und bei 340 nm über 5 min die Zunahme der Extinktion gemessen.

2.4.4 SDS PAGE und Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren, mit welchem Proteine nach elektrophoretischer Auftrennung nach Molekülgröße per eindimensionaler diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) [224] und Transfer auf eine Träger-

membran immunochemisch mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Je Probe wurde zunächst die gleiche Menge an Proteinen 5 min bei 95°C in 1 x reduzierendem Laemmli-Puffer (62,5 mM Tris pH 6,8; 10% Glycerin; 2% SDS; 2,5% β -Mercaptoethanol; 1,25% Bromphenolblau) vollständig denaturiert. Die PAGE erfolgte mit Hilfe von 12,5%igen Polyacrylamidgelen (Tab. 4) in einer Minigelapparatur (Biometra, Göttingen) bei einer Stromstärke von 15 mA pro Gel in Elektrophoresepuffer (25 mM Tris; 200 mM Glycin; 0,1% SDS; pH 8,3) nachdem die Proteine im großporigen Sammelgel fokussiert wurden. Ein Proteinmarker (Fermentas, Leon-Rot) wurde zur Größenbestimmung mitgeführt.

Tab. 4: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel

Reagenzien	Firma	Sammelgel	Trenngel
40% AA (29:1)	Roth, Karlsruhe	5%	12,5%
Tris-HCl pH 6,8		0,125 M	-
Tris-HCl pH 8,8		-	0,375 M
SDS		0,1%	0,1%
APS	Merck, Darmstadt	0,1%	0,1%
TEMED	Serva, Heidelberg	0,1%	0,1%

Nach Auftrennung wurden die Proteine per *semi-dry*-Verfahren mit Hilfe einer *Hoefer®SemiPhor™* Blotapparatur (Amersham Bioscience, Freiburg) auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen. Ein Sandwich aus mehreren, in Blotpuffer (25 mM Tris; 100 mM Glycin; 15% Methanol; pH 8,3) eingelegten Filterpapieren, Gel und Membran ermöglichte diesen Transfer über 2 h bei 4°C und einer Stromstärke von 1,2 mA/cm². Durch reversibles Anfärben der Membran mit Fast Green (0,1% Fast Green (Sigma); 10% Essigsäure; 30% Ethanol) wurde die Blot-Effizienz überprüft. Die Färbung der restlichen Proteine im Gel nach dem Blotten erfolgte für 1 h in Coomassie-Färbelösung (0,1% Coomassie Brilliant-Blue R-250 (Serva, Heidelberg); 10% Essigsäure; 42,5% Ethanol; 5% Methanol). Mit Fixierlösung (7% Essigsäure; 10% Methanol) wurde entfärbt.

Unspezifische Bindungen auf der Membran wurden für 1 h mit Hilfe von 5% Magermilch in TTBS (50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween 20; pH 7,5) blockiert. Nach mehrmaligem Waschen der Membran mit TTBS erfolgte die Inkubation mit dem verdünnten Primärantikörper ü.N. bei 4°C (Tab. 7).

Ungebundene Antikörper wurden durch mehrmaliges Waschen der Membran mit TTBS entfernt. Nach 1 h Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (Tab. 7) bei RT und erneutem Waschen mit TTBS erfolgte die Visualisierung der Immunreaktion durch Inkubation der Membran mit dem Luminolhaltigem Reagenz *Supersignal® West Dura* (Perbio, Bonn). Mit Hilfe des Fuji LAS3000-CCD-Kamerasystems wurde die Chemilumineszenz detektiert, die densitometrische Auswertung der Proteinbanden erfolgte mit der Software *Aida/2D Densitometry 4.0* (Raytest, Straubenhardt).

2.5 Histologie und Immunhistochemie

Bei der Organentnahme wurden entsprechende Gewebeproben (s. 2.2.2.2) sofort in 4%ige gepufferte Formaldehydlösung gegeben und für 24 h fixiert, bevor sie anschließend für 24 h unter fließendem Leitungswasser gewässert wurden. Die Entwässerung erfolgte über eine aufsteigende Ethanolkonzentration sowie Toluol (Tab. 5) im Hypercenter® XP (Shandon, Frankfurt), die Einbettung in mit Paraffin Typ 9 (Richard Allan Scientific, Walldorf) gefüllte Einbettkassetten (Engelbrecht, Edermünde) im Histocentre 2 (Shandon, Frankfurt).

Tab. 5: Entwässerung

Medium	Temperatur [°C]	Vakuum?	Zeit [h]
Ethanol 55%	40	-	0:45
Ethanol 70%	40	-	1:00
Ethanol 96%	40	-	1:00
Ethanol 96%	40	mit	1:30
Ethanol 100%	40	-	1:30
Ethanol 100%	40	mit	2:30
Toluol	40	mit	1:30
Toluol	40	mit	2:30
Paraffin Typ 6	60	mit	1:45
Paraffin Typ 6	60	mit	2:45

Mit Hilfe des Mikrotoms *Cool Cut HM355S* (Mikrom, Walldorf) wurden 2 µm dünne Schnitte angefertigt und auf beschichtete Objektträger (Engelbrecht, Edermünde) gezogen. Für anschließende histologische Untersuchungen wurden die Schnitte mit Hilfe des Varistain XY (Shandon, Frankfurt) über Toluol sowie eine absteigende Ethanolreihe

entparaffiniert und rehydriert. Das Dehydrieren nach Behandlung der Schnitte mit entsprechenden Antikörpern bzw. Färbungen erfolgte im selben Automaten (Tab. 6), anschließend wurden die Schnitte mit Hilfe von Histofluid (Engelbrecht, Edermünde) und einem Deckgläschen (Engelbrecht, Edermünde) verschlossen.

Tab. 6: Rehydrieren und Dehydrieren der Schnitte

Rehydrieren		Dehydrieren	
Medium	Zeit [min]	Medium	Zeit [min]
Toluol	2:00	Aqua dest.	1:00
Toluol	3:00	Ethanol 70%	0:30
Ethanol 100%	2:00	Ethanol 96%	0:30
Ethanol 100%	3:00	Ethanol 100%	2:00
Ethanol 96%	2:00	Ethanol 100%	3:00
Ethanol 70%	2:00	Toluol	2:00
Ethanol 40%	2:00	Toluol	3:00
Aqua dest.	2:00		

2.5.1 H&E-Färbung

Rehydrierte Schnitte wurden für 1 min in eine Küvette mit Mayers Hämalaun (1 g Hämatoxylin (Merck, Darmstadt) in 1.000 ml Aqua dest.; 200 mg Natriumjodat; 50 g Kalialaun; 50 g Chloralhydrat; 1 g Zitronensäure) gestellt, anschließend für 6 min in fließendem Leitungswasser gewaschen sowie mit Aqua dest. abgespült. Nach der Färbung mit 1%igem wässrigen Eosin-Y (Fluka, Deisenhofen) für 50 s und dem Spülen mit Leitungswasser für 20 s sowie mit Aqua dest. wurden die Schnitte entwässert (Tab. 6) und mit Deckgläschen eingeschlossen.

2.5.2 Immunhistochemie

Rehydrierte Schnitte wurden zunächst in Citratpuffer (pH 6; Dako, Hamburg) gestellt und einer, bei einer Leistung von 180 W, 2 x 4minütigen Mikrowellen-Vorbehandlung (MWV) unterzogen, um Bindestellen von Antikörpern zu demaskieren. Nach Abkühlung und Spülung mit Aqua dest. wurden endogene Peroxidasen blockiert, indem die Schnitte für 10 min mit 3% (v/v) H₂O₂ inkubiert wurden. Anschließend wurde mit Aqua dest. sowie TBS/T (5 mM Tris; 130 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween 20; pH 7,6) gespült. Mit Hilfe eines DAKO-Pen (Dako, Hamburg) wurden die Schnitte eingegrenzt, die Inkubation mit entsprechendem Primärantikörper (Tab. 7), verdünnt in *Antibody Diluent*

with *Background Reducing Components* (Dako, Hamburg), erfolgte ü. N. bei 4°C (Ausnahme: CD3 1h bei RT) in einer Feuchtekammer.

Nach 2maligem Waschen der Schnitte für 5 min in TBS/T sowie einmal mit TBS erfolgte die Inkubation mit Histofine® *Simple Stain Mouse MAX PO* (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan), einem kommerziellen POD-konjugierten Sekundärantikörper gegen Kaninchen, für 30 min bei RT. Durch wiederholtes Waschen mit TBS/T bzw. TBS (5 mM Tris; 130 mM NaCl; pH 7,6) wurde nicht gebundener Antikörper entfernt. Anschließend wurden die Schnitte für 30 s mit DAB-Substrat-Chromogen System (Dako, Hamburg) inkubiert und somit die Peroxidase aufgrund der Immunreaktion visualisiert. Wenn erforderlich, erfolgte nach Stoppen der Reaktion durch sofortiges Spülen mit Aqua dest. das Anfärben der Kerne (KF) durch Behandlung mit Mayers Hämalaun (s. 2.5.1) für 1 min und anschließendem Spülen in Leitungswasser bzw. Aqua dest. Danach wurden die Schnitte entwässert (Tab. 6) und mit Deckgläschen bedeckt.

Tab. 7: Im Western Blot (WB) und in der Histologie verwendete Antikörper

Antikörper	Produkt / Firma	WB		Histologie	
		Verdünnung	Verdünnung	KF	MWV
<i>Primärantikörper</i>					
Kaninchen-anti-Human CD3	A0452; DAKO, Hamburg		1:300	mit	mit
Kaninchen-anti-Maus GPx1	ab22604; abcam, Cambridge, UK	1:8.000	1:6.000	-	mit
Kaninchen-anti-Human GPx2	Antiserum; GBF, Braunschweig	1:5.000	1:20.000	-	mit
Kaninchen-anti-Human-Nrf2	H-300; Santa Cruz, USA	1:1.000			
Kaninchen-anti-Maus NQO1	ab34173; abcam, Cambridge, UK	1:3.000	1:400	-	mit
<i>Sekundärantikörper</i>					
Ziege-anti-Kaninchen-IgG-POD	AP307P; Chemicon, Hofheim	1:50.000	-		

2.5.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte deskriptiv. Des Weiteren wurde die Verteilung der Färbung über das proximale, transverse und distale Colon (Abb. 2A) sowie die zelluläre und subzelluläre Lokalisation innerhalb der Colorkrypten und deren Intensität über ein Punktesystem bewertet. Die Colorkrypten wurden hierfür in die folgenden 3 Kompartimente geteilt: die luminale Kryptenspitze, die Kryptenmitte sowie den basalen Kryptengrund (Abb. 2B). Bereiche, die nicht gefärbt waren, erhielten 0 Punkte, für schwach bis stark gefärbte Bereiche wurden 1 bis 3 Punkte vergeben.

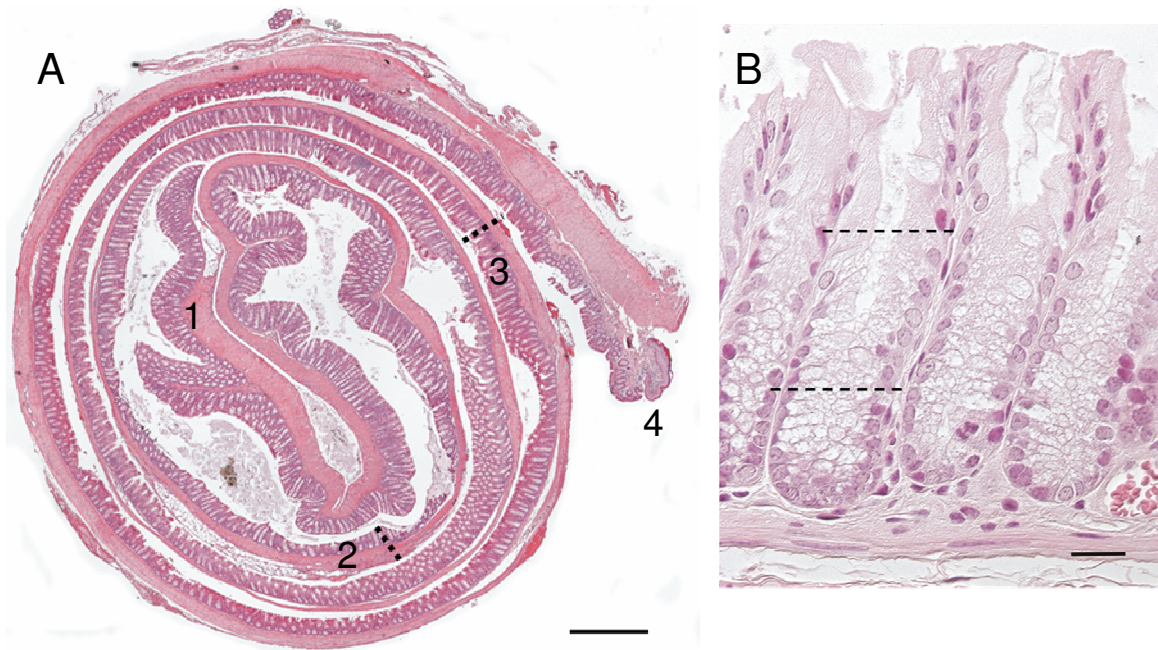


Abb. 2: *Colon swiss role* und Colorkrypte

(A) Exemplarische Darstellung eines H&E-Schnittes der *colon swiss role*. Gestrichelte Linien kennzeichnen die Einteilung in proximales (1), transverses (2) und distales (3) Colon und Anus (4). Der schwarze Balken entspricht einer Länge von 500 µm. (B) Darstellung von Colorkrypten im H&E-Schnitt. Gestrichelte Linien kennzeichnen die Einteilung in den basalen Kryptengrund, die Kryptenmitte und die luminale Kryptenspitze. Der schwarze Balken entspricht einer Länge von 20 µm.

2.5.4 Erfassung des Entzündungsscores

Gewebeschnitte des gerollten Colon (*colon swiss roles*) mit H&E Färbung (Abb. 2A) wurden zur Bewertung des Entzündungsstatus genutzt, wobei ein Bewertungssystem entwickelt wurde, welches sich an zuvor beschriebenen Entzündungsscores orientiert [225, 226]. Schnitte mit Anti-CD3 gefärbten Immunzellen-Oberflächenmarkern unterstützten diese Aussagen. In Tab. 8 sind die Kriterien mit entsprechender Bewertung dargestellt, Punkte wurden entsprechend des Schweregrades der Veränderung vergeben. Eine Maximalpunktzahl von 16 entsprach dem ausgeprägtesten Entzündungsgrad.

Tab. 8: Histologischer Entzündungsscore

Kriterium	Ausmaß	score
<i>Klinische Daten</i>		
Gewichtsverlust	1 - 2 g	1
	> 2 g	2
Stuhlverfärbung / Blut im Stuhl	ja	1
Veränderung der Stuhlkonsistenz / Diarrhoe	1 – 6 d	1
	ab 7 d	2
<i>Makroskopie</i>		
sichtbare Veränderungen des Colon bei Entnahme (Schwellung, Verdickung, Entzündung, Tumore)	leicht	1
	mäßig	2
	stark	3
<i>Mikroskopie</i>		
Ödem der Mukosa / Submukosa	ja	1
Einblutungen	ja	1
Mucosaverlust	mäßig	1
	stark	2
Kryptenarchitektur	gestört	1
entzündliches Infiltrat	schwach	1
	mäßig	2
	stark	3
		16

2.5.5 Quantifizierung von Apoptosen und Mitosen

Apoptotische sowie mitotische Zellen (Abb. 3) wurden in Gewebeschnitten der Colonrollen mit H-Färbung (s. 2.5.1) gezählt. Apoptosen können durch morphologische Veränderungen, wie Zellschrumpfung und Kondensation des Kerns wahrgenommen werden. Mitotische Zellen hingegen sind deutlich erkennbar durch typische Merkmale entsprechender Phasen wie Chromatinkondensation, Chromosomenformation, äquatoriale Ausrichtung sowie Chromatidenwanderung und Zellteilung. Gezählt wurden entsprechende Zellen in 300 intakten Krypten, mit Einteilung dieser in 4 Viertel. Vor Erfassung wurden die Proben verblindet.

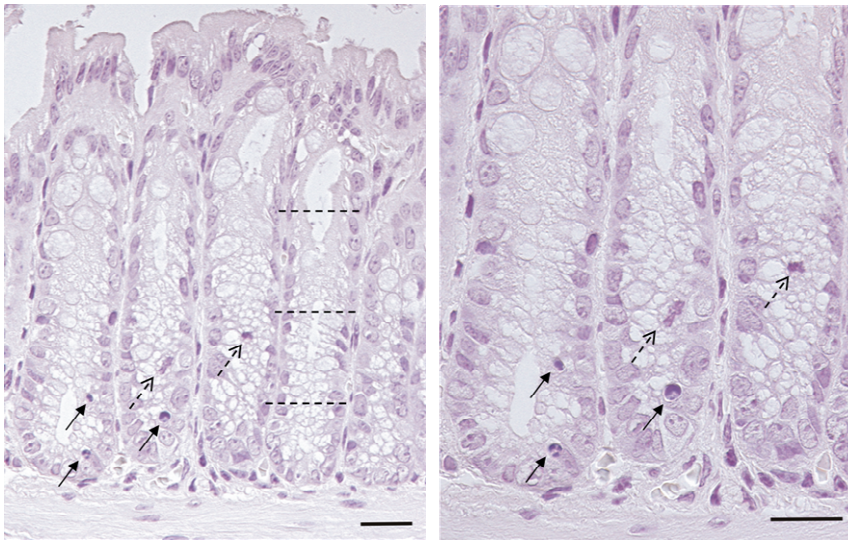


Abb. 3: Apoptotische und mitotische Zellen im distalen Colon

Beispiele für apoptotische (durchgezogene Pfeile) und mitotische (gestrichelte Pfeile) Zellen in H-gefärbten Colonschnitten 12 Wochen alter Tiere. Gestrichelte Linien kennzeichnen die Einteilung der Krypten in 4 Viertel. Der schwarze Balken entspricht einer Länge von 20 μm .

2.5.6 Erfassung von Tumoren und ACF

Das Colon (Langzeit) wurde bei Organentnahme längs geöffnet und leicht gestreckt zwischen 2 Filterpapieren in 4%iger Formaldehydlösung fixiert. Durch Anfärbung mit 0,1% Methylenblau in PBS für 3 min wurden vorhandene Neubildungen und ACF (Abb. 4) deutlich sichtbar und konnten im Stereomikroskop SZ-STU2 (Olympus, Japan) bei 40-facher Vergrößerung erfasst werden. Die Bewertung erfolgte im Blindversuch.

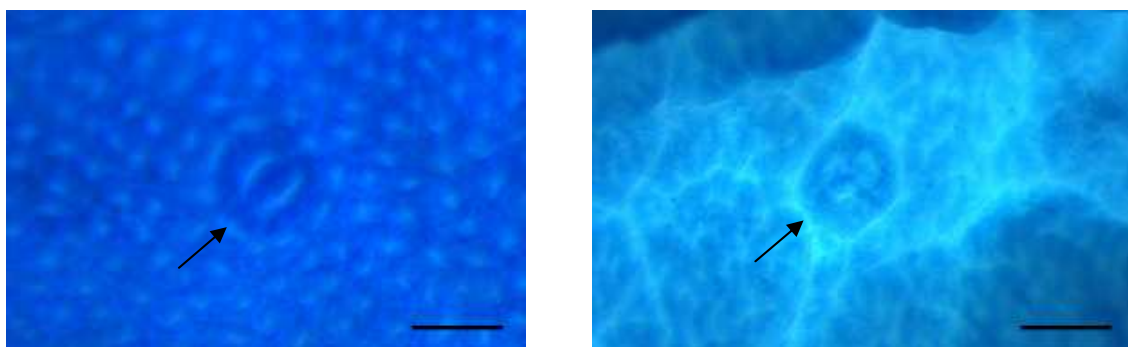


Abb. 4: ACF im Colon

Beispiele für ACF (Pfeil) aus 2 (links) bzw. 3 (rechts) Krypten pro Focus in Methylenblau-gefärbter Colonnukosa von 21 Wochen alten Tieren. Kryptenlumen erscheinen als weiße Punkte. Der schwarze Balken entspricht einer Länge von 200 μm .

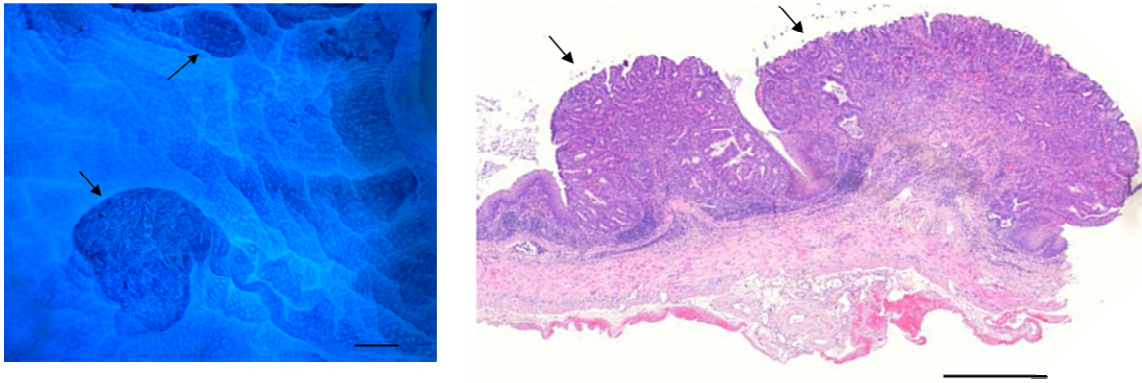


Abb. 5: Adenome im distalen Colon

Beispiele für Adenome (Pfeil) in Methylenblau-gefärbter Colonmukosa (links) bzw. H&E-Schnitt (rechts). Der schwarze Balken entspricht einer Länge von 500 μm .

2.6 Statistik

Alle *in vitro* Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden berechnet. *In vivo* Experimente wurden, wie angegeben, mit je 4, 5 bzw. 10 Tieren pro Gruppe durchgeführt. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism[®] Version 5 (San Diego, USA) unter Nutzung entsprechend angegebener Tests ermittelt. Als statistisch signifikant galten Unterschiede von $p \leq 0.05$.

3 Ergebnisse

3.1 Ermittlung der optimalen SFN-Konzentration und -Form *in vitro*

Um optimale Bedingungen auf die Enzyminduktion zunächst *in vitro* zu analysieren, wurden verschiedene Konzentrationen des intakten GRA sowie durch Myrosinase hydrolysiertes GRA und synthetisches SFN in HepG2 Zellen verglichen. Neben der Untersuchung der nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors Nrf2 wurden typische Nrf2-Zielgene gewählt und somit die Effekte auf die Transaktivierung des GPx2-Promotors sowie die Aktivität von NQO1 gemessen. Dabei wurden Konzentrationen genutzt, die die Zellviabilität nicht beeinflussten. Untersuchungen der Zytotoxizität der Substanzen in HepG2 Zellen mittels MTT-Assay ergaben, dass bei einer Konzentration von 10 μM die Zellviabilität minimal beeinflusst wurde, ab 15 μM jedoch eine Reduktion auf 60% zu beobachten war (nicht gezeigt).

3.1.1 Die nukleäre Translokation von Nrf2 ist abhängig von der Form und Konzentration von SFN

Um den Effekt von hydrolysiertem GRA und synthetischem SFN auf die Translokation von Nrf2 zu vergleichen, sowie einen Effekt von unhydrolysiertem GRA auszuschließen, wurden HepG2 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Substanzen behandelt. Nach 4 h wurde geerntet und die Kernfraktion isoliert. Wie in Abb. 6 zu erkennen ist, war eine gesteigerte Translokation von Nrf2 in den Kern mit hydrolysiertem GRA zu erkennen, bereits ab 2,5 μM war diese signifikant höher als die Kontrolle, und nahm mit steigender Konzentration zu. Auch synthetisches SFN führte zu einer dosisabhängigen Steigerung der Nrf2 Translokation, welche im Vergleich zur natürlichen Form tendenziell größer war. Ab einer Konzentration von 10 μM war eine Sättigung der Induktion erreicht. Im Gegensatz dazu bewirkte unhydrolysiertes GRA keine nukleäre Translokation von Nrf2.

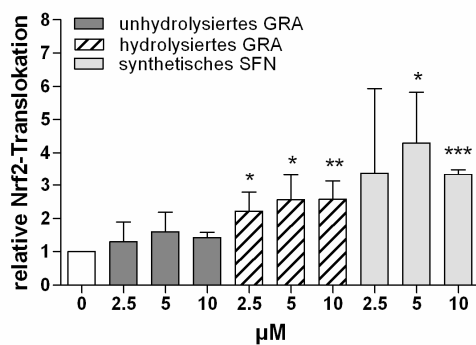


Abb. 6: Translokation von Nrf2 in den Kern
 HepG2 Zellen wurden für 4 h mit den angegebenen Substanzen und Konzentrationen behandelt und mittels Western Blot vorhandenes Nrf2 in der Zellkernfraktion detektiert. Normalisiert wurde auf Coomassie-Gelfärbung. MW±SD (n=3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. die unbehandelte Kontrolle (0; auf 1 gesetzt) mittels Students T-Test.

3.1.2 Die NQO1-Aktivität korreliert mit der SFN-induzierten Nrf2 Translokation

Um die Effekte von hydrolysiertem GRA und synthetischem SFN sowie die der nicht-hydrolysierten Glucosinolatvorstufe auf der Ebene der Aktivität eines typischen SFN-induzierbaren Phase II Enzyms [17] zu vergleichen, wurde NQO1 48 Stunden nach Behandlung von HepG2 Zellen mit unhydrolysiertem bzw. hydrolysiertem GRA, sowie synthetischem SFN gemessen (Abb. 7). Sowohl die Behandlung mit hydrolysiertem GRA als auch synthetischem SFN führte zu signifikant höheren Aktivitäten, verglichen mit der Kontrolle. Nichthydrolysiertes GRA beeinflusste die NQO1-Aktivität in HepG2 Zellen nicht.

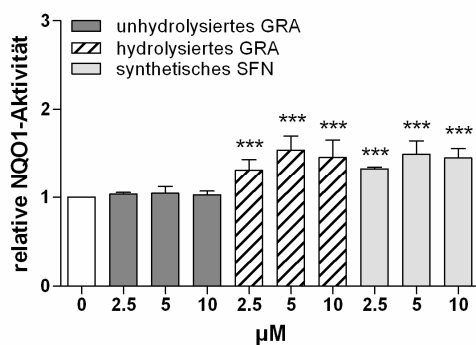


Abb. 7: NQO1-Aktivität
 HepG2 Zellen wurden 48 h nach Behandlung mit steigender Konzentration der entsprechenden Substanzen geerntet. Die relative NQO1-Aktivität der behandelten Zellen wurde auf die der unbehandelten Zellen (0; auf 1 gesetzt) bezogen. MW±SD, n=3. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle mittels Students T-Test.

Bei Behandlung von HepG2 Zellen mit einer konstanten Konzentration von 5 µM SFN über verschiedene Zeiträume, wurde zunächst mit längerer Inkubationsdauer eine zunehmende NQO1-Aktivität beobachtet, die nach 48 h ein Maximum erreichte. Nach 72 bzw. 96 h wurden geringere Aktivitäten gemessen, welche dennoch höher waren als die der Kontrolle (nicht gezeigt). Es ist daher von einem SFN-vermittelten Effekt in Abhängigkeit der Behandlungsdauer auszugehen.

3.1.3 Die Aktivierung des GPx2 Promotors durch SFN und hydrolysiertes GRA ist vergleichbar

Als neues Nrf2 Zielgen [169] wurde GPx2 auf Promotorebene untersucht, da es für die Bestimmung der GPx2-Aktivität kein spezifisches Substrat gibt. Deshalb wurde im Anschluss geprüft, ob auch der Promotor von GPx2 durch hydrolysiertes GRA und synthetisches SFN induziert werden kann. Hierfür wurden HepG2 Zellen transient mit dem in ein Plasmid (pGL3 basic) kloniertes Promotorkonstrukt GI-prom 1 transfiziert, und mit steigenden Konzentrationen von hydrolysiertem GRA, bzw. synthetischem SFN behandelt. Abb. 8 zeigt, dass durch beide SFN-Formen der GPx2-Promotor signifikant aktiviert werden konnte, beide Substanzen waren gleich effektiv.

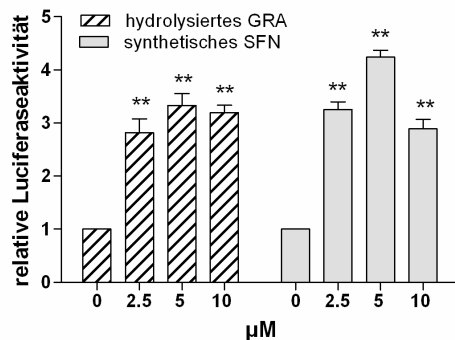


Abb. 8: Transaktivierung des GPx2-Promotors
HepG2 Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit 0,15 µg GI-prom 1 mit hydrolysiertem GRA bzw. synthetischem SFN in angezeigten Konzentrationen behandelt und nach 24 h geerntet. Die relative Luziferaseaktivität der behandelten Zellen wurde auf die der unbehandelten Kontrolle bezogen (0; auf 1 gesetzt). MW±SD, n=3. ** p< 0,01 vs. Kontrolle mittels Students T-Test.

3.2 Die Effekte von synthetischem SFN und hydrolysiertem GRA auf typische Phase II Enzyme und Selenoproteine sind auch *in vivo* vergleichbar

Des Weiteren sollten 2 SFN-Formen unterschiedlichen Ursprungs in verschiedenen Konzentrationen in einem Vorversuch *in vivo* verglichen werden. Optimale Effekte auf die Induktion von Phase II Enzymen und Selenoproteinen sollten erzielt werden, welche im Hinblick auf die im Hauptversuch geplanten Untersuchungen der antikanzerogenen Effekte von SFN fundamental waren. Je 5 Mäuse pro Gruppe wurden im Alter von 8 Wochen nach Einstellung des Selenstatus durch Fütterung mit selenarmem bzw. selenadäquatem Futter über 4-5 Wochen für 7 Tage mit KP_i-Puffer bzw. 2,5, 5 oder 10 µmol zuvor hydrolysiertem GRA bzw. synthetischem SFN per Schlundsonde behandelt. Nach Tötung wurden Leber, GIT, Niere und Blase entnommen, Organlysate hergestellt und Enzymaktivitäten gemessen sowie mittels Western Blot die Proteinexpression ermittelt.

Tab. 9 zeigt eine Auswahl an relativen Induktionen in verschiedenen Organen selenadäquat gefütterter Tiere, die den durch SFN vermittelten Effekt unterstützen bzw. einen Vergleich zwischen den verschiedenen Konzentrationen beider Substanzen ermöglichen. Zur Übersichtlichkeit wurde sich auf die Darstellung selenadäquater Tiere beschränkt.

Tab. 9: Vergleich der Induktion entsprechender Parameter in ausgewählten Organen durch hydrolysiertes GRA und synthetisches SFN

Nach Herstellung von Organlysaten wurden Enzymaktivitäten gemessen und Proteinexpressionen mittels Western Blot bestimmt. Aufgezeigt sind ausgewählte relative Werte, nach Bezug auf den Mittelwert der mit KP_1 -Puffer behandelten Se-adäquaten Kontrolltiere. n=5. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. Se-adäquate Kontrolle mittels Students T-Test.

Organ	Enzym	Endpunkt	hydrolysiertes GRA			synthetisches SFN		
			2,5 μ mol	5 μ mol	10 μ mol	2,5 μ mol	5 μ mol	10 μ mol
Magen	NQO1	Aktivität	1,7 **	2,3 *	2,5 **	1,3 *	1,2	1,4 *
	TrxR	Aktivität	1,8 ***	2,6 **	2,0 *	1,2 *	1,2	1,4 *
Duodenum	NQO1	Aktivität	1,5	1,9 **	2,3 *	1,4	1,2	1,8 **
		Protein	3,6 *	2,8	2,1	3,1 *	1,7	1,1
	TrxR	Aktivität	1,2	1,3 *	1,3 *	1,6 *	1,4	1,6
		GPx2	Protein	2,7	2,3 *	3,8 *	2,0	1,6
Ileum	NQO1	Aktivität	1,0	1,4 *	2,1 *	1,3	1,1	1,9 **
		Protein	2,0 *	3,0 **	2,7 *	2,2 **	1,7 *	2,0 *
	GPx2	Protein	1,5 *	1,5 *	1,6 *	2,2	3,9	1,8
Colon	NQO1	Aktivität	2,7 *	2,7 *	4,0 ***	0,6 **	0,6 **	0,8
		Protein	1,1	1,2	1,5	0,6 *	0,4 **	1,1
	TrxR	Aktivität	1,3	1,4 *	1,5 *	0,6 **	0,9	0,9 *
Leber	NQO1	Aktivität	1,2	2,3 *	3,1 *	0,9	1,2	1,4 *
		Protein	1,7 **	2,2 **	3,4 **	0,7	0,8	1,2
Blase	NQO1	Aktivität	1,6 **	2,0 **	2,1 *	1,6 **	1,7 ***	2,4 ***
		Protein	1,6	1,7 *	2,5 *	2,0 *	3,9 ***	2,2 **
	TrxR	Aktivität	1,3 *	1,5 *	1,6 *	1,0	1,3	1,4

Ein konzentrationsabhängiger Anstieg der NQO1-Aktivität durch hydrolysiertes GRA bzw. synthetisches SFN konnte im Magen, Duodenum, Ileum, in der Leber sowie in der Blase gezeigt werden. Auch die Proteinexpression von NQO1 wurde im Duodenum, Ileum, in der Leber und Blase durch die Substanzen induziert. Wenn auch die Induktion weniger konsistent war, ist die Wirkung beider Substanzen dennoch vergleichbar. Im Gegensatz zu SFN-geschlündelten Tieren, waren im Colon von Tieren, die mit hydrolysiertem GRA geschlündelt wurden, eine deutliche Steigerung sowohl der NQO1-

Aktivität und des NQO1-Proteingehaltes als auch der TrxR-Aktivität zu beobachten. Eine Induktion der GPx2-Proteinexpression durch beide Substanzen wurde im Duodenum und Ileum ermittelt. Ein Effekt auf die Gesamtaktivität von TrxR konnte durch beide Substanzen u.a. im Magen, Duodenum und in der Blase verzeichnet werden, im Colon bewirkte nur hydrolysiertes GRA einen Anstieg der TrxR-Aktivität. Die Effekte der Applikation von synthetischem SFN waren vergleichbar mit denen von hydrolysiertem GRA, welches als die natürlichere Form beider gilt. Eine Konzentration von 5 μmol SFN ist ausreichend, um die untersuchten Enzyme auf Aktivitäts- und Proteinebene zu induzieren.

Um den beachtlichen Stressfaktor für die Tiere durch die im Hauptversuch geplante tägliche Applikation von Substanzen über 4 Wochen reduzieren zu können, wurde getestet, ob die tägliche Schlündelung von 5 μmol SFN durch eine 2-tägliche mit 10 μmol SFN ersetzt werden kann. Ein Unterschied konnte bezüglich NQO1-Aktivität und -Protein sowie GPx2-Protein im proximalen und distalen Jejunum, Ileum, Colon und Leber nicht festgestellt werden (nicht gezeigt). Daher wurde sich für eine zweitägliche Schlündelung entschieden.

3.3 Wechselwirkungen von SFN und Se im AOM/DSS-Modell

3.3.1 Einstellung des Selenstatus im Plasma

Im Alter von 3 Wochen wurden die Mäuse abgesetzt und in entsprechende Gruppen eingeteilt. Ab diesem Zeitpunkt erfolgte für die gesamte Dauer der Versuche bis zur Tötung der Tiere die Fütterung mit einer der 3 Selendiäten. Der Plasmaselengehalt ist ein geeigneter Marker zur Prüfung verabreichter und aufgenommener Selengehalte über das Futter. Da der Selengehalt des selenarmen Futters mit 0,086 mg/kg Se etwas mehr als die Hälfte des, mit 0,15 mg Se pro kg Futter dem RDA für Mäuse [216] entsprechenden selenadäquaten Futters betrug, war die starke Reduzierung des Plasmaselengehaltes auf 28% erheblich (Abb. 9). Eine signifikante Steigerung des Plasmaselengehaltes um 34% konnte durch selensupplementiertes Futter mit einem Selengehalt von

0,6 mg/kg gegenüber dem durch selenadäquates Futter erreicht werden. SFN hatte keinen Einfluss auf die Selengehalte im Plasma.

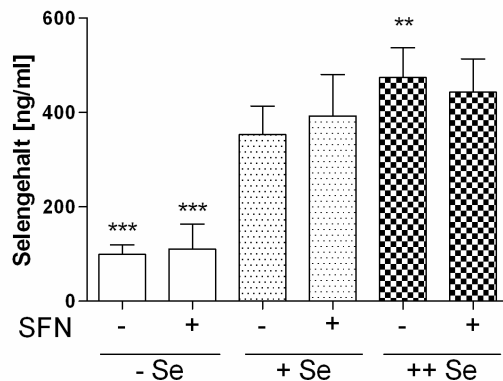


Abb. 9: Selengehalte im Plasma in Abhängigkeit von Se und SFN

Fluorimetrische Bestimmung des Selengehaltes im Plasma nach Tötung der Se-armen (-Se), -adäquaten (+Se; gepunktet) und -supplementierten (++) Se; kariert), über 4 Wochen mit/ohne SFN geschlündelter Tiere im Alter von 21 Wochen. MW±SD, n=10. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. selenadäquate Kontrolle mittels 2way ANOVA.

3.3.2 SFN und Se haben keinen Einfluss auf den Gewichtsverlauf der Mäuse

Während der 4-wöchigen Applikation von SFN wurden die Tiere jeden zweiten Tag gewogen, danach wöchentlich. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in Abb. 10 nur die gemittelten Gewichtszunahmen von WT (GPx2^{+/+}) Mäusen während der SFN-Gabe dargestellt, ein Unterschied zu GPx2 KO (GPx2^{-/-}) Mäusen bestand nicht. Ein Einfluss von SFN auf den Gewichtsverlauf während der 4-wöchigen Gabe war nicht zu beobachten, auch der unterschiedliche Selengehalt der 3 Diäten veränderte die Gewichtszunahme nicht.

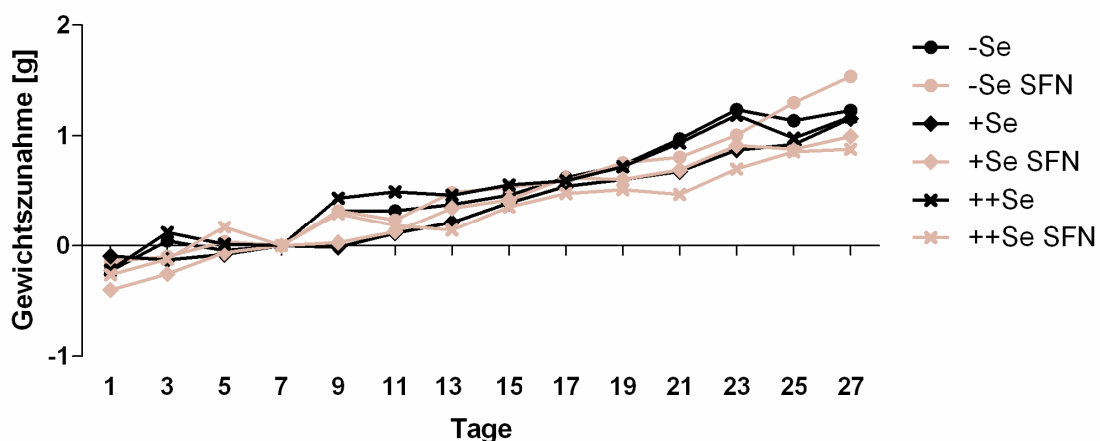


Abb. 10: Gewichtsverlauf von GPx2^{+/+} Mäusen in Abhängigkeit vom Selenstatus und der SFN-Behandlung

Gewichtszunahme Se-armer (-Se), -adäquater (+Se) und -supplementierter (++) Mäuse über den Zeitraum der 4-wöchigen SFN-Applikation. Am Tag 7 fand eine Applikation mit NaCl, als Kontrolle zur AOM-Applikation, statt. Gewichte dieses Tages bilden das Bezugsgewicht. MW, n=14.

3.3.3 Effekte von SFN und Se auf Phase II Enzyme und Selenoproteine unter physiologischen Bedingungen

4 Tiere jeder Gruppe wurden direkt nach der 4-wöchigen SFN-Applikation getötet und die entnommenen Organe, vorwiegend Leber und GIT, hinsichtlich biochemischer Parameter analysiert. Für die Untersuchung der biochemischen Parameter im Colon wurde ein 2 cm langes Stück des proximalen Colon verwendet und daraus Organlysat hergestellt. Der Effekt von SFN und Se auf die Aktivität und Proteinexpression von Phase II Enzymen und Selenoproteinen sollte zunächst untersucht werden. Im folgenden Abschnitt werden lediglich Befunde aus entzündungsfreien GPx2^{+/+} Mäusen dargestellt. Beobachtete Effekte, die eventuell durch die Entzündung (3.3.4) oder durch das Fehlen der GPx2-Expression (3.3.5) hervorgerufen wurden, werden in gesonderten Abschnitten dargelegt.

3.3.3.1 NQO1

3.3.3.1.1 Aktivität

Obwohl maßgeblich als fremdstoffmetabolisierendes Organ bekannt, war in der Leber der Mäuse aller Fütterungsgruppen die geringste NQO1-Aktivität zu verzeichnen (Abb. 11). Die höchsten Aktivitäten, unbeeinflusst vom Selenstatus der Mäuse, wurden im Magen gemessen, gefolgt von Colon und Dünndarm. Im Verlauf des Dünndarmes war diese relativ konstant. Die vielfach beschriebene Aktivierung von Nrf2 im Selenmangel [192] und eine daraus resultierende höhere Aktivität bzw. Proteinexpression von NQO1 konnte nur tendenziell beobachtet werden. In der Leber, im Duodenum und proximalen Jejunum selenarmer Tiere war die NQO1-Aktivität im Vergleich zu selenadäquaten Tieren minimal erhöht.

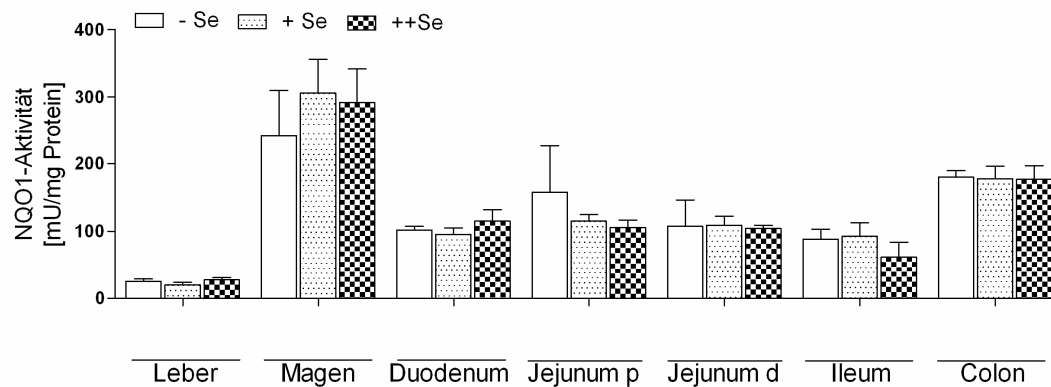


Abb. 11: Basale NQO1 Aktivität in der Leber und entlang des GIT in Abhängigkeit vom Selenstatus NQO1-Aktivität in den Organlysaten Se-armer (-Se), -adäquater (+Se) und -supplementierter (++) Mäuse. MW±SD, n=4.

Abb. 12 zeigt die absoluten NQO1-Aktivitäten in der Leber und entlang des Darmes, in Abhängigkeit der Selenfütterung und SFN-Gabe. Ein signifikanter Anstieg der NQO1-Aktivität durch SFN konnte in der Leber, im Magen, im Duodenum und im Ileum von Tieren aller 3 Selendiäten beobachtet werden. In beiden Jejunumabschnitten war der Einfluss von SFN eher inkonsistent. Im Colon war wider Erwarten kein markanter Einfluss von SFN auf die NQO1-Aktivität zu verzeichnen. In selenarm gefütterten Tieren waren in der Leber und im Verlauf des GIT die deutlichsten SFN-Effekte zu beobachten.

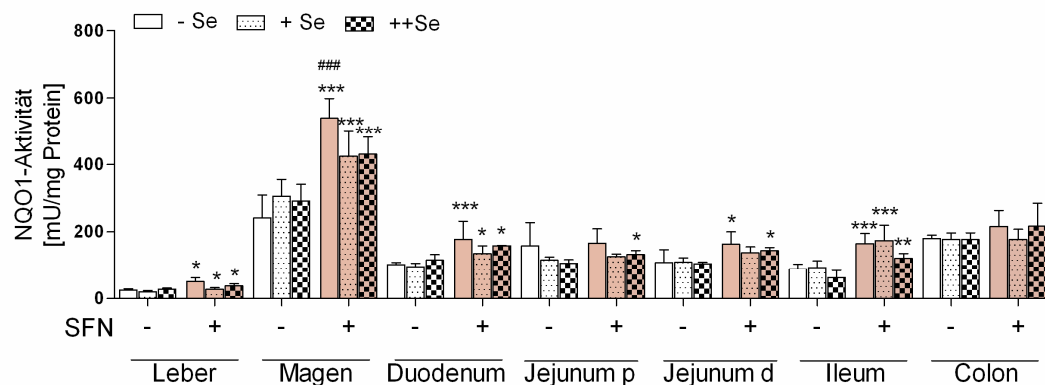


Abb. 12: NQO1-Aktivität in der Leber und entlang des GIT in Abhängigkeit von SFN und Se NQO1-Aktivität in den Organlysaten Se-armer (-Se), -adäquater (+Se) und -supplementierter (++) über 4 Wochen mit/ohne SFN (rot) geschlündelter Mäuse. MW±SD, n=4. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. unbehandelte Kontrolle; ### $p < 0,001$ vs. selenadäquate Kontrolle mittels 2way ANOVA.

3.3.3.1.2 Proteinexpression von NQO1 im Ileum und Colon

Die im Western Blot untersuchte Proteinexpression von NQO1 korrelierte mit der NQO1-Aktivität und wurde vor allem im Ileum von SFN-geschlündelten Tieren aller 3 Selengruppen signifikant induziert (Abb. 13). Die mangelnde Steigerung der NQO1-Aktivität im Colon spiegelte sich im Proteingehalt wider, SFN veränderte den Proteingehalt von NQO1 im proximalen Colon nicht. In Korrelation mit der in Abb. 12 dargestellten NQO1-Aktivität war auch der Proteingehalt von NQO1 in der Leber und entlang des GIT (nicht gezeigt). In der Leber wurde die geringste, im Magen hingegen die höchste NQO1-Proteinmenge ermittelt. Im Verlauf des Darmes stieg diese jedoch deutlich an. Durch SFN konnte die Expression teilweise gesteigert werden.

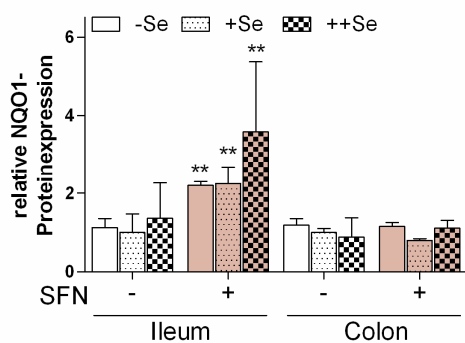


Abb. 13: NQO1-Proteinexpression im Ileum und Colon

Se-arme (-Se), -adäquate (+Se) und -supplementierte (++) Mäuse wurden für 4 Wochen mit SFN (rot) behandelt. NQO1 wurde in Ileum- und Colonlysaten mittels Western Blot analysiert. Normalisiert wurde auf Coomassie-Gelfärbung. MW±SD. ** p<0,01 vs. entsprechende unbehandelte Kontrolle (auf 1 gesetzt) mittels 2way ANOVA.

Die Verteilung und Lokalisation des NQO1-Proteins entlang des Colon (Abb. 14) wurde des Weiteren histologisch in immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten der *swiss roles* untersucht. Dazu wurde das Colon längs in seinen proximalen, transversalen und distalen Bereich geteilt (Abb. 2A; 2.5.3), die Aufteilung der Colonskrypten erfolgte in Kryptenspitze, -mitte und -grund (Abb. 2B). Die Intensität der immunhistochemischen Färbung wurde bewertet, wobei 0 Punkte für keine Färbung vergeben wurden bzw. 1 bis 3 Punkte für schwach bis stark gefärbte Bereiche. Im proximalen Colon wurde NQO1 mit mittlerer Intensität in der oberen Hälfte der Krypten exprimiert und lag vorwiegend cytosolisch vor. In der Kryptenspitze war NQO1 unbeeinflusst vom Selenstatus bzw. der SFN-Behandlung. Im transversen Colon war eine vorwiegend cytosolische NQO1-Expression auch im Kryptengrund zu beobachten, im selenmangeligen und -supplementierten Zustand gering schwächer als im -adäquaten Zustand. SFN bewirkte nur in der Kryptenmitte und -spitze eine tendenzielle bzw. signifikante Induktion der

NQO1-Expression. Im distalen Colon konnte NQO1 in der gesamten Krypte lokalisiert werden. Das Protein war in diesem Abschnitt stärker exprimiert als im übrigen Colon, vorwiegend kernständig, und konnte in allen 3 Selenitäten durch SFN in seiner Expression nochmals signifikant induziert werden. Lokale SFN-Effekte konnten somit im Colon, vor allem im distalen Abschnitt erfasst werden.

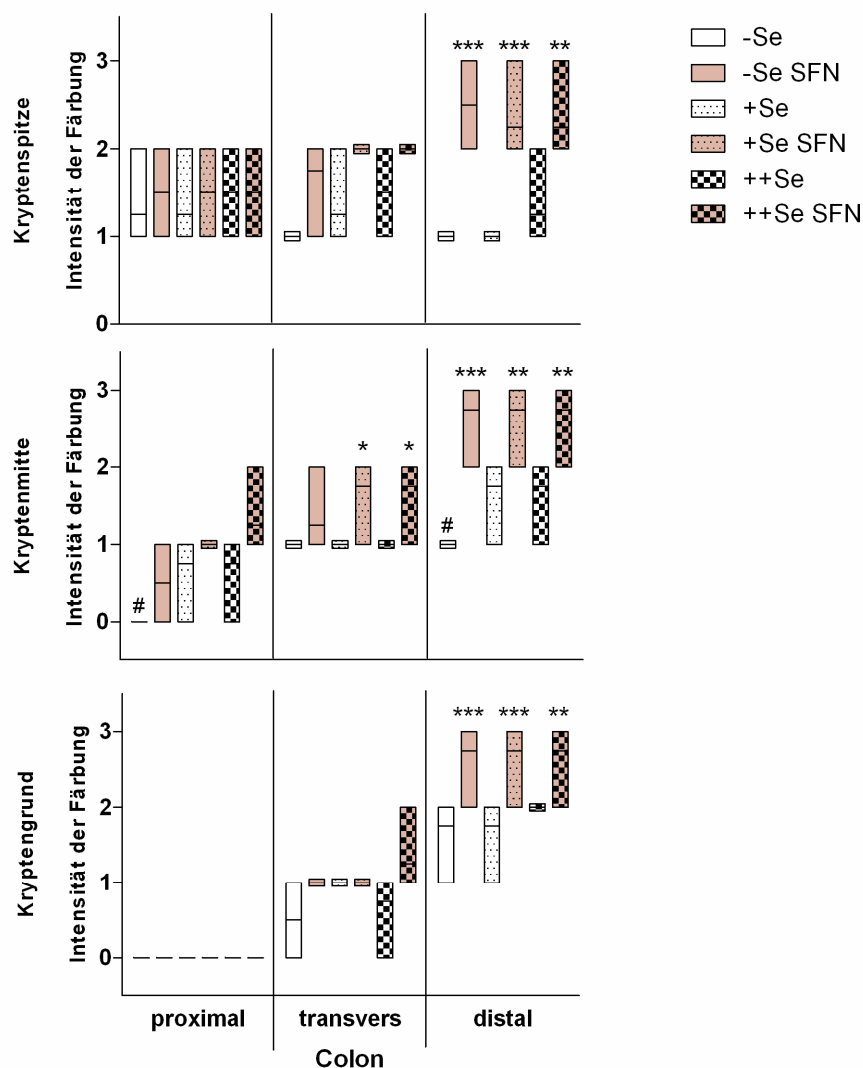


Abb. 14: Verteilung der NQO1-Expression im Verlauf des Colon und innerhalb der Krypten
 Se-arme (-Se), -adäquate (+Se) und -supplementierte (++) Mäuse, über 4 Wochen mit/ohne SFN (rot) behandelt, wurden hinsichtlich der Proteinexpression von NQO1 im proximalen, transversen und distalen Colon untersucht. Colonkrypten wurden in -spitze, -mitte und -grund geteilt (Abb. 2B). Dargestellt ist die Lokalisation sowie Intensität der immunhistochemischen Färbung im Boxplot mit Median, n=4. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. entsprechende unbehandelte Kontrolle; # $p < 0,05$ vs. selenadäquate Kontrolle mittels 2way ANOVA.

3.3.3.2 TrxR

3.3.3.2.1 Aktivität

Die geringe TrxR-Aktivität in der Leber und im Verlauf des GIT selenarmer Tiere konnte, mit Ausnahme des Magens, in allen Organen im selenadäquaten Zustand signifikant gesteigert werden. Die Supplementierung mit Se bewirkte eine weitere Steigerung der TrxR-Aktivität (Abb. 15). Maximale Effekte wurden im oberen Dünndarm erreicht. Da es sich um die Gesamtaktivität an TrxR handelt und nicht zwischen den Isoformen unterschieden werden kann, waren die durch SFN induzierten gemessenen Effekte inkonsistent. Eine Induktion durch SFN ist nur für TrxR1 beschrieben [171]. SFN erhöhte die TrxR Gesamtaktivität im Selenmangel im Duodenum und distalen Jejunum, im selenadäquaten Zustand im Magen, Duodenum und Ileum, bei Selensupplementierung im Duodenum, Ileum und Colon. Der Nachweis von TrxR1 mittels Western Blot und Immunhistochemie war aufgrund des zu unspezifischen zur Verfügung stehenden Antikörpers nicht möglich und wurde aus diesem Grund nicht weiter verfolgt.

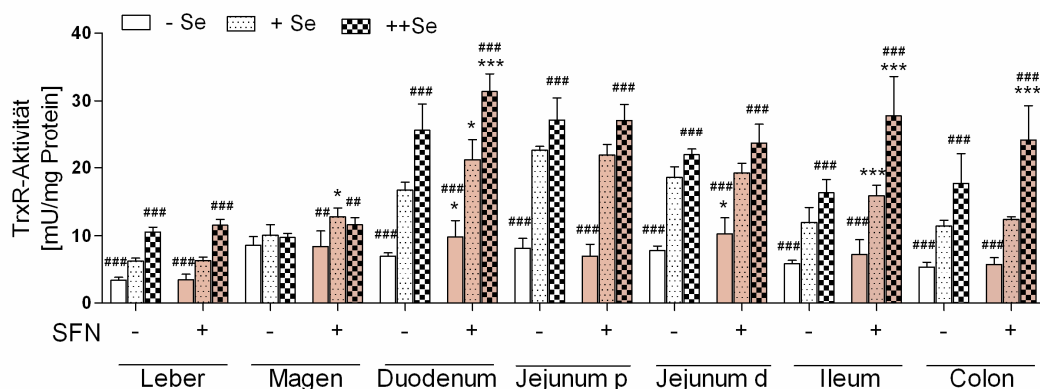


Abb. 15: TrxR-Aktivität in der Leber und entlang des GIT in Abhängigkeit von SFN und Se
TrxR-Aktivität in den Organlysaten Se-armer (-Se), -adäquater (+Se) und -supplementierter (++)Se, über 4 Wochen mit/ohne SFN (rot) geschlündelter Mäuse. MW±SD, n=4. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs. entsprechende unbehandelte Kontrolle; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ vs. selenadäquate Kontrolle mittels 2way ANOVA.

3.3.3.3 GPx

3.3.3.3.1 Gesamtaktivität

Wie Abb. 16 zeigt, konnten in der Leber bereits im Selenmangel relativ hohe GPx Gesamtaktivitäten gemessen werden, im Magen waren diese sehr niedrig, im Verlauf des

Darmes wiederum etwas höher. Im selenadäquaten Zustand war die Aktivität in allen Organen um ein Vielfaches (1,4- bis 5,6-fach im Darm, 8,5-fach in der Leber sowie 16,3-fach im Magen) signifikant gesteigert und erreichte teilweise ihr Maximum. Selen-supplementierung bewirkte nur in der Leber einen weiteren signifikanten Anstieg. SFN veränderte die GPx Gesamtaktivität nicht. Die mit Hilfe des spezifischen Substrates Phosphatidylcholinhydroperoxid (PCOOH) im Ileum und Colon bestimmte GPx4-Aktivität war in keinem der beiden Abschnitte des GIT durch den Selenstatus oder die SFN-Behandlung beeinflusst (nicht gezeigt). Mittels Messung der GPx-Aktivität im Plasma wurde die Aktivität der darin hauptsächlich vorkommenden GPx3 bestimmt. Mit Se wurde diese verstärkt synthetisiert, jedoch nicht durch SFN beeinflusst. Eine Expression im Darm konnte nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

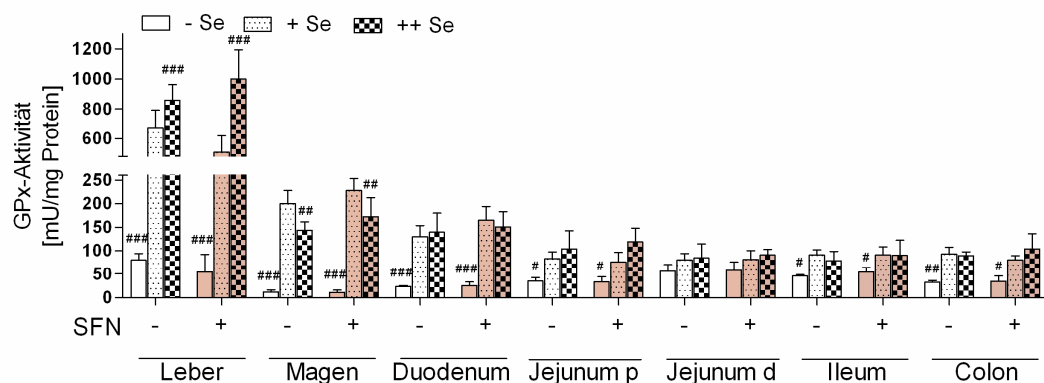


Abb. 16: GPx-Aktivität in der Leber und entlang des GIT in Abhängigkeit von SFN und Se
 GPx-Aktivität in den Organlysaten Se-armer (-Se), -adäquater (+Se) und -supplementierter (++)Se, über 4 Wochen mit/ohne SFN (rot) geschlündelter Mäuse. MW±SD, n=4. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ vs. entsprechende selenadäquate Gruppe mittels 2way ANOVA.

3.3.3.3.2 Proteinexpression von GPx1 und GPx2 im Ileum und Colon

Die Proteinexpression von GPx1 und GPx2 wurde zunächst im Gesamtlysate des proximalen Colon und Ileum ermittelt. GPx1 war im Selenmangel sehr gering exprimiert (Abb. 17 A) und im Vergleich zum selenadäquaten Zustand deutlich reduziert (0,3-fach im Ileum, 0,13-fach im Colon). Eine gesteigerte Proteinexpression durch Selen-supplementierung lag im Ileum und Colon vor. Ein Effekt von SFN auf GPx1 blieb aus. Auch die Expression von GPx2 war im Ileum von selenarmen Mäusen sehr niedrig und wurde sowohl durch Se als auch durch SFN deutlich gesteigert (Abb. 17 B). Im proximalen Colon war eine Induktion von GPx2 durch SFN [169] nicht zu beobachten. Im Selen-

mangel war die Expression von GPx2, vor allem im Ileum, zwar niedriger als im selenadäquaten Zustand (0,31-fache Reduktion im Ileum, 0,75-fach im Colon), jedoch war der Seleneffekt weniger deutlich als auf die Expression von GPx1 (Abb. 17 A). Im Vergleich zur GPx1 wird die Synthese des hoch in der Hierarchie stehenden Proteins GPx2 [97] nicht so stark unterdrückt. Durch Selensupplementierung konnte im Colon die Expression weiter gesteigert werden, im Ileum hingegen nicht.

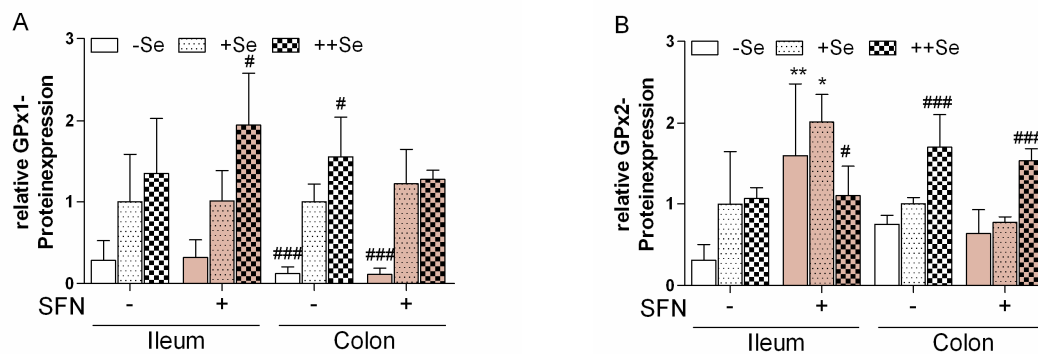


Abb. 17: GPx1- und GPx2-Proteinexpression im Ileum und Colon

Se-arme (-Se), -adäquate (+Se) und -supplementierte (++) Mäuse wurden für 4 Wochen mit SFN (rot) behandelt. Vorhandenes GPx1 (A) und GPx2 (B) wurde in Ileum- und Colonlysaten mittels Western Blot analysiert. Die Expression selenadäquater unbehandelter Tiere wurde auf 1 gesetzt. Normalisiert wurde auf Coomassie-Gelfärbung. MW±SD, n=4. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. entsprechende unbehandelte Kontrolle; # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$ vs. entsprechende selenadäquate Gruppe mittels 2way ANOVA.

Des Weiteren wurden GPx1 und GPx2 histologisch in immunhistochemisch angefärbten *colon swiss roles* untersucht. Die Selenabhängigkeit der GPx1-Expression wird auch nach immunhistochemischer Darstellung (Abb. 18) deutlich. GPx1 war im Selenmangel im gesamten Colon sehr gering exprimiert, SFN veränderte dies nicht. Im proximalen Colon war GPx1 auch in selenadäquaten Tieren relativ schwach und lediglich in der Kryptenspitze nachzuweisen, in selensupplementierten Tieren war die Expression stärker und auch in der Kryptenmitte sowie im -grund vorhanden. Im Verlauf vom transversen zum distalen Colon selenadäquat gefütterter Mäuse nahm die Expression der GPx1 in gleicher Weise in der Kryptenspitze wie auch in der -mitte zu, eine minimal geringere Intensität der Färbung durch SFN war zu erkennen. Auch in selensupplementierten Tieren wurde im Verlauf des Colon GPx1 sowohl im Kryptengrund als auch in der Kryptenspitze stärker exprimiert als im proximalen Abschnitt. Im Vergleich zu selenadäquaten Tieren war dieser Unterschied signifikant, und durch SFN unbeeinflusst.

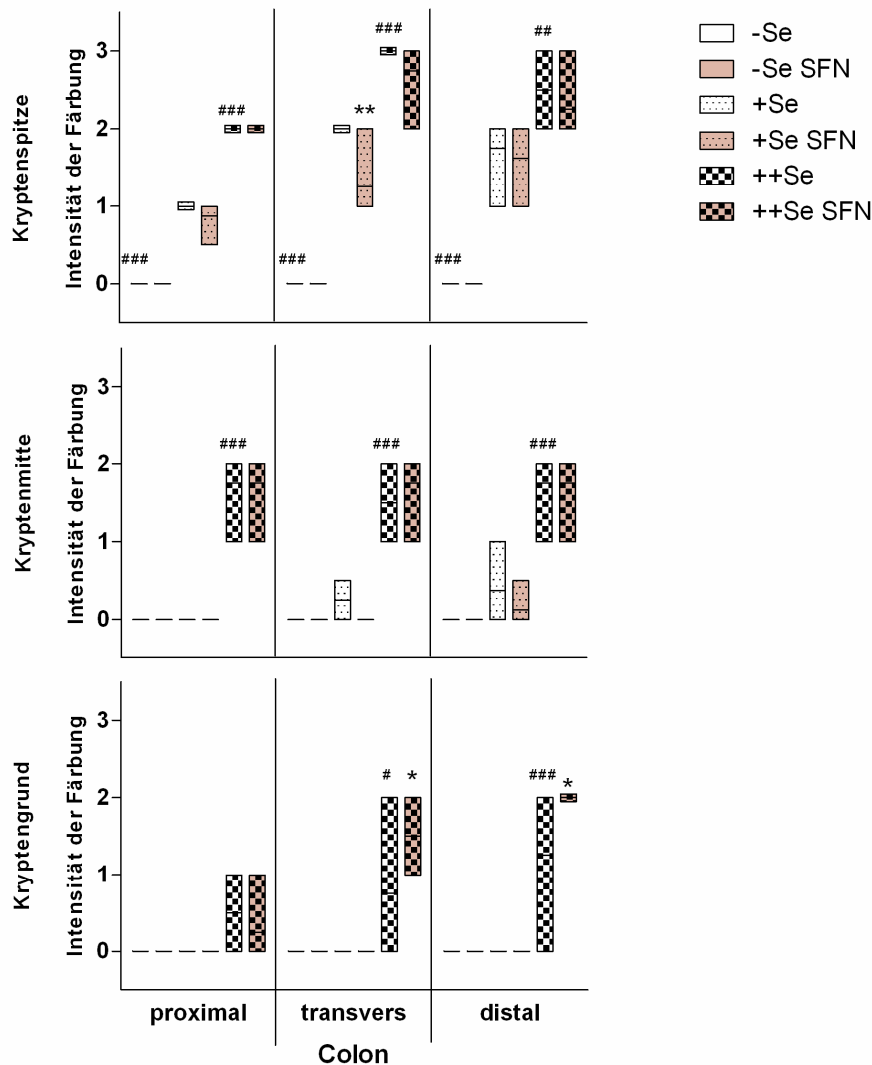


Abb. 18: Verteilung der GPx1-Expression im Verlauf des Colon und innerhalb der Krypten
 Se-arme (-Se), -adäquate (+Se) und -supplementierte (++) Mäuse, über 4 Wochen mit/ohne SFN (rot) behandelt, wurden hinsichtlich der Proteinexpression von GPx1 im proximalen, transversen und distalen Colon untersucht. Colonkrypten wurden in -spitze, -mitte und -grund geteilt (Abb. 2B). Dargestellt ist die Lokalisation sowie Intensität der immunhistochemischen Färbung im Boxplot mit Median, n=4. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. entsprechende unbehandelte Kontrolle; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ vs. selenadäquate Kontrolle mittels 2way ANOVA.

Bei Betrachtung der histologischen Verteilung von GPx2 entlang des Colon (Abb. 19) war die durch Florian *et al.* [154] bereits beschriebene Lokalisation der GPx2 in den Krypten erkennbar. GPx2 wurde vorwiegend im Kryptengrund exprimiert, im Selenmangel mit sehr geringer Intensität. Die Expression des Selenoproteins wurde im selenadäquaten Zustand induziert und konnte im transversen und distalen Colon auch in der Mitte der Krypte detektiert werden. Selen-supplementierte Tiere wiesen kaum eine stär-

kere GPx2-Expression auf, SFN bewirkte in diesen Tieren ebenfalls keine Induktion der Proteinexpression. Dies wurde lediglich in der Kryptenmitte im distalen Colon selenarmer und -adäquater Mäuse beobachtet, hier induzierte SFN die GPx2-Expression signifikant. Im distalen Colon wurde die Proteinexpression von GPx2 aufgrund der versuchs-technischen Aufteilung des Gewebes nicht im Western Blot untersucht.

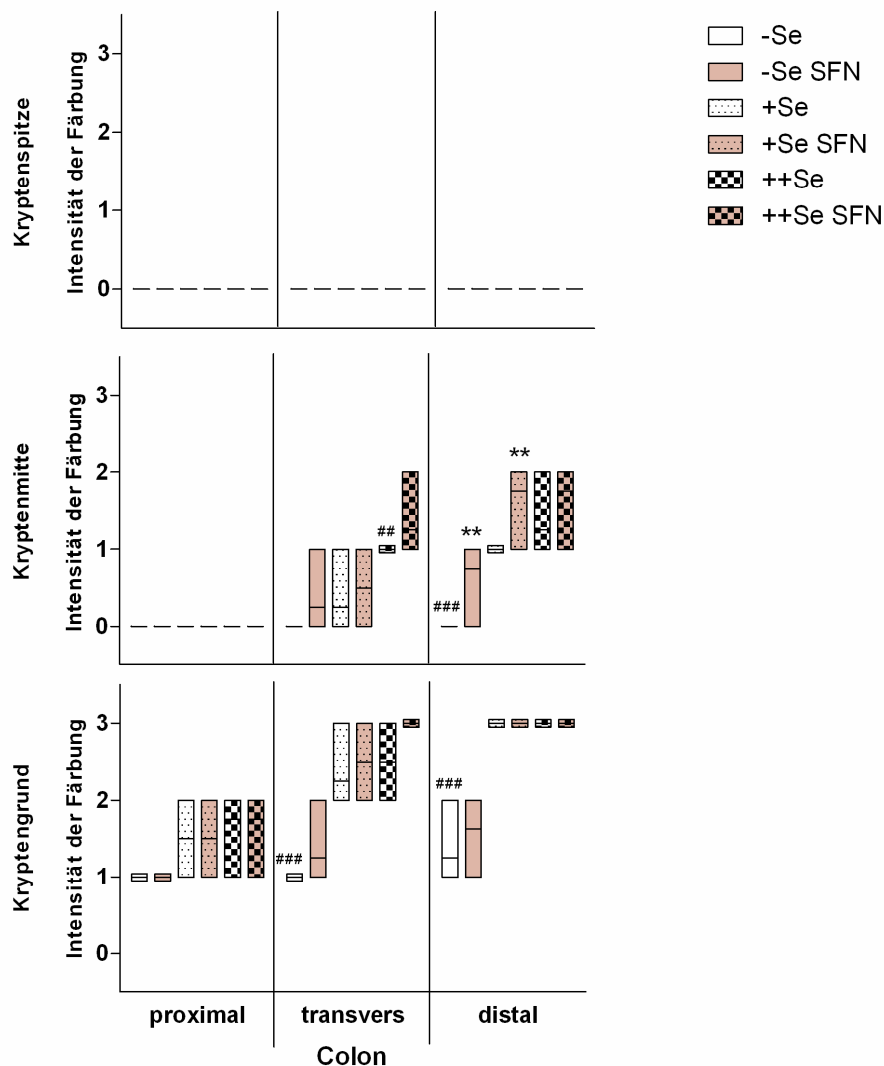


Abb. 19: Verteilung der GPx2-Expression im Verlauf des Colon und innerhalb der Krypten
 Se-arme (-Se), -adäquate (+Se) und -supplementierte (++) Mäuse, über 4 Wochen mit/ohne SFN (rot) behandelt, wurden hinsichtlich der Proteinexpression von GPx2 im proximalen, transversen und distalen Colon untersucht. Colonkrypten wurden in -spitze, -mitte und -grund geteilt (Abb. 2B). Dargestellt ist die Lokalisation sowie Intensität der immunhistochemischen Färbung im Boxplot mit Median, n=4. ** $p < 0,01$ vs. entsprechende unbehandelte Kontrolle; # $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ vs. selenadäquate Kontrolle mittels 2way ANOVA.

3.3.3.4 GST

3.3.3.4.1 Gesamtaktivität

Die basale GST Gesamtaktivität, in der Leber generell sehr hoch [227], war in sowohl selenarm also auch -supplementiert gefütterten Tieren signifikant höher als in selenadäquaten Tieren (Abb. 20). Im GIT wurde die Aktivität der GST durch Se nicht beeinflusst. Der Einfluss von SFN war sehr inkonsistent. Im Magen, Duodenum und Colon wurden mit SFN bei allen Diäten höhere Aktivitäten nachgewiesen, auch in der Leber selensupplementierter Tiere wurde ein SFN-Effekt auf die GST-Aktivität gezeigt.

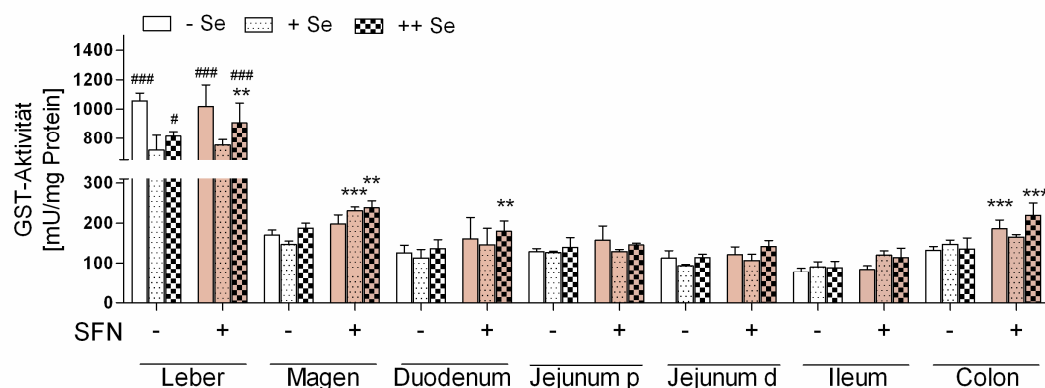


Abb. 20: GST-Aktivität in der Leber und entlang des GIT in Abhängigkeit von SFN und Se
 GST-Aktivität in den Organlysaten Se-armer (-Se), -adäquater (+Se) und -supplementierter (++)Se, über 4 Wochen mit/ohne SFN (rot) geschlündelter Mäuse. MW±SD, n=4. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. entsprechende unbehandelte Kontrolle; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ vs. selenadäquate Kontrolle mittels 2way ANOVA.

3.3.4 Einfluss der Entzündung auf cytoprotektive Enzyme

Inflammatorische Prozesse und dadurch hervorgerufene Veränderungen im Colon können die Aktivität und Expression von detoxifizierenden Enzymen im Körper beeinflussen. Dies war hier lediglich für die Aktivität der TrxR der Fall (nicht gezeigt). Sie war in der Leber, im Ileum und Colon selenadäquater AOM/DSS-behandelter Tiere höher als in entsprechenden Tieren ohne Entzündung. Auch im Ileum selensupplementierter Tiere, die mit AOM/DSS behandelt wurden, war dies zu beobachten. Die Aktivitäten von NQO1, GST bzw. GPx waren nicht verändert. Eine immunhistochemische Färbung von sowohl NQO1 als auch GPx1 in infiltrierenden Zellen und ulzerativen Arealen in Colongewebeschnitten von entzündeten Tieren konnte beobachtet werden (nicht gezeigt).

Dennoch war in mittels Western Blot untersuchten Organen weder die NQO1 noch die GPx1-Proteinexpression entzündeter Tiere höher als die gesunder Tiere.

3.3.5 Die Auswirkung der Abwesenheit von GPx2 auf die Enzyme

Kompensatorische Effekte durch das Fehlen wichtiger Enzyme bzw. Enzymgruppen werden beschrieben [193, 228]. Im Gegensatz dazu bewirkte das Fehlen der GPx2 in selenadäquaten und -supplementierten GPx2^{-/-} Mäusen keine Induktion von NQO1, GST und TrxR. Weder die Aktivität noch die Proteinexpression wurden im Vergleich zu GPx2^{+/+} Mäusen gesteigert. Auch durch SFN wurden kompensatorische Effekte nicht induziert. Überraschenderweise war die TrxR-Aktivität im kompletten Dünndarm selenarmer GPx2^{-/-} Mäuse signifikant höher als die von GPx2^{+/+} Mäusen in diesem Darmabschnitt. SFN bewirkte keine weitere Steigerung (nicht gezeigt). Die Abwesenheit der GPx2 sollte einen drastischen Einfluss auf die GPx-Aktivität mit sich bringen, besitzt sie doch in einigen Organen einen erheblichen Anteil an der GPx-Gesamtaktivität [96]. Entgegen der erwarteten Reduzierung der GPx-Gesamtaktivität war diese in allen Organen von GPx2^{-/-} Mäusen aller 3 Selendiäten signifikant erhöht. Dies korrelierte auch mit der gesteigerten GPx1-Proteinexpression in GPx2^{-/-} Mäusen, die mittels Western Blot sowie immunhistochemisch analysiert wurde (nicht gezeigt). Im Selenmangel war dies zwar sehr viel geringer ausgeprägt als in selenadäquaten bzw. -supplementierten Tieren, da die Menge an Se zur Steigerung der GPx1-Expression nicht ausreicht. Dennoch konnte beobachtet werden, dass die GPx1 in GPx2^{-/-} Tieren bei ausreichender Selenversorgung stärker in den Regionen der Colonmukosa exprimiert wird, in welchen unter physiologischen Bedingungen lediglich GPx2 zu finden ist.

3.3.6 Einfluss von SFN und Se auf die Zellproliferation im Colon

Neben der Induktion von Phase II Enzymen und Selenoproteinen moduliert SFN auch die Proliferation [25], hat einen Einfluss auf den Zellzyklus und die Apoptose [20, 229]. Es wird außerdem diskutiert, dass Se, im Mangel oder Überschuss, die Proliferation sowie den programmierten Zelltod beeinflusst [196, 230, 231]. Um den Effekt von SFN und Se auf die Proliferation und Apoptose im Colon zu untersuchen, wurden Hämatoxylin-gefärbte Gewebeschnitte von 4 Tieren jeder nicht mit AOM/DSS-behandelten Grup-

pen histologisch analysiert. Die Anzahl an Mitosen und Apoptosen in 300 Krypten des distalen Colon wurden gezählt. In Abb. 21 wird deutlich, dass generell eine höhere Mitoserate im 4. Kryptenviertel, dem Kryptengrund, vorlag, selen-supplementierte Tiere jedoch tendenziell weniger Mitosen aufwiesen. SFN hatte im Kryptengrund keinen Einfluss und veränderte, wie auch Se, die Anzahl an Mitosen im 3. Kryptenviertel nicht. Im 1. und 2. Kryptenviertel waren keine Mitosen zu beobachten (nicht gezeigt). Die Länge der Krypten bzw. die Morphologie des Darmes wurden weder durch Se noch durch SFN verändert (nicht gezeigt). Die Proliferation gesunder Darmzellen wird somit weder durch den Selenstatus noch durch eine Behandlung von SFN signifikant beeinflusst.

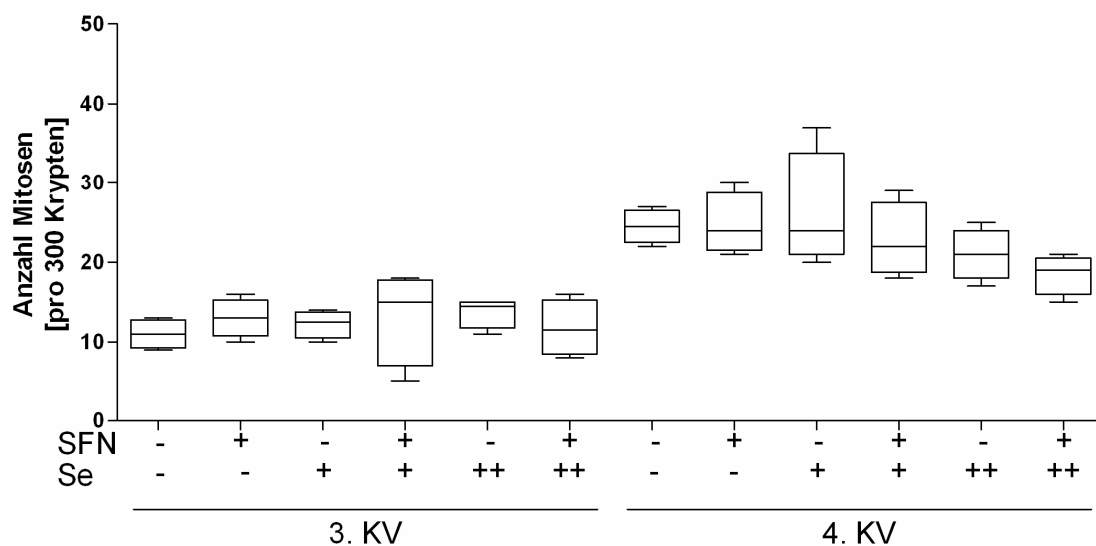


Abb. 21: Anzahl Mitosen in GPx2^{+/+} Tieren in Abhängigkeit von SFN und Se

Mitotische Zellen wurden in 300 Krypten des distalen Colon Se-armer (-Se), -adäquater (+Se) und -supplementierter (++) GPx2^{+/+} Mäuse mit und ohne SFN-Behandlung gezählt. Die Krypten wurden geviertelt, der basal liegende Kryptengrund bildet das 4. Kryptenviertel. Als Boxplot dargestellt ist die Anzahl der Mitosen im 3. und 4. Kryptenviertel des Colon, n=4.

Entsprechend physiologischer Bedingungen wurden die meisten Apoptosen, unabhängig von der Selenfütterung bzw. SFN-Behandlung, im ersten Kryptenviertel gezählt (Abb. 22). SFN erhöhte in diesem Bereich sowohl in selenarmen als auch in selenadäquaten Mäusen die Apoptoserate, wenn auch dieser Effekt im adäquaten Zustand durch die starke Streuung nicht signifikant war. Auch im dritten Kryptenviertel war in selenarmen SFN-behandelten Tieren die Anzahl apoptotischer Zellen erhöht. Im Selenmangel schieben im zweiten und dritten Kryptenviertel häufiger Apoptosen vorzukommen. Eine signifikant höhere Apoptoserate wurde in selen-supplementierten Mäusen im Kryptengrund

beobachtet. SFN bewirkte in dieser Selendiät keine weiteren Veränderungen. Se und SFN beeinflussen demnach die Apoptoserate in den verschiedenen Abschnitten der Krypte, wenngleich die Effekte nur geringes Ausmaß haben.

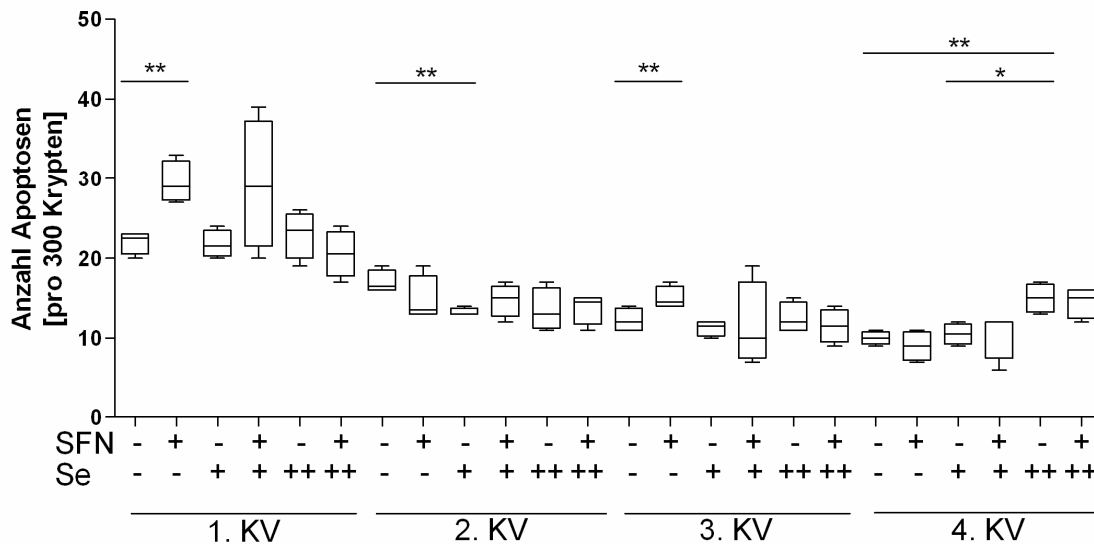


Abb. 22: Anzahl Apoptosen in GPx2^{+/+} Tieren in Abhängigkeit von SFN und Se

Apoptotische Zellen wurden in 300 Krypten des distalen Colon Se-armer (-Se), -adäquater (+Se) und -supplementierter (++) GPx2^{+/+} Mäuse mit und ohne SFN-Behandlung gezählt. Die Krypten wurden geviertelt, der Kryptengrund bildet das 4. Kryptenviertel. Als Boxplot dargestellt ist die Anzahl der Apoptosen in allen 4 Kryptenvierteln, n=4. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. entsprechende Kontrolle mittels Mann-Whitney U-Test.

Drastische Effekte auf die Induktion von Apoptosen im Colon bewirkte der Knockout der GPx2 (GPx2^{-/-}). Vor allem im Kryptengrund (4. Kryptenviertel) bewirkte die Abwesenheit der GPx2 einen Anstieg der Apoptoserate (Abb. 23), wobei besonders selenarme GPx2^{-/-} Tiere mit einem Faktor von $3,3 \pm 0,7$ sehr viel mehr Apoptosen aufwiesen als entsprechende GPx2^{+/+} Tiere. Im Gegensatz dazu war der Unterschied zwischen GPx2^{+/+} und GPx2^{-/-} im selensupplementierten Zustand gering. SFN schien die in GPx2^{-/-} Mäusen gesteigerte Apoptoserate in allen 3 Diäten zu senken, im selenadäquaten Zustand sogar signifikant, und wirkte somit antiapoptotisch. Dies zeigt, dass das Fehlen der GPx2 zu einer gesteigerten Eliminierung von Darmzellen im Kryptengrund führt und SFN sowie die Supplementierung von Se diesem Vorgang entgegenwirken können.

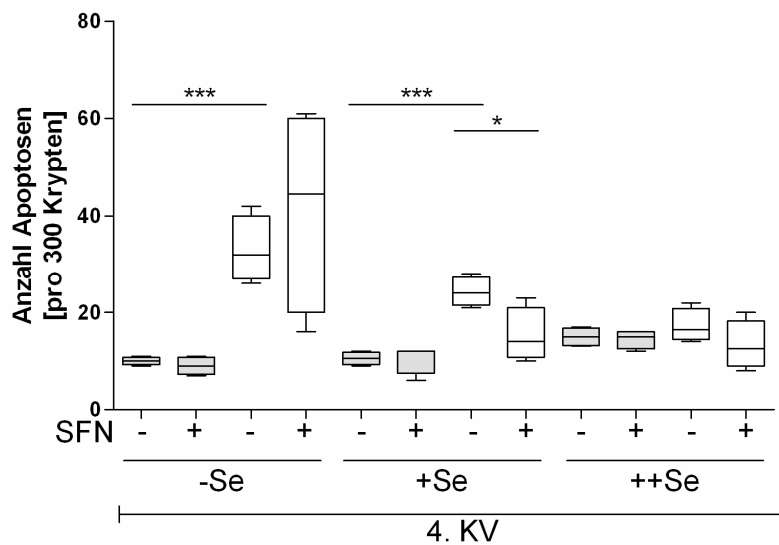


Abb. 23: Apoptoserate im 4. Kryptenviertel in Abhängigkeit vom Genotyp, Selenstatus und SFN-Behandlung

Als Boxplot dargestellt ist die Anzahl der Apoptosen im 4. Kryptenviertel (n=300) Se-armer (-Se), adäquater (+Se) und -supplementierter (++)Se) GPx2^{+/+} (grau) und GPx2^{-/-} (weiß) Mäuse mit und ohne SFN-Behandlung, n=4. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs. entsprechende Kontrolle mittels Mann-Whitney U-Test.

3.3.7 SFN moduliert den Verlauf der Entzündung selenabhängig

Nachdem der Einfluss und die Wechselwirkung des Selenstatus sowie eine Behandlung von SFN unter physiologischen Bedingungen untersucht wurden, sollte die Rolle beider Faktoren bei der Entstehung und dem Fortschreiten einer Entzündung im Colon beurteilt werden. Während der 3- bis 4-wöchigen SFN-Applikation, in welcher eine einmalige i.p. Applikation des Colonkanzerogens AOM erfolgte und die Tiere über eine Woche das entzündungsfördernde DSS im Trinkwasser erhielten, wurde der Zustand und das Gewicht der Mäuse jeden 2. Tag kontrolliert. Entsprechende Kontrollmäuse, denen statt AOM Saline appliziert und zusätzliches Trinkwasser verabreicht wurde, wurden gleich behandelt. 4 Tiere einer jeden Gruppe wurden direkt nach Ende der SFN-Applikationsphase getötet und bei Entnahme der Organe besonders auf die Morphologie des Colon und weitere Auffälligkeiten geachtet. Von diesen Tieren wurde das Colon histologisch so aufbereitet, dass eine mikroskopische Betrachtung der Darmarchitektur und die Bewertung des Schweregrades der Entzündung möglich waren. Hieraus ergab sich der Entzündungsscore direkt nach der akuten Phase. 10 weitere Tiere einer jeden Gruppe, 9 Wochen nach Beendigung der SFN-Applikation getötet, wurden ebenso beobachtet, um klinische und makroskopische Auffälligkeiten zu einem individuellen Entzündungsscore zusammenzufassen und anschließend mit der ermittelten Tumoranzahl

(s. 3.8.) zu korrelieren. Im folgenden Kapitel werden Befunde der Mäuse beider Genotypen, GPx2^{+/+} und GPx2^{-/-}, dargestellt.

3.3.7.1 Gewichtsverlauf während der „akuten“ Versuchsphase

Ein aussagekräftiger und leicht ermittelbarer Parameter des Wohlbefindens der Tiere während der Versuchsphase ist das Körpergewicht. Abb. 24 A-C zeigt die Gewichtszunahme aller AOM/DSS-behandelten Mäuse über den Zeitraum der SFN-Applikation. Die Applikation von AOM (Tag 7) bewirkte in allen Gruppen einen kurzzeitigen direkten Gewichtsverlust, meist stärker zu verzeichnen in GPx2^{-/-} als in GPx2^{+/+} Mäusen. Auffallend war, dass die Gruppen von GPx2^{-/-} Mäusen aller 3 Selenitäten, welche SFN beginnend am Tag der AOM-Applikation über 3 Wochen erhielten, den stärksten Gewichtsverlust an diesem Tag verzeichneten. Ein verzögerter Gewichtsverlust war durch die Verabreichung von DSS (14. bis 21. Tag) zu beobachten. Vor allem selenarme GPx2^{-/-} Mäuse verloren stark an Gewicht, selenadäquat und -supplementiert gefütterte Mäuse zeigten wenig Gewichtsverlust nach Verabreichung von DSS. Alle Kontrollen nahmen konstant an Gewicht zu (Abb. 10). Ein markanter Gewichtsverlust von 1 bis 2 g oder mehr, ab Zeitpunkt der AOM-Applikation, und meist mit weiteren klinischen Symptomen der Colitis einher ging, wurde im individuellen Entzündungsscore der Tiere berücksichtigt (s. 3.7.2.).

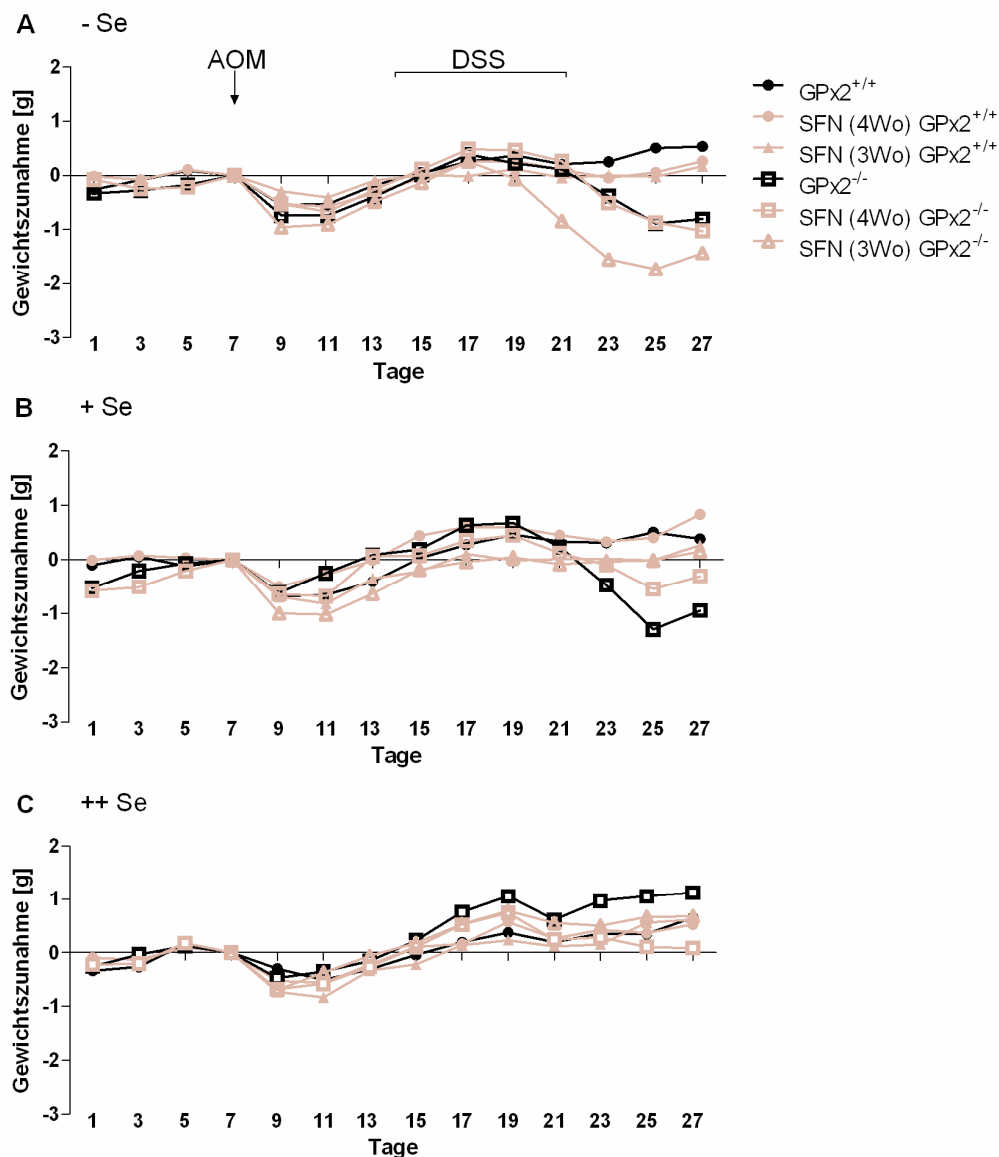


Abb. 24: Körpergewichtsentwicklung der Mäuse in der akuten Versuchsphase

Gewichtszunahme aller Se-armen (A), -adäquaten (B) und -supplementierten (C) AOM/DSS-behandelten GPx2^{+/+} und GPx2^{-/-} Mäuse über den Zeitraum der 3- (△) bzw. 4-wöchigen (○, □) SFN-Applikation (rot). Am Tag 7 fand die AOM-Applikation statt, Gewichte dieses Tages bilden das Bezugsgewicht. Die Verabreichung von DSS erfolgte vom 14. bis 21. Tag. MW, n=14.

3.3.7.2 Entzündungsscore

Mit Hilfe eines Scores, der klinische Symptome, makroskopische Auffälligkeiten sowie histologische Befunde (s. Tab. 8; 2.5.4) berücksichtigt, wurden die Tiere hinsichtlich ihrer Entzündung im Colon bewertet. Von Tieren, die direkt nach SFN-Applikation getötet wurden, standen für die mikroskopische Bewertung serielle Colonschnitte mit

H&E- und CD3-Antikörper-Färbung zur Verfügung. In Abb. 25 A dargestellt ist ein Ausschnitt aus gesunder Colonmukosa eines Kontrolltieres mit vollständig ausgebildeten Krypten und wenigen physiologisch vorkommenden mobilen CD3-positiven Lymphozyten. Abb. 25 zeigt des Weiteren Beispiele für das Ausmaß entzündlicher Veränderungen bei einer milden (B), moderaten (C) und schweren (D) Entzündung. Maximal wurden 16 Score-Punkte vergeben (Abb. 26).

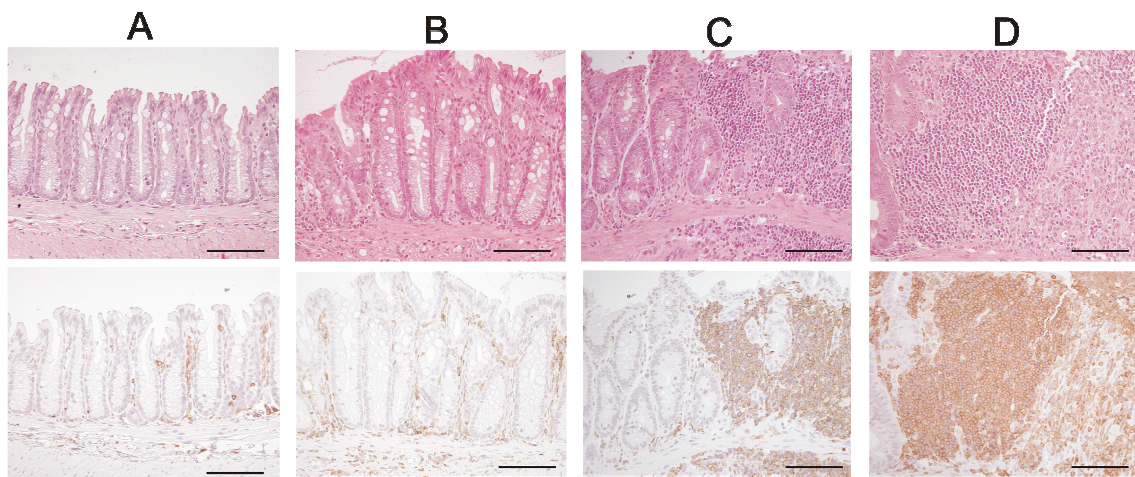


Abb. 25: Schweregrad der Entzündung

Beispiel für ein Kontrolltier (A) mit einem Entzündungsscore von 0 Punkten, eine milde Entzündung (B) 1-5 Punkte, eine moderate Entzündung (C) 6-10 Punkte und eine schwere Entzündung (D) 11-16 Punkte, im H&E-Schnitt (oben) sowie seriellen CD3-angefärbten Schnitt (unten). Der schwarze Balken entspricht einer Länge von 100 μ m.

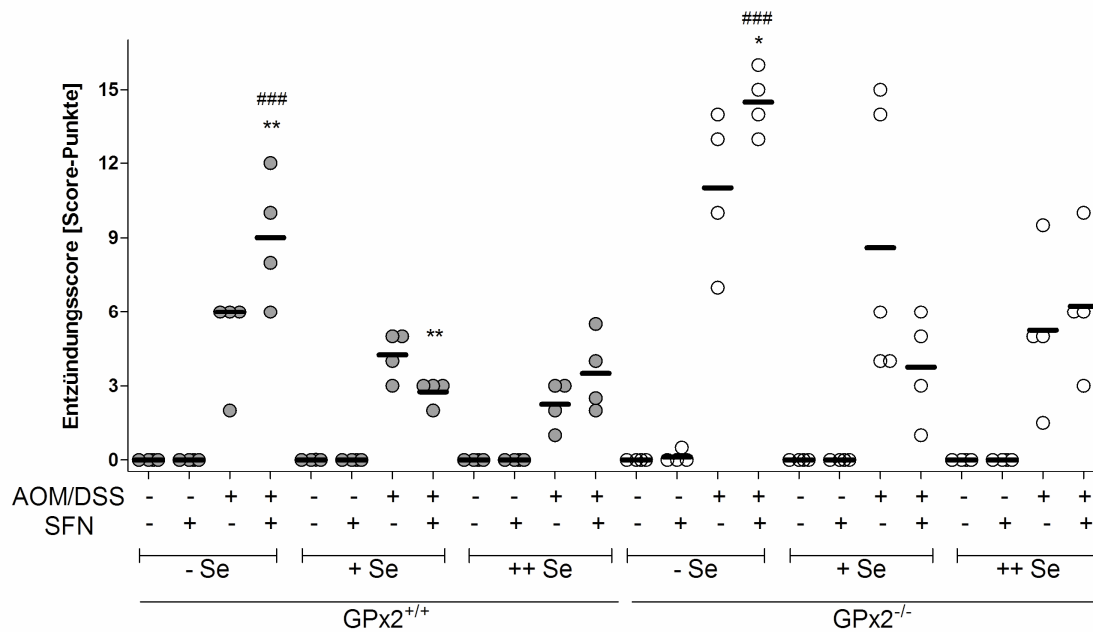


Abb. 26: Entzündungsscore in Abhängigkeit des Selenstatus, des Genotyps und SFN- bzw. AOM/DSS-Behandlung

AOM/DSS behandelte Se-arme (-Se), -adäquate (+Se) und -supplementierte (++) GPx2^{+/+} und GPx2^{-/-} Mäuse, über 4 Wochen mit/ohne SFN behandelt, wurden hinsichtlich ihrer Entzündung im Colon bewertet. Dargestellt ist der Grad der akuten Entzündung aller einzelnen Tiere sowie der Median, zusammengesetzt aus klinischen, makroskopischen und histologischen Parametern, n=4. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. unbehandelte AOM/DSS-Gruppe; ### $p < 0,001$ vs. entsprechende selenadäquate Gruppe mittels 1way ANOVA.

Verglichen mit allen nicht-behandelten Kontrollen induzierte die Kombination aus AOM/DSS signifikant Entzündungen in allen Gruppen (Abb. 26). Selenmangel verstärkte hierbei die Entzündung, selenarme Tiere zeigten deutlich schwerere Entzündungssymptome als selenadäquate. Ein stärkeres Ausmaß der Entzündung zeigten sogar selenarme Tiere, welche zusätzlich mit SFN behandelt wurden. Klinische Symptome wie Gewichtsverlust, länger andauernder und teilweise blutiger Durchfall sowie Schwellungen und Verkürzungen des Darmes wurden durch histologische Befunde bestätigt. Ulzerative Areale, leichte Ödeme mit Infiltrationen, sowie Einblutungen in Mucosa und Submucosa traten häufiger auf, eine größere Anzahl an hyperproliferativen Krypten ließen die beginnende Regeneration erkennen. Zum Teil waren große Areale vom Verlust funktionsfähiger Krypten betroffen. Auch die Muskelschicht war stark verdickt. Selenadäquate Tiere ohne SFN wiesen ein bis zwei ulzerative Areale und leichte Ödem- bzw. Regeneratbildung auf. Die Kryptenarchitektur war lediglich im distalen Colon leicht gestört, der Wandaufbau im restlichen Colon war regulär. Eine signifikante Verbesserung des Entzündungsstatus zeigte die Behandlung mit SFN in selenadäquaten

Mäusen. Diese Tiere zeigten keinerlei Durchfallerscheinungen bzw. konnten durch besser funktionierende Regenerationsfähigkeit geschädigter Krypten größere Gewichtsverluste verhindern. Nur wenige entzündliche Zellen infiltrierten und kleinere ödematöse Areale waren zu beobachten. Tendenziell noch weniger Entzündung zeigten sogar selen-supplementierte Tiere, wobei die Behandlung mit SFN hier keine Veränderung bewirkte. Wenige kleine, infiltrierte oder ödematöse Areale, in ihrer Architektur sehr gering veränderte Krypten und eine komplett geschlossene Mukosa waren Grundlage für das Fehlen von Durchfallerscheinungen und Gewichtsverlust. Somit ist der Einfluss von SFN abhängig vom Selenstatus der Mäuse, im selenadäquaten Zustand wirkt es begünstigend auf die Verhinderung der Entzündung, im selenarmen Zustand besitzt es eher adverse Effekte, wohingegen es im selen-supplementierten Zustand keine Veränderung bewirkt.

Generell verschlimmerte das Fehlen der GPx2 das Ausmaß der Entzündung in allen 3 Selenidäten. Selenarme GPx2^{-/-} Mäuse waren am stärksten betroffen, wobei eine Behandlung mit SFN diesen Zustand noch verschlechterte. Diese Tiere verloren sehr stark an Gewicht und zeigten lang anhaltenden blutigen Durchfall, was sich im kompletten Verlust großer Mukosa-Areale widerspiegelte. Die zerstörte epitheliale Barriere resultierte im Auftreten von großen Ödemen mit wenigen hyperproliferativen Krypten. Eine massive lymphozytäre und granulozytäre Infiltration wurde begleitet von einer stark ödematösen Lamina submucosa sowie einer verdickten Muskelschicht. Selenadäquate GPx2^{-/-} Mäuse verhielten sich sehr unterschiedlich im Hinblick auf die Ausprägung der Entzündung, dennoch zeigten sie schwerwiegendere Entzündungssymptome als entsprechende GPx2^{+/+} Mäuse. Analog zu GPx2^{+/+} Mäusen vermochte SFN auch in selenadäquaten GPx2^{-/-} Mäusen die Entzündung signifikant zu vermindern. Die im Vergleich zu selen-supplementierten GPx2^{+/+} Mäusen etwas stärkere Entzündung entsprechender GPx2^{-/-} Mäuse wurde durch SFN nicht beeinflusst.

Aufgrund der Nutzung des gesamten Colon zur Auszählung von Tumoren blieb eine histologische Befundung von Colonschnitten der 10 Tiere pro Gruppe, die 9 Wochen nach Ende der SFN-Applikation getötet worden, aus. Lediglich klinische Daten und makroskopische Auffälligkeiten wurden in den Score einbezogen. Für den entsprechen-

den Entzündungsstatus ergab sich ein maximaler Wert von 8 Score-Punkten (Abb. 27). Generell mit o. g. Aussagen korrelierend, ergab sich ein ähnliches Verteilungsmuster, wenn auch insgesamt weniger stark ausgeprägt. Selenarme Tiere waren nicht wesentlich stärker betroffen als selenadäquate oder -supplementierte Tiere. Auch SFN bewirkte nur tendenziell eine Verminderung entzündlicher Symptome, wenngleich die 3- bzw. 4-wöchige Gabe sehr inkonsistente Auswirkungen hatte. Auffällig war dennoch die deutlich stärkere Ausprägung der Entzündung in GPx2^{-/-} Mäusen. GPx2^{-/-} Tiere aller 3 Selen-diäten, die zusätzlich SFN erhielten, zeigten im Vergleich dazu kein deutlich verändertes Verhalten. „Auf lange Sicht“ ist ein Effekt von SFN und dem Selenstatus auf die Entzündung nicht mehr so gut nachvollziehbar wie nach direkter Wirkung. Makroskopische Veränderungen waren 9 Wochen nach der akuten Phase weniger auffällig. Werden der Grad der Entzündung eines jeden einzelnen Tieres und dessen entsprechender Tumoranzahl (Abb. 28) genauer betrachtet, ist eine Korrelation zu beobachten. In Tieren mit stärker ausgeprägten Entzündungssymptomen waren meist mehr Tumore zu beobachten, zum Teil waren diese auch größer.

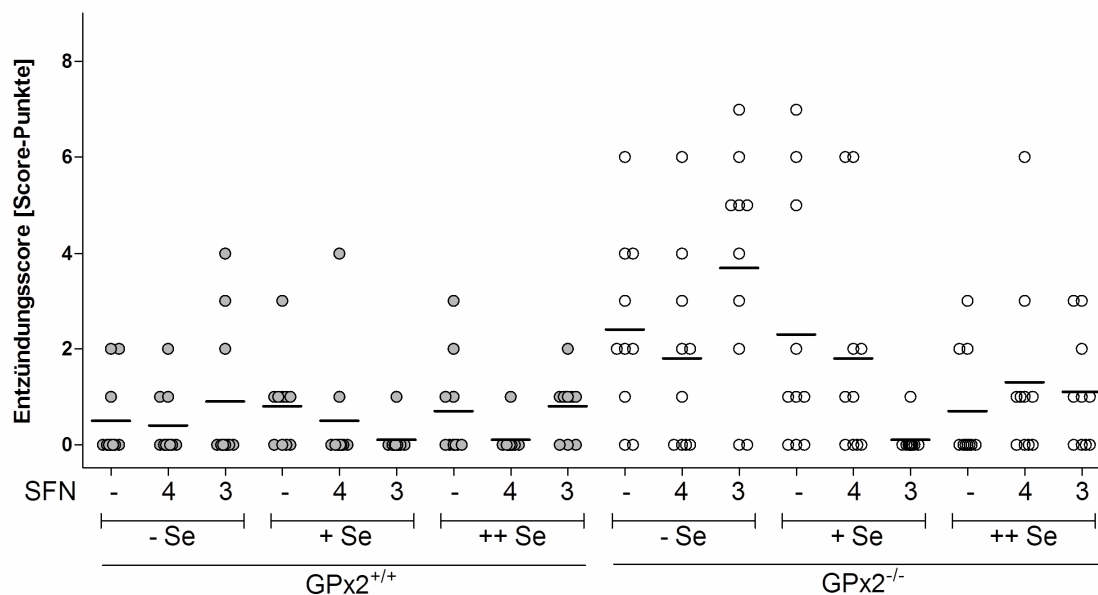


Abb. 27: Schweregrad der Entzündung im Langzeitversuch in Abhängigkeit von SFN und Se sowie dem Genotyp

AOM/DSS behandelte Se-arme (-Se), -adäquate (+Se) und -supplementierte (++) GPx2^{+/+} und GPx2^{-/-} Mäuse, über 3 bzw. 4 Wochen mit/ohne SFN behandelt, wurden hinsichtlich der Entzündung im Colon bewertet. Dargestellt ist der Grad der Entzündung aller einzelnen Tiere sowie der MW, zusammengesetzt aus klinischen und makroskopischen Parametern, n=10.

3.3.8 Einfluss von SFN und Se auf die Bildung von ACF und Tumoren im Colon

Chung *et al.* [42] beobachteten eine geringere Anzahl an AOM-induzierten ACF in SFN-behandelten Ratten. Auch ein präventiver Einfluss von Se auf die Bildung von ACF wird beschrieben [188, 232]. Diese protektiven Effekte konnten in diesem Versuch nicht beobachtet werden. Weder der Selenstatus noch die Behandlung mit SFN beeinflussten sowohl die Inzidenz als auch die Anzahl an ACF pro Tier (Tab. 10). Auch in GPx2^{-/-} Mäusen waren diese Parameter wider Erwarten nicht erhöht. Die Untersuchung des Einflusses auf die Entstehung der als Vorstufe für Tumore geltenden präneoplastischen Neubildungen stellt sich in diesem Versuch schwierig heraus. Ein Einfluss der stattgefundenen Entzündung ist möglich.

Tab. 10: Inzidenz und Anzahl der ACF in Abhängigkeit von Se und SFN sowie dem Genotyp

Im Colon von AOM/DSS behandelten Se-armen (-Se), -adäquaten (+Se) und -supplementierten (++) GPx2^{+/+} und GPx2^{-/-} Mäusen, über 3 bzw. 4 Wochen mit/ohne SFN behandelt, wurden ACF gezählt. n=10.

Fütterung	SFN [Wochen]	GPx2 ^{+/+}			GPx2 ^{-/-}		
		Inzidenz ACF	Anzahl ACF [Med]	Krypten pro Focus	Inzidenz ACF	Anzahl ACF [Med]	Krypten pro Focus
-Se	0	9/10	4 ± 1,6	4,4 ± 2,3	7/10	3 ± 3,8	4,5 ± 2,3
	4	6/10	2,5 ± 1,7	3 ± 1,4	8/10	3,5 ± 2,9	4,2 ± 1,6
	3	5/10	3 ± 2,2	4,3 ± 1,8	6/10	2,5 ± 1,8	3,6 ± 2,5
+Se	0	10/10	4 ± 2,3	4,7 ± 6,6	8/10	3,5 ± 1,7	4,2 ± 3
	4	9/10	4 ± 2,6	4,2 ± 2,6	8/10	2,5 ± 2,5	3,5 ± 1,5
	3	10/10	4 ± 1,8	5,5 ± 2,5	10/10	3 ± 2,0	4,7 ± 2,1
++Se	0	9/10	3 ± 2	3,8 ± 2,6	8/10	3 ± 1,8	3,4 ± 1,9
	4	8/10	3 ± 0,6	3,5 ± 2,6	7/10	1 ± 2,2	3,5 ± 1,2
	3	9/10	4 ± 2,8	4 ± 1,2	8/10	4 ± 4,4	4,8 ± 2,1

SFN beeinflusst eine Vielzahl von Prozessen im Hinblick auf die allgemeine Kanzerogenese [233] und wird als antikanzerogen wirksam diskutiert. Eine genauere Bedeutung der Auswirkung von SFN in der Kombination mit verschiedenen Selengehalten ist bislang nicht geklärt. Auf Basis dessen sollte der Einfluss von SFN im Zusammenhang mit verschiedenen Selenstatus auf die durch AOM induzierte, entzündungsverstärkte Colonkanzerogenese in der Maus untersucht werden. Weiterhin sollten eventuelle Wechselwirkungen zwischen SFN und Se bei Abwesenheit von GPx2 in Bezug zur Tumorentstehung ermittelt werden. Verglichen mit selenadäquaten Tieren, waren die Tumorzinzi-

denzen in selenarmen und -supplementierten Tieren geringfügig höher (Tab. 11). Nicht alle Tiere, die mit AOM/DSS behandelt wurden, entwickelten Tumore. Eine durchschnittliche Inzidenz von 50% wurde, Voruntersuchungen zufolge, erwartet. Sehr inkonsistente Effekte auf die Häufigkeit von Tumoren bewirkte SFN. Weder eine 4-wöchige, noch eine 3-wöchige, gleichzeitig mit der AOM-Applikation beginnende SFN-Gabe beeinflusste einheitlich die Tumorzinzidenz positiv oder negativ. Lediglich der gleichzeitige Beginn der SFN-Behandlung mit AOM in selenadäquaten GPx2^{+/+} Mäusen senkte die Tumorzinzidenz auf 20%. Mit dem Entzündungsstatus korrelierend, zeigten GPx2^{-/-} Mäuse eine höhere Tumorzinzidenz als GPx2^{+/+} Mäuse. Einen Einfluss auf die Tumorgöße hatten weder der Selenstatus noch die SFN-Behandlung, auch GPx2^{-/-} Mäuse zeigten ähnlich große Tumore wie GPx2^{+/+} Mäuse. Eine weiter vorangeschrittene Entartung und Ausbildung von bösartigen Karzinomen trat in keinem der Tiere auf, es wurden lediglich im Schleimhautniveau liegende, flache oder polyploide Adenome beobachtet. Die Verteilung derer divergierte stark innerhalb der Gruppen, so dass ein Einfluss von SFN und Se auf das Erscheinungsbild der, noch als gutartig klassifizierbaren Neubildung ausgeschlossen werden kann.

Tab. 11: Tumorzinzidenz und -größe in Abhängigkeit vom SFN und Se sowie dem Genotyp

Im Colon von AOM/DSS behandelten Se-armen (-Se), -adäquaten (+Se) und -supplementierten (++) GPx2^{+/+} und GPx2^{-/-} Mäusen, über 3 bzw. 4 Wochen mit/ohne SFN behandelt, wurden Tumore gezählt und gemessen. n=10.

Fütterung	SFN [Wochen]	GPx2 ^{+/+}		GPx2 ^{-/-}	
		Tumorzinzidenz	Tumorgöße [mm, MW ± SD]	Tumorzinzidenz	Tumorgöße [mm, MW ± SD]
-Se	0	5/10	2,2 ± 0,5	7/10	1,5 ± 0,3
	4	6/10	1,7 ± 0,9	8/10	1,7 ± 0,6
	3	5/10	1,5 ± 0,6	9/10	1,7 ± 0,5
+Se	0	4/10	1,9 ± 1,7	4/10	1,8 ± 0,6
	4	4/10	1,7 ± 0,6	5/10	1,6 ± 1,0
	3	2/10	2,5 ± 0,6	5/10	1,8 ± 0,3
++Se	0	5/10	1,9 ± 0,3	7/10	1,3 ± 0,7
	4	7/10	2,4 ± 0,6	5/10	2,2 ± 1,7
	3	4/10	1,8 ± 1,2	7/10	1,2 ± 0,4

Ein sehr deutlicher Einfluss des Selenstatus und der SFN-Behandlung war hingegen in Bezug auf die Tumorzanzahl zu beobachten (Abb. 28). Ein Mangel an Se hatte keinen

Einfluss auf die Anzahl an Tumoren im Vergleich zu adäquaten Tieren je Tier. Im Gegensatz dazu zeigten selensupplementierte Tiere deutlich weniger Tumore. Eine 4-wöchige Behandlung mit SFN, welche eine Woche vor AOM-Applikation startete, beeinflusste die Anzahl an Tumoren in keiner der 3 Selendiäten. Dagegen verringerte die gleichzeitig mit der AOM-Applikation beginnende SFN-Behandlung die Anzahl an Tumoren in selenadäquaten Mäusen ($p=0,07$). Auf die bereits relativ niedrige Tumoran Zahl in selensupplementierten Mäusen hatte es jedoch keinen Einfluss. Einige selenarm gefütterte Tiere wiesen mit der 3-wöchigen SFN-Behandlung eine höhere Tumoran Zahl auf. Das Ausmaß der Tumoran Zahl war in $GPx2^{-/-}$ Mäusen ähnlich dem von $GPx2^{+/+}$ Mäusen. Tendenziell mehr Tumore wurden in Tieren in selenarmem und -adäquatem Zustand detektiert ($p=0,14$). Eine 3-wöchige SFN-Behandlung hatte auch in selenadäquaten und -supplementierten Mäusen dieses Genotyps einen positiven Einfluss, selenadäquate Mäuse zeigten sogar signifikant weniger Tumore im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen. Der Selenstatus beeinflusst demnach die Tumorentstehung geringfügig, wohingegen sich die Behandlung mit SFN, vor allem unter Berücksichtigung des Applikationsbeginns enorm auf die Tumoran Zahl auswirkt.

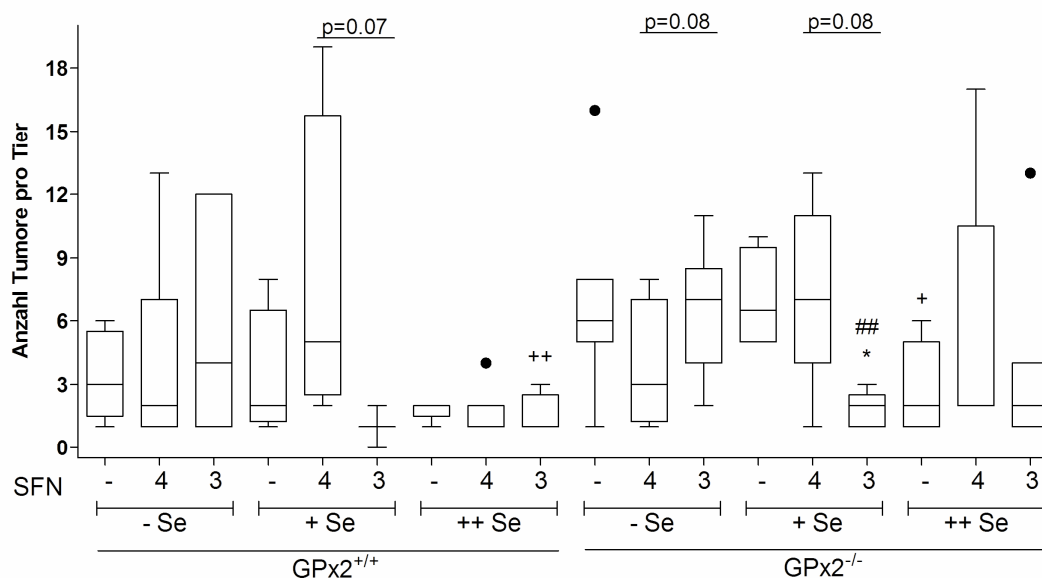


Abb. 28: Tumoran Zahl in Abhängigkeit vom Se und SFN sowie dem Genotyp

Im Colon von AOM/DSS-behandelten Se-armen (-Se), -adäquaten (+Se) und -supplementierten (++) $GPx2^{+/+}$ und $GPx2^{-/-}$ Mäusen, über 3 oder 4 Wochen mit/ohne SFN behandelt, wurden Tumore gezählt. Als Boxplot dargestellt ist die Tumoran Zahl in Tieren, die Tumore aufwiesen. Schwarze Punkte kennzeichnen Extremwerte. Signifikanzen, wenn nicht anders angegeben: * $p < 0,01$ vs. unbehandelte Kontrolle; ## $p < 0,01$ vs. entsprechende Se-arme Gruppe; + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$ vs. entsprechende Se-adäquate Gruppe, mittels Mann-Whitney U-Test.

4 Diskussion

4.1 Synthetisches SFN und hydrolysiertes GRA sind in ihrer Effektivität auf die Nrf2-vermittelte Signaltransduktion vergleichbar

Durch den Konsum von Gemüse der Gattung *Brassica oleracea*, eine gute Quelle für mehr als 120 verschiedene Glucosinolate darstellend [234], gelangen nach Hydrolyse deren Metabolite in die Zirkulation. Intakte Glucosinolate sind biologisch inaktiv. Vor allem Brokkolisprossen enthalten besonders hohe Gehalte des aliphatischen Glucosinolates GRA. Die für eine biologische Aktivierung notwendige hydrolytische Spaltung von GRA mittels des Enzyms Myrosinase resultiert in der Bildung des sehr aktiven ITC's SFN. Die biologische Aktivität von hydrolysiertem GRA und synthetischem SFN wurde in dieser Arbeit durch Analyse der Nrf2 Kerntranslokation mittels Western Blot (Abb. 6) und der NQO1-Aktivität (Abb. 7) in HepG2 Zellen demonstriert. Nichthydrolysiertes GRA beeinflusste weder die Nrf2 Translokation in den Kern, noch wurde durch ansteigende Konzentrationen des intakten Glucosinolates die NQO1-Aktivität gesteigert. Im Gegensatz dazu induzierte hydrolysiertes GRA konzentrationsabhängig und signifikant die Translokation von Nrf2 in den Kern. Die Effektivität der Induktion durch hydrolysiertes GRA war vergleichbar mit der von synthetischem SFN. Auch der GPx2 Promotor (Abb. 8) und die NQO1-Aktivität (Abb. 7) war durch hydrolysiertes GRA und synthetisches SFN in gleichem Ausmaß aktiviert. SFN ist ein chirales Molekül, natürlicherweise kommt es in der R-Konfiguration vor. Es ist bekannt, dass aus Brokkoli isoliertes R-SFN das gleiche induzierende Potential wie synthetisches (R,S)-SFN besitzt, welches ein Racemat aus beiden Enantiomeren darstellt [17, 235]. In der vorliegenden Arbeit wurde hydrolysiertes GRA mit synthetischem SFN auch *in vivo* hinsichtlich Effektivität und der lokalen Wirkung verglichen. Die optimale Induktion von Phase II Enzymen war Voraussetzung zur Untersuchung der Wechselwirkung von SFN und Se im Colonkrebsmodell. Die Steigerung der Expression bzw. Aktivität von NQO1, TrxR und GPx2 durch beide Substanzen war in den meisten der untersuchten Organe vergleichbar (Tab. 9). Induzierende Effekte auf Proteinmenge und Aktivität von NQO1 waren dabei am deutlichsten und in einigen Organen mit hydrolysiertem GRA stärker als mit synthe-

tischem SFN. Die durch hydrolysiertes GRA hervorgerufene starke Wirkung im Colon im Vergleich zu synthetischem SFN lässt vermuten, dass die zuvor durchgeführte Hydrolyse unvollständig verlief. Eventuell waren Reste intakten GRA's vorhanden. Durch Zerstörung des Enzyms oder nicht optimale Reaktionsbedingungen wäre eine mangelnde bzw. unvollständige Hydrolyse von GRA möglich. Im Colon wäre jedoch die mikrobielle Myrosinase in der Lage, eben diese Reaktion zu katalysieren. Dies würde dazu führen, dass aufgenommenes intaktes GRA unverdaut in das Colon gelangt und dort durch intestinale Hydrolyse daraus entstandenes aktives SFN lokal wirken kann. Die Effektivität der Hydrolyse wurde jedoch mittels HPLC überprüft und war vollständig.

4.2 Effekte von SFN sind von der Behandlungsdauer abhängig

Eine längere Aufnahme von SFN lässt keine stärkeren Effekte erwarten. Eine Behandlung von HepG2 Zellen mit SFN für 48 h induzierte signifikant die NQO1-Aktivität und war höher als die nach einer Behandlung für 24 h. Sie bewirkte jedoch ebenso eine höhere Aktivität des Phase II Enzyms als eine Behandlung über 72 bzw. 96 h (3.1.3.). Eine Sättigung der maximalen Induzierbarkeit der NQO1-Aktivität im Verlauf der Zeit wäre also möglich. *In vivo* erzielte eine Behandlung mit SFN über 4 Wochen in verschiedenen Organen geringere Effekte als eine Behandlung über 1 Woche (Tab. 9). Auffällig war besonders, dass die NQO1-Aktivität im Colon durch SFN über 4 Wochen nicht höher war als die basale Aktivität. Einen deutlichen SFN-Effekt erzielte jedoch die Behandlung über 1 Woche. Eine Anpassung des Organismus an SFN ist also denkbar. Die Wirksamkeit von SFN hängt stark von dem Vorhandensein der bioaktiven Form, der Verteilung sowie der Metabolisierung im Körper ab. Eine schnelle passive Absorption aufgrund der lipophilen Struktur und kleinen molekularen Masse führt dazu, dass bereits 1 Stunde nach Aufnahme von SFN die höchsten Gehalte im Plasma erreicht werden und ca. 10% der aufgenommenen Menge betragen [8, 236]. Eine kleine Portion von 100 g Brokkoli (Frischgewicht) führt beim Menschen zu einem Plasmagehalt von 50 bis 200 μmol SFN [237]. Eine schnelle Verteilung mit entsprechendem Rückgang der Plasmagehalte resultiert aus der hohen intrazellulären Aufnahmerate und Konjugation mit GSH mittels GST's. Vor allem GSTM1-1 und GSTP1-1 katalysieren diese Reaktion [238].

Entstandenes Dithiocarbamat kann stark akkumulieren und zu hohen Konzentrationen innerhalb der Zelle sowie zur Promotion einer weiteren zellulären Aufnahme führen [239]. Eine Akkumulation im Plasma erfolgt demzufolge nicht. Trotz noch detektierbarer Gehalte nach 24 h führt auch eine wiederholte Aufnahme von Brokkoli nicht zu erhöhten Plasmagehalten. Probanden erhielten über 10 aufeinander folgende Tage 300 ml Brokkolisaft. Die Entnahme von Blut zu bestimmten Zeitpunkten bis 24 h nach der ersten sowie der letzten Einnahme zeigte, dass die Profile der SFN-Konzentrationen im Plasma zu beiden Zeitpunkten identisch verlaufen und durch wiederholte Exposition nicht gesteigert werden können [240].

SFN induziert des Weiteren seinen eigenen Metabolismus, in welchem die Konjugation mit GSH den initialen Schritt darstellt. Im Magen, Duodenum und Colon, sowie teilweise in der Leber war eine deutliche Steigerung der GST-Aktivität durch die 4-wöchige SFN-Behandlung zu verzeichnen (Abb. 20). Die Induktion der GST-Expression [241] kann zum einen zu niedrigeren Plasmakonzentrationen von SFN und folglich zu höheren intrazellulären Konzentrationen und längerem Verweilen des ITC im Körper führen. Zum anderen kann dies eine erhöhte Metabolisierung sowie eine schnellere Eliminierung der aktiven Substanz zur Folge haben. Hinzu kommt, dass verschiedene Polymorphismen in einigen Genen dieser Enzymfamilie existieren. Zahlreiche divergierende Studien belegen, dass in Abhängigkeit des Genotyps der Konsum von glucosinolatreichem Gemüse einen größeren Schutz vor bestimmten Krebserkrankungen bietet, oder aber auch ein höheres Risiko mit sich bringen kann. So besitzen GSTM1-positive US-Amerikaner durch den Verzehr von Brokkoli oder anderen *Brassica* Gemüsesorten allgemein ein geringeres Risiko für Prostata- und Lungenkrebs [68, 242]. Es wird postuliert, dass eine geringere Ausscheidungsrate der SFN-Metabolite [243] durch die Interaktion freien SFN's mit Proteinen [244] antikanzerogene Aktivitäten gewährleistet. Im Gegensatz dazu wurde ein protektiver Effekt von Brokkoli auf die Prävalenz von colorektalen Adenomen lediglich in GSTM1-null Genotypen bestätigt [212]. Es wird zudem diskutiert, ob vorzugsweise die freie oder die konjugierte Form für die Enzyminduktion verantwortlich ist [12]. Nur maximal 5% der ITC liegt in freier Form vor. Die Konsequenz der induzierten GST-Aktivität durch SFN ist demzufolge nicht abschließend zu bewerten. Es kann vermutet werden, dass über die Dauer von 4 Wochen die im Tierver-

sich kontinuierlich applizierte physiologische Konzentration an SFN vielmehr eine Anpassung des Organismus erreichte, indem aufgenommenes SFN schneller metabolisiert und ausgeschieden wurde. Dafür spricht des Weiteren, dass SFN zeitabhängig die Expression des Transportproteins MRP-2, und somit den eigenen Efflux ins Darmlumen induziert [18]. Dies würde erklären, warum die Effekte auf die Nrf2-Zielgene NQO1, TrxR und GPx2 in einigen Organen nach 4-wöchiger Behandlung mit SFN im Vergleich zur 1-wöchigen Behandlung geringer ausfielen. Eine kurzfristige einmalige Gabe von SFN führt demnach zu stärkeren Induktionen von NQO1, TrxR und GPx2, so dass die Empfehlung von häufigem Konsum von Brokkoli zur Krebsprävention kontraproduktiv wäre. Ein unregelmäßiger Verzehr von Brokkoli oder anderen SFN-reichen *Brassica* Gemüsesorten wäre eventuell günstiger. Der Verzehr von Glucosinolat-Supplementen und -angereichertem Gemüse ist zudem kritisch zu betrachten, da auch negative Effekte beobachtet wurden.

4.3 Wechselwirkungen von SFN und Se auf Nrf2-regulierte Enzyme

4.3.1 Physiologische Bedingungen

Phase II Enzyme operieren gewöhnlich nicht mit maximaler Kapazität, sondern sind durch eine große Anzahl chemischer oder natürlich vorkommender Substanzen aus der Umwelt in ihrer Aktivität induzierbar. Vor allem durch gewisse Nahrungsmittel - wie *Brassica* Gemüse - werden bioaktive Komponenten aufgenommen, die nach Absorption und Verteilung im Körper zu entsprechenden Effekten führen können. SFN beeinflusst via Nrf2 nicht nur Phase II Enzyme sondern auch Selenoproteine wie GPx2 [169] und TrxR1 [245]. Allgemein werden Phase II Enzyme als detoxifizierend betrachtet, da sie entweder durch Konjugationsreaktionen reaktive Fremdstoffe eliminieren oder den zellulären Spiegel antioxidativer Moleküle wie GSH erhöhen und vor oxidierenden Spezies schützen. Die Profile der basalen Aktivitäten von NQO1, TrxR, GPx und GST im Verlauf des GIT wurden bisher nicht beschrieben. Die relativ hohe NQO1-Aktivität im Magen der Mäuse war, im Hinblick auf die Funktion der NQO1 im Fremdstoffmetabolismus und der eigentlichen Verdauung und Resorption im Intestinaltrakt, erstaunlich (Abb. 11). Dennoch sprach sie sehr stark auf den direkten Einfluss von SFN an

(Abb. 12) und weist somit auf eine starke lokale Wirkung des ITC's hin. Auch ein durch SFN gehemmtes Wachstum von *H. pylori*, sowie die Fähigkeit, gastrische Neoplasien in Mäusen zu reduzieren, resultierte vor allem aus der Nrf2-vermittelten Induktion von Phase II Enzymen [45]. Eine deutliche Steigerung der NQO1-Aktivität bewirkte SFN des Weiteren im Duodenum und Ileum, wobei stärkste SFN-Effekte im Selenmangel zu beobachten waren. Anscheinend wird durch die Kombination aus Selenmangel und SFN-Behandlung der Nrf2/ARE-Signalweg am effektivsten aktiviert. Eine Aktivierung von Nrf2-Zielgenen im Selenmangel beobachteten Müller *et al.* [246]. Im Duodenum selenarm gefütterter Mäuse war die Aktivität von NQO1 höher als die von -adäquaten Mäusen. Dies konnte in dieser Arbeit trotz gleicher Selengehalte im Futter nicht bestätigt werden (Abb. 11). Zwar zeigten selenarme Mäuse leicht erhöhte NQO1-Aktivitäten in Leber, Duodenum und proximalem Jejunum, da die Unterschiede jedoch nicht signifikant waren, ist zunächst nicht von einem Effekt des Selenmangels auf die Aktivierung von Nrf2 auszugehen. Der in diesem Tierversuch induzierte Selenmangel war eventuell nicht ausreichend für das Hervorrufen oxidativen Stresses zur Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges. Geringere Selenspiegel bzw. die komplette Defizienz werden dafür benötigt. Burk *et al.* [192] erreichten letztere und zeigten eine deutlich gesteigerte Transaktivierung des ARE Reporters und eine erhöhte Aktivität von HO-1, NQO1 und GST. Als Erklärung wurde ein durch Selenmangel bedingter oxidativer Stress herangezogen. Ein Mangel des als Antioxidans eingesetzten Vitamin E rief diese Veränderungen nicht hervor. In der vorliegenden Arbeit wurde der Selenstatus der Mäuse durch Fütterung mit verschiedenen Selendiäten über den gesamten Versuchszeitraum eingestellt und zunächst anhand des Plasmaselengehaltes bestätigt (Abb. 9). Er stellte sich als, besonders in physiologischen Bereichen, sehr beeinflussbare Größe heraus. Eine Halbierung des als adäquat geltenden Selengehaltes von 0,15 mg/kg Futter bewirkte eine rasche Abnahme des Plasmaselengehaltes. Dagegen war der Plasmaselengehalt nach Supplementierung (0,6 mg/kg Futter) nur etwas höher als der mit adäquatem Futter.

Im Colon war die basale Aktivität von NQO1 höher als in den Dünndarmabschnitten (Abb. 11). Hierfür ist möglicherweise ein reicher Bestand an Darmbakterien verantwortlich. Die Relevanz der intestinalen Mikrobiota für die Aktivität fremdstoffmetabolisierender Enzyme ist bekannt [247, 248]. Eine Induktion durch SFN erfolgte nur marginal

und lediglich im distalen Bereich des Colon (Abb. 14). Die Analyse der Enzymaktivität und Proteinexpression erfolgte aus versuchstechnischen Gründen nur in einem 2 cm großen Stück des proximalen Colon. Dies ist eine Erklärung für den ausbleibenden SFN-Effekt, da auch auf histologischer Ebene keine Induktion von NQO1 im proximalen Colon beobachtet werden konnte (Abb. 14). Im proximalen und transversen Colon im gesamten Cytosol verteilt, war NQO1 im distalen Colon vor allem im Kern vorzufinden. Stärkere SFN-Effekte in diesem Bereich deuten darauf hin, dass dieser Abschnitt empfänglicher für pro- oder antitumorogene Prozesse sein könnte. Nukleäres NQO1 wurde in humanen Tumorzellen lokalisiert [60]. Somit wäre eine Bioaktivierung von DNA-schädigenden antitumorigenen Substanzen durch NQO1 möglich, für deren toxische Aktivität die Nähe zur DNA wichtig ist. Die Funktion einer gesteigerten Expression von NQO1 in verschiedenen Tumoren wird diskutiert [57, 62].

Die basale TrxR-Aktivität verlief entlang des GIT relativ konstant und war in Se-gefütterten Tieren stets höher (Abb. 15). Am deutlichsten war der Seleneffekt im oberen Dünndarm, dem Abschnitt, in welchem Se vor allem absorbiert wird [249, 250]. Auch SFN steigerte die TrxR Gesamtaktivität, z.T. sogar im Selenmangel, obwohl lediglich die Expression von TrxR1 durch eine Behandlung mit SFN beeinflussbar ist und das Vorhandensein einer adäquaten Selenversorgung beschrieben wurde [245]. Eine sich ergänzende Wechselwirkung zwischen Se und SFN im Hinblick auf die translationale und transkriptionelle Regulation der TrxR1 scheint also stattzufinden. Eine SFN-vermittelte Induktion der TrxR-Aktivität fand vor allem in selenadäquaten sowie in -supplementierten Tieren statt. Da es sich bei TrxR um Selenoproteine handelt, für deren Synthese Se benötigt wird, ist es erstaunlich, dass in selenarmen Tieren dennoch eine Erhöhung der Aktivität durch SFN zu beobachten war. Jedoch stellen TrxR1 und TrxR3 *housekeeping* Selenoproteine dar und sind daher weniger von einer Se-Unterversorgung beeinflusst. Eventuell ist der SFN-Effekt im Selenmangel auf eine unter diesen Bedingungen vorherrschende höhere Ansprechbarkeit des Nrf2/ARE-Signalweges zurückzuführen.

Auch Glutathionperoxidasen werden mehr oder minder durch den Selenstatus beeinflusst [138]. Anhand der Messung der GPx-Aktivität im Plasma (nicht gezeigt) konnte

der eingestellte Selenstatus bestätigt werden. Im Plasma befindet sich nur die GPx3 [251]. SFN beeinflusste die GPx-Aktivität im Plasma nicht. Im Selenmangel in allen Organen sehr gering, wurde die GPx-Gesamtaktivität in selenadäquaten Mäusen vor allem in der Leber, im Magen und oberen Dünndarm stark gesteigert (Abb. 16). In der murinen Leber wird GPx2 nicht exprimiert [96]. Dies deutet darauf hin, dass es vor allem GPx1 ist, die durch den Selenstatus beeinflusst wird und verdeutlicht die niedrige Stellung von GPx1 in der Hierarchie der GPx. Die Synthese von GPx1 erfolgt also unter selenarmen Bedingungen marginal. In Abschnitten des GIT, in denen die Selenabsorption vorwiegend abläuft, ist die Steigerung der GPx-Aktivität durch Se am stärksten. Auch der, die Proteinexpression von GPx1 (Abb. 17A, 14) steigernde Effekt von Se bestätigte dies. SFN beeinflusste weder die GPx-Aktivität (Abb. 16) noch die GPx1-Expression (Abb. 17A, 14). GPx1 ist kein Nrf2-Zielgen [168, 169]. Hingegen wurde die Expression von GPx2 im Ileum (Abb. 17B) und distalen Colon (Abb. 19) mit SFN gesteigert. Die bereits beschriebene Lokalisation von GPx2 [154], konnte bestätigt werden, sie wurde entlang des kompletten Colon vor allem im Kryptengrund exprimiert (Abb. 19). Wie aufgrund der hohen Stellung der GPx2 in der Hierarchie der Selenoproteine erwartet, war die Expression von GPx2 durch den Selenstatus weniger stark beeinflusst als die von GPx1. Dies, zusammen mit der Lokalisation innerhalb der Krypte, betont die Bedeutung von GPx2 in der Regulation des physiologischen Turnovers von epithelialen Colonzellen.

4.3.2 Einfluss der Entzündung

Unter oxidativen Bedingungen, wie sie bei Entzündungsreaktionen vorherrschen, kann eine Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges erfolgen [252]. Durch Oxidation der Cysteine C151 kommt es zu einer intermolekularen Disulfidbrückenbindung zweier Keap1-Moleküle. Die dadurch bedingte Konformationsänderung verhindert die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von Nrf2 [253]. Nrf2-Zielgene werden exprimiert. Dies konnte in den AOM/DSS-behandelten Tieren aber nicht beobachtet werden. Veränderte Aktivitäten von NQO1 oder GPx waren nicht zu verzeichnen (nicht gezeigt). Entzündungsreaktionen fanden ausschließlich im Colon statt. Weder in entzündeten Arealen, noch in morphologisch intaktem Gewebe des Colon dieser Tiere war die NQO1-

Proteinexpression verändert. Lediglich die einer Ulzeration angrenzenden Krypten wiesen eine leicht erhöhte GPx2-Expression auf. Stärkere histologische Färbungen von NQO1 und GPx1 waren ferner in infiltrierten Leukozyten zu beobachten. Hingegen war durch die Entzündung die TrxR-Aktivität in Leber, Ileum und Colon in selenadäquatem Zustand leicht erhöht. Eine erhöhte Expression in humanen Tumorzellen wurde für NQO1 [57, 62] und TrxR1 [254] beschrieben. Die Rolle einer gesteigerten Expression der Enzyme in entzündetem bzw. entartetem Gewebe wird diskutiert. Diese scheint zwar vor allem präventiver Natur zu sein, die Tumorigenese antreibende Eigenschaften sind jedoch nicht auszuschließen [182, 183]. Auch GPx2 wird im frühen Stadium der Kanzerogenese [154] sowie in entzündlichem Colongewebe von CED-Patienten [255] verstärkt exprimiert. Ob GPx2 in diesem Sinne das Tumorstadium unterstützt oder dies unterbinden soll, und ob es antiinflammatorisch wirkt, bedarf näherer Untersuchungen. Gegensätzliche Funktionen von Selenoproteinen sind prinzipiell bekannt. Auch Sep15 weist nicht nur präventive Eigenschaften auf [256], ein antikanzergener Effekt der Sep15 Defizienz wird partiell durch einen G₂M-Arrest vermittelt [257]. Die bereits beschriebene Erhöhung der Plasma-GPx-Aktivität nach einer 3- bzw. 7-tägigen DSS-Behandlung [258] konnte ebenfalls nicht bestätigt werden.

4.3.3 Kompensatorische Effekte

Der Verlust eines Enzyms resultiert nicht selten in der Kompensation durch ein anderes, ähnliche Funktionen ausübendes Protein. Ein kompletter Verlust von Selenoproteinen in der Leber durch gezielte Beseitigung des für die spezifische tRNA codierenden Gens *Trsp* wurde beispielsweise durch eine erhöhte Expression verschiedener Phase II Enzyme ersetzt [228]. So waren u.a. Gene betroffen, die für im Fremdstoffmetabolismus eine wichtige Rolle spielende Proteine codieren, wie Mitglieder der Familie von CYP bzw. GST, HO-1, UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) oder GR. Eine Hemmung der TrxR-Aktivität resultierte in einer Induktion der HO-1 [259], ebenfalls ein Nrf2-Zielgen. Eine Depletion an SelW resultierte seinerseits in einer gesteigerten Aktivität der Superoxid-dismutase (SOD), Katalase, GPx, sowie der Menge an GSH [260]. Es handelt sich hierbei zwar um kompensatorische Effekte, jedoch weniger durch Nrf2-Zielgene. Die Nrf2-Signaltransduktion wurde außerdem bereits erfolgreich durch einen Mangel an Sele-

noproteinen [192] bzw. die Deletion der spezifischen tRNA^{(ser)sec} induziert [193]. Aufgrund dieser Daten wurden in GPx2^{-/-} Mäusen kompensatorische Effekte sowie niedrigere GPx-Gesamtaktivitäten erwartet. Im Gegensatz dazu war im Dünndarm sowie Colon von GPx2^{-/-} Mäusen die GPx-Gesamtaktivität unter selenadäquaten und -supplementierten Bedingungen stark erhöht [261]. Auch eine verstärkte Expression von GPx1 in den Colonekrypten, dem Bereich, in welchem unter physiologischen Bedingungen lediglich GPx2 exprimiert wird [154], bestätigte, dass bei Mangel von GPx2 die Translation von GPx1 induziert wird. Im Selenmangel war im gesamten Dünndarm die Aktivität von TrxR gesteigert (nicht gezeigt), was als Versuch einer Kompensation gedeutet werden kann. Wahrscheinlich konnte das im GPx2^{-/-} nicht genutzte Se zur Synthese von TrxR genutzt werden. Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei TrxR1 und TrxR3 um *housekeeping* Selenoproteine, beide stehen in der Hierarchie der Selenoproteine weit höher als GPx1. Diese konnte jedoch im Selenmangel nicht für eine Kompensation von GPx2 sorgen, was durch eine ausbleibende Steigerung der GPx-Aktivität sowie Expression bestätigt wurde (nicht gezeigt). Die GPx2 wird demnach durch eine gesteigerte Synthese von GPx1 kompensiert. Eine adäquate Menge an Se ist dafür notwendig. Durch SFN wurden keine weiteren kompensatorischen Effekte hervorgerufen - keine der Aktivitäten der Nrf2-Zielgene konnte mit einer Behandlung von SFN im GPx2^{-/-} weiter gesteigert werden.

4.4 SFN und Se beeinflussen die Apoptose im gesunden Colongewebe

SFN kann in Krebszellen zytotoxisch wirken und induziert dabei, abhängig von der Konzentration, Dauer und vom Zellsystem, sämtliche, für die Apoptose beschriebenen morphologischen Charakteristika [20, 27, 30, 262-264]. Die Induktion apoptotischer Prozesse durch SFN in gesundem Gewebe wurde bisher nicht beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von SFN und Se auf die Proliferation und Apoptose ausschließlich im Colon von Tieren untersucht, die nicht mit AOM/DSS behandelt wurden. Eine Auswertung in der akuten Phase nach AOM/DSS-Gabe war nicht möglich, da aufgrund fulminanter Entzündungen die Mukosa teilweise zu stark geschädigt war. Eine SFN-vermittelte Eliminierung intakter Colonzellen war nicht zu erwarten. Umso er-

staunlicher war, dass SFN unter selenarmen und -adäquaten Voraussetzungen die Apoptoserate an der Kryptenspitze tendenziell steigerte (Abb. 22). Aufgrund starker Schwankungen und einer kleinen Stichprobenzahl war der Effekt nur im Selenmangel signifikant. In selensupplementierten Tieren beeinflusste SFN die Apoptose nicht. Das Abstoßen von Colonzellen findet vor allem an der Kryptenspitze statt und führt somit insgesamt zu einer höheren Apoptoserate in diesem Abschnitt. Ein höheres Niveau an oxidativem Stress im Selenmangel, in Kombination mit der elektrophilen Eigenschaft von SFN und dessen Fähigkeit, ROS zu generieren, induziert also verstärkt Apoptosen an der Stelle, an der sie physiologischer Weise stattfindet. Se allein, in geringer oder überschüssiger Konzentration, bewirkte keinen Unterschied der Apoptoserate an der Spitze der Colorkrypten. Im 2. und 3. Kryptenviertel hingegen war diese im Selenmangel erhöht, wenn auch minimal. Selenmangel kann *in vitro* Apoptose initiieren [231].

Als hoch regulierter Prozess findet Apoptose sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Konditionen statt. Der programmierte Zelltod bildet einen wichtigen Bestandteil in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Homöostase sowie in der Eliminierung von geschädigten und vom Organismus nicht mehr benötigten Zellen. Ist die Regulation der Apoptose gestört, gerät das System aus dem Gleichgewicht und es entstehen Funktionsstörungen und Krankheiten, die in maligner Entartung münden können. Eine Induktion der Apoptose durch verschiedenste Substanzen ist möglich, der Zustand der Zelle ist dabei von Bedeutung. In gesundem Gewebe ist die Induktion der Apoptose durch externe Stimuli nicht unbedingt von Vorteil, besonders, wenn die Apoptoserate über der, unter physiologischen Umständen verlaufenden liegt. Hingegen ist die stimulierte Beseitigung entarteter Zellen als günstig zu betrachten.

Wird GPx1 hinreichend synthetisiert, besteht ein Gleichgewicht zwischen dem proapoptotischen Protein Bax und dem antiapoptotischen Bcl-2 [150]. Im Selenmangel wird GPx1 jedoch nur begrenzt exprimiert, was möglicherweise zur Veränderung des Gleichgewichts führt und somit verstärkt Apoptose stattfindet. Weiter verhindert GPx1 die CD95 induzierte Apoptose [265]. Physiologischen Bedingungen entsprechend, stellte das 4. Kryptenviertel, der Kryptengrund, den Abschnitt mit der geringsten Apoptoserate dar (Abb. 22). Hier fand vor allem Proliferation statt (Abb. 21). In selensupplementierten

tierten Tieren waren jedoch in diesem Abschnitt mehr apoptotische Zellen vorzufinden als in denen beider anderer Diäten (Abb. 22). Auch die Mitoserate war in diesen Tieren leicht vermindert (Abb. 21). Die über pflanzliche Nahrungsmittel hauptsächlich zugeführte Selenverbindung Se-Met wurde auch in diesem Tierversuch dem Futter beige-mischt. Trotz ähnlich effektiver Fähigkeit, die GPx-Aktivität zu steigern, wird Se-Met als ein potenteres chemopräventives Antioxidans als andere Selenverbindungen be-schrieben. Durch Aktivierung von p53-abhängigen DNA-Reparaturmechanismen wirkt es dem Einfluss genotoxischen Stresses generell entgegen [266]. Se-Met vermittelt au-ßerdem p53-abhängig antiproliferative Effekte in Colonkrebszellen, indem es einen Ar-rest in der Zellzyklusphase G₂/M sowie Apoptose induziert [267]. Die Frage, warum in diesem Versuch eine hohe Konzentration an Se-Met im Futter zum Untersuchungszeit-punkt stärker Apoptose in normalem, nichtentartetem Gewebe induzierte, bleibt offen, und sollte geklärt werden. Für therapeutische Zwecke wäre dieser Effekt eher ungüns-tig. Eventuell ist die Eliminierung von unter physiologischen Bedingungen geschädig-ten Zellen in selensupplementierten Tieren jedoch effektiver. Der Einsatz von Se-Met zur Behandlung von humanen colorektalen Karzinomen wäre dann sehr selektiv und gering toxisch. Die Behandlung von mit SW480-Zellen injizierten Nacktmäusen mit Natriumselenit und Se-Met verminderten die Expression von Bcl-xL, erhöhten im Ge-gensatz dazu die Expression von Bax, Bad und Bim, was in einer Aktivierung von Caspase-9 resultierte [268]. Supranutritive Konzentrationen von Natriumselenit induzie-ren Apoptose auch *in vitro*. Im Gegensatz zu Se-Met, einer Selenverbindung die keine Redoxreaktionen durchführt, generierten zytotoxische Konzentrationen von Selenit und Selenocystamin 8-Hydroxydeoxyguanosin-Addukte der DNA und induzierten Apoptose in Keratinozyten infolge einer Bildung von freien Radikalen wie Superoxidanionen [269]. Auch in Prostatakrebszellen konnten Natriumselenit und Methylseleninsäure das Zellwachstum hemmen sowie Apoptose induzieren. Ferner wurden sowohl die Phospho-rylierung von I-κB und die daraus resultierende Freisetzung von NF-κB als auch die DNA-Bindekapazität durch beide Substanzen gehemmt [270]. Jedoch waren entspre-chend genutzte Konzentrationen sehr viel höher als die der vorliegenden Arbeit.

Der Mangel an GPx2 in MCF7 Zellen führte zu einer verminderten Überlebensrate und erhöhte den Anteil der durch H₂O₂-induzierten Apoptose [271]. Dass GPx2 einer spon-

tanen Apoptose entgegen wirken kann, konnte *in vivo* bestätigt werden. GPx2^{-/-} Tiere besaßen im Kryptengrund des Colon generell mehr apoptotische Zellen (Abb. 23). In diesem Abschnitt wird GPx2 vorwiegend exprimiert [154]. Vor allem in selenarmen GPx2^{-/-} Mäusen war die Apoptoserate sehr stark erhöht, in selensupplementierten Mäusen war dieser Effekt nur minimal. Eventuell spielen weitere Selenoproteine dabei eine Rolle. Die erhöhte Expression von GPx1 in GPx2^{-/-} Mäusen [261] kann somit teilweise den antiapoptotischen Effekt von GPx2 kompensieren. GPx1 ist durchaus in der Lage, Hydroperoxid-vermittelte Apoptose zu hemmen. p53 wird durch Hydroperoxide stabilisiert [272]. Im Selenmangel werden durch den Mangel beider GPx Hydroperoxide unzureichend eliminiert und können ihrerseits p53 stabilisieren. Vermutlich erfolgte unter diesen Bedingungen eine Induktion der Apoptose in großem Ausmaß. Diese wurde durch SFN offenbar verstärkt, starke Schwankungen zwischen den Tieren und die geringe Tieranzahl ließen jedoch keine Signifikanz zu (Abb. 23). Der durch SFN verursachte zusätzliche Stress, welcher u.a. durch die Selenoproteine nicht vermindert werden kann, wäre eine Erklärung. Im Selenmangel ist eine verstärkte Translation von GPx1 nicht möglich und eine Beseitigung intrinsisch produzierter Hydroperoxide gedrosselt. In selenadäquaten Mäusen gelingt die Kompensation des Verlustes an GPx2 anscheinend bedingt. In diesem Selenstatus wirkte SFN sogar antiapoptotisch (Abb. 23).

4.5 SFN beeinflusst die DSS-induzierte Entzündung abhängig vom Selenstatus

CED sind eine der häufigsten Ursachen für chronische, nichtinfektiöse intestinale Entzündungen aufgrund einer unkontrollierten Immunreaktion des Organismus gegenüber externen Faktoren. Es existieren zahlreiche Tiermodelle, mit Hilfe derer die Rolle der chronischen Entzündung in der Colonkanzerogenese und zugrunde liegende Mechanismen sowie die Wirkungsweise präventiver Nahrungsinhaltsstoffe untersucht werden können. Durch Kombination von AOM und DSS wird die Entwicklung von colorektalen Tumoren durch eine Entzündung begünstigt [201]. Dabei werden zunächst Mutationen durch eine einmalige Applikation mit dem Kanzerogen AOM gesetzt. Die nachfolgende orale Applikation von DSS induziert eine Colitis infolge einer Zerstörung der intestinalen Barriere, Infiltration von Makrophagen und intensiver Produktion

proinflammatorischer Zytokine. Letztere, wie auch entstandene ROS, aktivieren NF- κ B in intestinalen Epithelzellen [273]. Alle Tiere im Versuch zeigten nach AOM/DSS-Applikation Entzündungssymptome (Abb. 26). Der Grad der DSS-induzierten Entzündung war deutlich abhängig vom Selenstatus. Da GPx1 einen großen Anteil an der GPx-Gesamtaktivität besitzt, resultiert eine reduzierte GPx1-Expression rasch in einer stark verminderten GPx-Aktivität. Dies konnte in allen untersuchten Organen bestätigt werden (Abb. 16). Das Potential zur Eliminierung von ROS ist somit geschwächt. Die Expression von GPx2 war im Selenmangel aufgrund seiner sehr stabilen mRNA weniger beeinflusst. Die Proteinmenge von GPx2 war in den untersuchten Organen selenarmer Tiere im Vergleich zu -adäquaten Tieren nur leicht reduziert (Abb. 17B), dennoch war es nicht in der Lage, den Mangel an GPx1 und dessen antioxidative Funktion vollständig zu ersetzen. Auch die Aktivität von TrxR war im Selenmangel reduziert (Abb. 15). Somit lag im Selenmangel insgesamt eine verminderte Kapazität vor, induziertem oxidativem Stress entgegen zu wirken. Bei adäquater Selenversorgung hingegen ist die Synthese der meisten Selenoproteine unter physiologischen Umständen weitestgehend gewährleistet, ein Anstieg der Aktivitäten von TrxR (Abb. 15) und GPx (Abb. 16) sowie der Proteinmengen von GPx1 und GPx2 (Abb. 17-19) war zu verzeichnen. Des Weiteren waren Entzündungsreaktionen in selenadäquaten Tieren weniger stark und gingen mit deutlich weniger geschädigten und ulzerierten Arealen und verminderter Leukozyteninfiltration einher (Abb. 26). Der Entzündungsgrad korreliert folglich mit dem Vorhandensein von Selen und Selenoproteinen. Es kann postuliert werden, dass dies maßgeblich aus der Menge an GPx1 resultiert. GPx1 hemmt *in vitro* die Aktivität des proinflammatorischen Enzyms COX-2 durch Eliminierung von Hydroperoxiden, welche für die Aktivierung von COX-2 essentiell sind [165], und senkt somit die Produktion von Mediatoren wie PGE₂. Somit vermindert vor allem GPx1 Entzündungsprozesse. Die LPS-stimulierte Aktivierung und nukleäre Translokation von NF- κ B ist im Falle selendefizienter Makrophagen-ähnlicher RAW 264.7 Zellen erhöht und vermittelt dadurch eine Steigerung der Expression von COX-2 sowie resultierender PGE₂-Spiegel [274]. Die Supplementierung selendefizienter Makrophagen mit Se vermindert nicht nur die Genexpression der LPS-induzierten COX-2 und TNF- α durch Hemmung von MAPK, sondern vermindert auch deren Infiltration in die Lunge von Mäusen [275]. Die

Expression von Adhäsionsmolekülen wird durch Hemmung von TNF- α reduziert [276]. In Folge von Selensupplementierung führt eine Verbesserung der zellulären Immunantwort durch eine erhöhte Produktion von IFN γ und IL-10 sowie ein Anstieg an T-Helferzellen zu einer schnelleren Eliminierung von Polioviren [277]. Die Supplementierung mit Se verzeichnet ebenso einen milderen Verlauf akuter Entzündungsreaktionen. So wurde eine Senkung der Mortalität beobachtet, wenn Patienten nach schwerer Sepsis bzw. Schockzuständen über 14 Tage 1.000 μg Natriumselenit verabreicht wurden [278]. Eine niedrige Selenoproteinexpression in transgenen Mäusen mit mutierter tRNA^{(ser)sec} verlangsamt die Immunantwort bei einer Infektion mit Grippeviren, ein gewisser Grenzwert an GPx1-Aktivität ist dennoch in der Lage schlimmere pathologische Veränderungen der Lunge zu verhindern [279]. So stellt der Mangel an Se, vor allem in seiner Auswirkung auf redoxaktive Selenoproteine wie GPx oder TrxR, generell ein höheres Risiko zur Entwicklung von oxidativem Stress dar und kann zu stärkeren Entzündungsreaktionen führen. Da im Selenmangel die ermittelten NQO1-Aktivitäten nicht erhöht waren (Abb. 11), ist eine Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges eher unwahrscheinlich. Eine fehlende Induktion der Expression weiterer Enzyme im Selenmangel, welche in der Lage gewesen wären, Entzündungsreaktionen vorzubeugen bzw. diese in ihrer Ausprägung zu vermindern, kann also vermutet werden. Dies geht auch mit einem höheren Grad der Entzündung einher (Abb. 26). Obwohl Se im Allgemeinen positive immunregulatorische Eigenschaften besitzt und die Immunabwehr zu steigern vermag, kann eine Supplementierung in hohen Konzentrationen auch zu adversen Effekten führen und prooxidativ wirken. Die Supplementierung mit Se bewirkte indessen im vorliegenden Tierversuch insgesamt einen geringeren Grad an Entzündung. Obgleich die eingesetzte Menge an Se im selensupplementierten Futter dem 4-fachen der empfohlenen Konzentration entsprach, wirkte sie in keinsten Weise nachteilig auf die Morphologie des Colon und hatte keinerlei zytotoxische Wirkung.

Die Behandlung mit SFN beeinflusste den Grad der Entzündung mehr oder weniger stark (Abb. 26). Vor allem im Selenmangel, wo Entzündungssymptome besonders stark ausgeprägt waren, ging die Behandlung mit SFN in beiden Genotypen mit einer Verschlimmerung des Entzündungsstatus einher. Im Gegensatz dazu verminderte SFN in selenadäquaten Tieren die Ausprägung der Entzündung in beiden Genotypen. In selen-

supplementierten Tieren hingegen wirkte SFN nicht eindeutig pro- oder antiinflammatorisch, eventuell waren SFN-Effekte durch die Auswirkung der relativ hohen Selenkonzentration nicht erkennbar. Die Wirkung von SFN ist offensichtlich abhängig vom Selenstatus der Tiere bzw. vom Vorhandensein bestimmter Selenoproteine. Es wird postuliert, dass die Eigenschaft von SFN, antiinflammatorisch zu wirken, aus der Hemmung proinflammatorischer Enzyme wie iNOS, COX-2 und der verminderten Expression von inflammatorischen Prostaglandinen sowie Zytokinen resultiert. Dabei unterdrückt SFN die Bindungsfähigkeit von NF- κ B an die DNA und die Transaktivierung entsprechender Zielgene durch GSH-Depletion und führt somit zur redoxabhängigen Veränderung intrazellulärer, für die Aktivierung von NF- κ B essentieller Thiolgruppen [31]. Die Phosphorylierung von IKK α und IKK β wird außerdem durch SFN gehemmt und folglich die Aktivierung von NF- κ B unterdrückt [280]. Durch die verminderte Produktion von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen werden weniger Neutrophile und T-Lymphozyten aus der Peripherie zum Entzündungsherd rekrutiert, was möglicherweise dazu führt, dass das Ausmaß der Entzündungsreaktion in der akuten Phase geringer ist. Außerdem wird durch SFN die LPS-induzierte COX-2-Expression unterdrückt, indem neben NF- κ B auch C/EBP, CREB und AP-1, für die transkriptionelle Regulation von COX-2 wichtige Faktoren, beeinflusst werden [37]. Der Einfluss von SFN auf NF- κ B wird zudem über die Aktivierung von Nrf2 vermittelt. Durch eine verminderte Zytokinvermittelte Produktion von H₂O₂, einer allgemeinen Reduktion des oxidativen Stresses, werden NF- κ B-abhängige Signalwege gehemmt. So verläuft die DSS-induzierte Colitis in Nrf2^{-/-} Mäusen mit stärkerer Ausprägung als in Nrf2^{+/+} Tieren. Begleitet von einer stärkeren Induktion von IL-1, IL-6, TNF α , sowie der Enzyme iNOS und COX-2 ist die Expression von Phase II Enzymen in diesen Tieren deutlich verringert [281]. Die SFN-vermittelte Aktivierung von Nrf2 unterbindet also vor allem in der frühen Phase der Entzündung die Entstehung schwerwiegender Gewebeschäden, indem die Produktion proinflammatorischer Mediatoren und die Expression der verantwortlichen Enzyme gehemmt werden. SFN vermittelt ferner die Induktion von HBD-2, einem antibakteriellen Defensin zum Schutz der intestinalen Mukosa [282].

Dass SFN im Selenmangel proinflammatorisch wirkte (Abb. 26), lag eventuell am ohnehin schon höheren Niveau oxidativen Stresses in diesen Tieren. Obwohl die Akkumu-

lation von SFN in Zellen grundsätzlich positiv angesehen wird, kann die Konjugationsreaktion mit GSH auch ein Risiko für ein prooxidatives Verhalten darstellen. Es kommt zu einer raschen intrazellulären GSH-Depletion, ein Prozess der durch die SFN-vermittelte Induktion von GST noch erhöht werden kann. ITC's können ferner zur Steigerung des oxidativen Stresses führen, indem sie intrazellulär die Konzentration von ROS erhöhen. Für zahlreiche biologische Funktionen und Reaktionen sind diese Moleküle essentielle Bestandteile von Signalkaskaden, Wachstumsprozessen und Infektionsabwehr. Sie stimulieren die Zytokinproduktion und regulieren die Elimination von Fremdstoffen oder Pathogenen. Ein veränderter zellulärer Redoxstatus und eine erhöhte Bildung von ROS durch die Behandlung mit SFN, können, vor allem im vorangeschrittenen Krebsstadium, als positiv angesehen werden. Protektive Abwehrmechanismen, wie Enzymaktivitäten oder Apoptose werden induziert. In gesundem Gewebe ist dies nicht zwangsläufig der Fall, da Signalwege aus dem Gleichgewicht geraten können.

Prooxidative Effekte von SFN scheinen eher kurzfristiger Natur, da durch eine längere Behandlung induzierte detoxifizierende Enzyme, zumeist Nrf2-Zielgene, in der Regel die Menge an gebildeten ROS reduzieren. Entgegen dieser Vermutung war die Menge an gebildeten ROS nach einer Behandlung von Rattenhepatocyten mit 20 μ M SFN über 24 h doppelt so hoch wie die der Kontrolle und deutet auf längere Effekte hin [18]. Besonders Allyl-ITCs unterlaufen Redoxreaktionen die zur Bildung von Superoxidanionen führen, welche durch 8-oxodG und DNA-Schäden an der Initiation der Kanzerogenese beteiligt sein können [283]. Des Weiteren werden ITC's mit der Entstehung oxidativen Stresses in Folge von mitochondrialen Schäden in Verbindung gebracht. Der Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials, der durch die Behandlung von HL60 und UM-UN-3 Zellen mit Benzyl- (BITC) oder Phenethyl-ITC's (PEITC) bereits in physiologischen Konzentrationen verursacht wird, kann im Gegensatz dazu mit SFN erst in sehr viel höheren Konzentrationen hervorgerufen werden [262, 284]. Auch Cytochrom P-450 Enzyme können ROS generieren. Der Einfluss auf Phase I Enzyme wird viel diskutiert, da unterschiedliche Befunde existieren, wonach SFN sowie dessen Vorstufe zum einen aktivierend, zum anderen hemmend wirken. Die Behandlung von Sprague-Dawley-Ratten mit GRA in Konzentrationen, die einer Menge von 50-100 mg/kg Körpergewicht bzw. 40-80 μ mol SFN/Tier entsprachen, führte zur Aktivitätssteigerung ver-

schiedener CYP-Isoformen sowie zur Bildung von ROS in der Lunge [285] und Leber [184]. Auch die Behandlung von Wistar Albino Ratten mit 15 mg/kg SFN induzierte die Expression von CYP1A1, 1A2 und 1B1 in Lunge und Leber ohne die Enzymaktivität zu beeinflussen [286]. Die Induktion inaktiver Apoproteinformen ist denkbar. Zudem senkt SFN vielmehr die katalytische Aktivität verschiedener Isozyme, wie CYP1A1, 1A2, 2B1/2, 2E1 und 3A4 durch kompetitive Hemmung in Mikrosomen von Maus und Ratte [16, 287, 288] und vermindert somit die metabolische Aktivierung von Fremdstoffen.

Die Behandlung von SFN in Kombination mit einem Zustand der Selenarmut bringt also ein höheres prooxidatives Potential mit sich. Hydroperoxide können durch den reduzierten Gehalt an Selenoproteinen weniger gut eliminiert werden. Die Bildung von ROS wird durch SFN verstärkt. Eine Stress-induzierte Steigerung endogener Konzentrationen von Nrf2 [289] blieb aus, da es zu keiner erhöhten Expression von Nrf2-Zielgenen in entzündeten Tieren kam.

Verstärkt wurden die Entzündungsreaktionen nach AOM/DSS im GPx2^{-/-} in allen 3 Selenidäten (Abb. 26). Im Selenmangel wurde das Ausmaß der Entzündung in GPx2^{-/-} Tieren durch SFN noch verschlimmert. Insgesamt waren diese Tiere am stärksten betroffen (Abb. 26). Unter Umständen ist SFN unter den Bedingungen des sehr hohen Niveaus an oxidativem Stress stark elektrophil. Es kann vermutet werden, dass mindestens eines der Selenoproteine der proinflammatorischen Wirkung von SFN entgegenwirkt. Wahrscheinlich spielt GPx1 hierbei eine wesentliche Rolle.

4.6 SFN blockiert die Initiation der Colonkanzerogenese in Abhängigkeit von Se

ACF sind mikroskopisch erkennbare präneoplastische Läsionen der Colonmukosa und gelten als Vorstufe von Adenomen. Sie können durch verschiedene Kanzerogene induziert werden. Die Analyse ihrer Anzahl und ihrer Größe wird zur Identifizierung von antikanzergen Substanzen genutzt. Abhängig von seiner chemischen Form beeinflusste Se beispielsweise die Anzahl von ACF, durch einmalige Applikation des aromatischen Amins DMABP induziert, in Ratten. Dabei reduzierten 0,1 und 2 mg/kg Futter Selenit wie auch Selenat die Häufigkeit signifikant, wohingegen Se-Met in gleichen

Konzentrationen keinen Unterschied bewirkte [232]. Se-Met wird, nach Umwandlung zu Selenid [290], zur Inkorporation in Selenoproteine genutzt, kann jedoch auch anstelle von Methionin für die Proteinbiosynthese genutzt werden und stünde somit der Synthese von Selenoproteinen nicht zur Verfügung. Die verabreichte Selenquelle spielt demnach eine ganz wesentliche Rolle und könnte eine Erklärung für unterschiedliche Effekte sein. Die Bildung AOM-induzierter ACF in F344 Ratten konnte mit Hilfe verschiedener Selenkomponenten gehemmt werden [291]. Jedoch wurden diese in supranutritiven Konzentrationen eingesetzt, sehr viel höher, als für Nager empfohlen [216]. Für Diphenylmethylselenocyanat, einer Selenverbindung mit sehr geringer Toxizität und bereits beschriebener antiproliferativer und proapoptotischer Wirkung, wurde eine Hemmung AOM-induzierter ACF-Bildung in Ratten ebenso bestätigt [292]. Daher wurde vermutet, dass auch im untersuchten AOM/DSS-Modell in B6 Mäusen mit den 3 verschiedenen Selendiäten ein Unterschied in der Ausbildung von ACF besteht. Entgegen o.g. Resultate beeinflusste der Selenstatus weder die Inzidenz noch die Anzahl oder Größe der durch AOM-Applikation induzierten ACF pro Tier (Tab. 10). Der Einfluss von Selenmangel bzw. -supplementierung auf die durch AOM gesetzten Mutationen, welche im Endeffekt zur Entartung der Zelle, einem erworbenen Wachstumsvorteil sowie zur Hyperplasie führen können, kann in dem untersuchten Krebsmodell nicht beurteilt werden. Die Behandlung mit DSS induzierte Entzündungsreaktionen, welche besonders im Selenmangel zu großflächigem Mukosaverlust und Vernarbung führten. Daher waren zunächst entstandene ACF eventuell nicht mehr erfassbar. Um einen Einfluss von Se auf die Mutationsrate zu untersuchen, wäre ein reines Kanzerogenesmodell günstiger. Mit Hilfe der 6-maligen Applikation von AOM könnten aufschlussreichere Aussagen über die Wirkung von Se auf die Mutationsrate, die ACF-Inzidenz sowie deren Weiterentwicklung zu Tumoren getroffen werden.

Auch SFN hatte in diesem Modell keinen Effekt auf die ACF-Bildung (Tab. 10). In Ratten reduzierte jedoch die mehrmalige Gabe von sowohl SFN als auch PEITC die Bildung von AOM-induzierten ACF signifikant. Diese antikanzerogene Wirkung beider ITC's wurde nicht nur für die Phase der Initiation beobachtet, sondern auch bei Gabe nach AOM-Applikation [42]. In der Post-Initiationsphase wurden dabei nach AOM-Applikation dreimal pro Woche über 8 Wochen 5 µmol SFN per Schlundsonde verab-

reicht. In der Initiationsphase wurden 3 Tage vor AOM-Applikation je 20 μmol SFN appliziert. Somit waren die SFN-Mengen geringer als die in diesem Versuch 2-täglich über 3 bzw. 4 Wochen eingesetzte Konzentration von 10 μmol je Tier.

Aufgrund der hohen Inzidenz von ACF in allen Gruppen war eine Korrelation zur Tumoranzahl ungeeignet. Ein Unterschied in der Entwicklung von Tumoren aus den prä-neoplastischen Läsionen mag dennoch bestehen. Wider Erwarten blieb ein Effekt des Selenmangels auf die Tumoranzahl aus. Der Mangel an Selen und Selenoproteinen resultierte unter vorliegenden Umständen also nicht in einer gesteigerten Proliferation von bereits bestehenden Neubildungen. Im Gegensatz dazu besaßen selensupplementierte Mäuse trotz gleicher Tumorinzidenz (Tab. 11) weniger Tumore (Abb. 28). Ein antiproliferativer Effekt durch die Supplementierung von Se wäre ebenso möglich wie eine Erhöhung der Apoptoserate. Entweder wird grundsätzlich die Hyperproliferation der entarteten Zellen und somit die Entwicklung eines Tumors unterdrückt oder sie verläuft mit einer geringeren Geschwindigkeit. Ein Arrest in verschiedenen Zellzyklusphasen durch Se wäre denkbar. Der Einfluss verschiedener Selenkomponenten auf die Hemmung der Zellproliferation durch Zellzyklusarrest *in vitro* ist bekannt [85]. Des Weiteren könnte eine selektivere Eliminierung entarteter Zellen oder Zellhaufen durch Induktion von Apoptose vermutet werden. Genau dies war im 4. Kryptenviertel im Colon nicht-behandelter Tiere zu beobachten (Abb. 22). Se in supranutritiven Konzentrationen kann auch prooxidativ wirken [293] und wird aus diesem Grund bereits in der Krebstherapie eingesetzt.

Es ist bisher wenig bekannt, in welche Phase der Kanzerogenese SFN effektiver eingreift und ob es in der Lage ist, im Colon ein präventives Potential zu entwickeln. Unter diesem Aspekt erfolgte der Beginn der SFN-Behandlung zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Prventionsphase stärker beleuchtend, erhielten einige Gruppen SFN schon eine Woche vor AOM-Applikation. Die Initiationsphase betreffend, begann die SFN-Behandlung weiterer Gruppen gleichzeitig mit der AOM-Applikation. Die SFN-Gabe, in der Prventionsphase beginnend, veränderte weder die Inzidenz noch die Anzahl an Tumoren je Tier (Abb. 28). In keiner der 3 Selendiäten waren durch die 4-wöchige Behandlung mit SFN Unterschiede zu beobachten. Aufgrund großer Schwan-

kungen innerhalb der Gruppen ergaben sich auch keinerlei Tendenzen für einen positiven oder negativen Effekt. Durch eine höhere Anzahl an Tieren pro Gruppe wären unter Umständen eindeutiger Aussagen möglich. Wahrscheinlich sind präventive Effekte von SFN im Sinne der Induktion von NQO1, TrxR, GST und GPx2 nicht ausreichend, um die Inzidenz bzw. Anzahl AOM-induzierter Tumore zu reduzieren. Auch waren die im Colon ermittelten SFN-Effekte auf die Enzymaktivitäten (Abb. 12, 15, 20) und -proteinexpressionen (Abb. 13, 14, 17B, 19) nicht so stark, wie erwartet. Eventuell wären bei stärkeren SFN-vermittelten Enzyminduktionen und folglich höherem präventivem Potential eine Reduktion des Tumorwachstums zu erwarten. Im Gegensatz dazu war ein deutlich verringertes Tumorwachstum bei gleichzeitigem Beginn der SFN-Behandlung mit AOM-Applikation in den selenadäquaten Gruppen beider Genotypen zu beobachten. Bereits reduzierende Effekte auf die Tumorzinzidenz der GPx2^{+/+} Tiere von allen 3 Selendiäten bewirkend, verringerte die 3-wöchige Behandlung mit SFN die Tumorzanzahl pro Tier in sowohl selenadäquaten GPx2^{+/+} als auch GPx2^{-/-} Mäusen. Dies deutet auf eine das Kanzerogen blockierende Wirkung durch SFN hin und bestätigt Befunde von Barcelo *et al.* [287]. Demnach ist SFN in der Lage, das Phase I Enzym CYP2E1 zu hemmen und die aus dessen Aktivität resultierende Genotoxizität von AOM zu unterbinden.

AOM verursacht Punktmutationen in den Genen K-ras und β -Catenin, wobei aus O⁶-Methyldeoxyguanin-Addukten [202] eine Transversion von G:C zu A:T resultiert [204]. Die Bildung dieses Adduktes stellt den initialen Schritt des multifaktoriellen Kanzerogeneseprozesses dar, und erfolgt lediglich durch methylierende Eigenschaften. Die Präsenz dieser veränderten Base in der DNA führt bei Replikation unumgänglich zur Mutation der Tochterzellen mit malignem Potential. Für diese Reaktion muss AOM jedoch zunächst metabolisch zu einer reaktiven Spezies aktiviert werden, die in der Lage ist, DNA an bestimmten Stellen zu alkylieren. Dies geschieht durch Hydroxylierung von AOM zu Methylazoxymethanol (MAM) in der Leber und wird durch CYP2E1 katalysiert [203]. MAM wiederum zerfällt nicht-enzymatisch in der Leber und im Colon zum Methylazonium Ion. Aus diesem entsteht letztendlich das Kanzerogen Methylcarbonium Ion [202, 294]. Die hoch reaktive und elektrophile Spezies methyliert in Folge zelluläre Nukleophile, wie die DNA. Zahlreiche Schutzmechanismen des Körpers sind in der

Lage, die Einwirkung von Kanzerogenen zu verhindern. Der Fremdstoffmetabolismus stellt eine wichtige Grundlage zur Verhinderung oder Eliminierung körperfremder, schädigender Stoffe dar.

SFN wirkt also in der Initiationsphase und könnte durch Hemmung der CYP2E1-Aktivität eine Aktivierung von AOM vermindern. Da die Applikation von AOM und SFN zeitgleich erfolgte, wären eine kompetitive Hemmung der CYP2E1-Enzymaktivität und die daraus resultierende verminderte Kanzerogenität von AOM sehr wahrscheinlich. Der Zeitpunkt der Behandlung mit SFN in Bezug zur Applikation von AOM ist dabei sehr entscheidend für die Metabolisierung des Prokanzerogens [295]. Die bereits erwähnte mögliche Anpassung des Organismus an SFN wäre eine Erklärung dafür, dass SFN, bereits 1 Woche vor AOM-Applikation verabreicht, dessen Aktivierung nicht hemmt. Dass im Selenmangel ein hemmender Effekt von SFN auf die Initiation ausblieb, lag eventuell am bereits bestehenden höheren Niveau an oxidativem Stress. Neben einer stärkeren Produktion bzw. verringerten Eliminierung von ROS liegt im Selenmangel eine gesteigerte Aktivierung von NF- κ B vor. Im Gegensatz zu vielen anderen CYP-Isoenzymen wird durch die Bindung von NF- κ B an die entsprechende Promotorregion die Transkription von CYP2E1 eventuell positiv reguliert und somit aktiviert [296]. Der durch Selensupplementierung bereits stark reduzierende Effekt auf die Tumorzahl lässt keinen weiteren antikanzerogenen bzw. die Initiation blockierenden Effekt von SFN erkennen (Abb. 28).

Eine Untersuchung der spezifischen CYP2E1-Aktivität im Gewebe erfolgte nicht. Die Bestimmung der CYP-Aktivität in Organlysaten nach Einlagerung in flüssigem Stickstoff war nicht mehr möglich [297]. Eine Isolierung von Lebermikrosomen wäre günstig gewesen, denn für die Bestimmung der spezifischen CYP-Aktivität ist die Nutzung der mikrosomalen Fraktion zu empfehlen. Des Weiteren könnte die Analyse der O⁶MeG Addukte in betreffenden Organlysaten Aufschluss über die nach Metabolisierung von AOM erfolgte Schädigung geben. Ist die Adduktrate durch gleichzeitige Behandlung mit SFN verändert, würde dies den CYP2E1-hemmenden Effekt bestätigen. Diese Untersuchung muss jedoch kurz nach Initiation der Kanzerogenese geschehen, erfordert also eine Tötung wenige Stunden nach AOM-Applikation.

Verschiedene antikanzerogene Substanzen, wie Disulfiram, verändern den Metabolismus von AOM und hemmen somit dessen Kanzerogenität [298, 299]. Auch die chemopräventive Schwefelverbindung Oltipraz wirkt über diesen Mechanismus [300]. Dabei wird postuliert, dass, neben der Beseitigung der reaktiven Metaboliten, vor allem die Hydroxylierungsreaktion reguliert wird, indem für die Aktivierung der Prokanzerogene verantwortliche Enzymsysteme in ihrer Expression oder Aktivität verändert werden [301]. Chemopräventive Effekte weiterer Substanzen mit ähnlichen Mechanismen sind bekannt. Auch Aurapten aus der Zitruschale verändert die Auswirkung von AOM durch Modulierung dessen Metabolismus und verhindert somit die Bildung von ACF in Ratten [302]. Eine Applikation von glucosinolatreichem Saft aus Rosenkohl hemmte ebenfalls die Initiation der Colonkanzerogenese durch 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolin (IQ). Bei gleichzeitiger Administration mit dem kanzerogenen heterozyklischen Amin waren weniger präneoplastische Läsionen im Colon und in der Leber der Ratten vorzufinden [303]. Eine Verhinderung der Aktivierung verschiedener Prokanzerogene, wie des tabakspezifischen NNK, durch das ebenfalls als sehr wirksam beschriebene PEITC wurde in Ratten untersucht. Nicht nur die Entstehung von Lungentumoren wurde durch eine Hemmung verschiedener CYP-Isoenzyme unterbunden, es wird auch postuliert, dass aufgrund dessen die Entstehung von N-Nitrosodiethylamin-induzierten Lebertumoren in Mäusen oder N-Nitrosobenzylmethylamin-induzierten Ösophagustumoren in Ratten verhindert werden [304]. Ein antiproliferativer Effekt von SFN wäre ebenfalls denkbar. SFN ist in der Lage, einen Arrest in verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu vermitteln. Obwohl in Prostata- und Colonkrebszellen durch Senkung von CyclinB1, Cdc25B und Cdc25C vor allem ein Arrest in G₂/M induziert wird [20, 27], ist auch ein SFN-vermittelter Arrest in der G₁ Phase durch Induktion des Tumorsuppressors und Zellzyklusinhibitors p21 sowie Senkung der Proteine Cyclin D1, Cyclin A und c-myc zu beobachten [26]. Auch eine Hemmung von HDAC vermittelt das antiproliferative Potential von SFN und geht mit Induktion eines G₂/M Arrestes einher [39, 305, 306]. Der bei 4-wöchiger Behandlung ausbleibende Effekt von SFN auf die Tumoranzahl (Abb. 28) lässt jedoch eine solche Schlussfolgerung nicht zu. Zudem war die Mitoserate in den Kryptenzellen des Colon nicht-behandelter Tiere durch SFN unbeeinflusst (Abb. 21).

Dies indiziert keine durch SFN-vermittelte Veränderung proliferativer Signalkaskaden im vorliegenden Colonkrebsmodell.

Tendenziell zeigten GPx2^{-/-} Mäuse aller 3 Selendiäten mehr Tumore als GPx^{+/+} Mäuse (Abb. 28) und bestätigen somit die Vermutung, dass GPx2 eine Rolle in der Colonkanzerogenese spielt. Hingegen war die Auswirkung weit schwächer als erwartet. Die Defizienz eines Enzyms ist möglicherweise nicht genug, um schwerwiegende Veränderungen in der Tumorentwicklung zu induzieren. Es könnte vermutet werden, dass aufgrund der gesteigerten Apoptoserate in GPx^{-/-} Mäusen (Abb. 23) eine größere Anzahl durch AOM geschädigter Zellen aussortiert wurde und sich weniger Mutationen manifestieren konnten. GPx2 besitzt nicht nur im Hinblick auf die Stadien der Kanzerogenese verschiedene Funktionen [168]. Der Effekt der SFN-Behandlung auf die Tumoranzahl in GPx^{-/-} Mäusen war mit dem in GPx^{+/+} Mäusen vergleichbar (Abb. 28).

Chemopräventive Substanzen können zum einen die Initiation der Kanzerogenese blockieren oder die Weiterentwicklung der Entartung zum Adenom oder Karzinom unterbinden. Eine verminderte Exposition der Zellen mit den kanzerogenen Substanzen, entweder durch Hemmung der Aktivierung von Prokanzerogenen oder durch Steigerung der Detoxifizierung und Eliminierung, verhindert die Initiation. Die Interaktion antikanzerogener Substanzen mit verschiedenen Signalwegen kann dazu führen, dass eine Unterdrückung der weiteren Promotion oder Progression der Kanzerogenese erfolgt. Dabei können Prozesse des oxidativen Stresses, Entzündungsreaktionen oder zelluläres Wachstum beeinflusst bzw. apoptotische Vorgänge eingeleitet werden. SFN interagiert mit sowohl proliferativen, inflammatorischen als auch apoptotischen Signalwegen und wirkt in verschiedenen Phasen des Zellzykluses. Auch sind zahlreiche antikanzerogene Effekte von SFN bekannt. So entwickelten mit 5-10 µmol/Tag SFN gefütterte Apc^{min/+} Mäuse weniger und kleinere Dünndarmpolypen, aufgrund einer Steigerung der Apoptose- und Senkung der Proliferationsrate [47]. Diese Effekte liegen auch zugrunde bei der durch SFN gehemmten Progression von, durch die Tabakkarzinogene B(a)P und NNK-induzierten Lungenadenomen zu malignen Karzinomen in A/J Mäusen. Eine Aktivierung von AP-1 und Induktion der Apoptose im Lungengewebe durch SFN hemmte zunächst die Bildung der Lungenadenome. Reduzierte *proliferating cell nuclear antigen*

(PCNA)-Spiegel und Induktion von Apoptose, via Caspase-3 sowie TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling*) detektiert, blockierten die weitere Entwicklung zu malignen Lungenadenokarzinomen [44]. Eine 5-tägige Gabe von SFN retardierte die Entstehung von DMBA-induzierten Mammakarzinomen und führte zu einer Senkung der Inzidenz, des Wachstums und der Multiplizität auftretender Tumore - Effekte, die nicht nur aus der Induktion von Phase II Enzymen resultieren können [43]. Jeweils zugrunde liegende molekulare Mechanismen werden vielseitig untersucht, sind jedoch schwerer voneinander abgrenzbar, und werden diskutiert.

Eine protektive Rolle des Nrf2/ARE-Signalweges im Verlauf von Entzündung und Krebsentstehung im Colon verdeutlicht die signifikant erhöhte AOM/DSS-induzierte Tumorzinzidenz im Colon von Nrf2^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Nrf2^{+/+} Mäusen. Aufgrund einer ausbleibenden Induktion von Phase II Enzymen und einer stärkeren proinflammatorischen Antwort besaßen 80% der Nrf2^{-/-} Mäuse Adenokarzinome, im Vergleich zu einer Häufigkeit von 29% im Nrf2^{+/+} [307]. Im Allgemeinen aktiviert SFN diese Nrf2-vermittelten antitumorigenen Effekte. Eine Behandlung mit SFN oder Dibenzoylmethan (DBM) bzw. deren Kombination hemmten signifikant die Entwicklung von intestinalen Adenomen in Apc^{Min/+} Mäusen, was aus einer geringeren Aktivität von COX-2, niedrigeren PGE₂ sowie LTB₄-Spiegeln und einer verstärkten Apoptoserate resultierte [308]. Im DMBA-TPA-induzierten Hautkrebsmodell war in Nrf2^{-/-} Mäusen eine höhere Tumorzinzidenz zu beobachten, eine Vorbehandlung mit SFN über 2 Wochen hemmte die Krebsentstehung in Nrf2^{+/+} Mäusen signifikant, nicht aber in Nrf2^{-/-} Mäusen [46].

Das Vorhandensein zahlreicher Mutationen in mehr als einem der folgenden 4 Signalwege würde mit einer Entdifferenzierung vom colorektalen Adenom zum invasiven Karzinom einhergehen: dem K-ras-Weg, der Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade, dem p53- und dem TGF β -Weg [309]. Da keine malignen Tumore auftraten, kann vermutet werden, dass der Untersuchungszeitpunkt zu früh war und somit die Progression zum Karzinom noch nicht stattfand. Es wäre jedoch auch möglich, dass die einmalig durch AOM gesetzten Mutationen nicht ausreichend waren. Durch eine mehrmals wiederholte AOM-Applikation könnte eine Akkumulation von Mutationen erreicht und die Ausbildung von Karzinomen verursacht werden. Die häufigsten Mutationen bewirkt eine Ap-

plikation mit AOM im Onkogen K-ras sowie β -Catenin. Der PI3K/Akt-Signalweg und die MAPK-Kaskade, resultierend aus der konstitutiven Aktivierung von Ras, sind aktiviert und führen, genauso wie durch Akkumulation von β -Catenin im Zellkern vermittelt, zu erhöhter Zellproliferation. Das Tumorsuppressorprotein p53, in humanem Colonkrebs sehr häufig betroffen, ist in AOM-behandelten Ratten nicht mutiert [206]. Das proapoptotische Protein TGF β ist hingegen gehemmt.

Der Einfluss von SFN auf die Colonkanzerogenese war im vorliegenden Tierversuch eher dualen Charakters. Tumorinzidenz und -größe wurden durch SFN nicht beeinflusst. Hingegen waren in selenadäquat gefütterten Mäusen beiden Genotyps weniger Tumore pro Tier zu verzeichnen, wenn SFN gleichzeitig mit AOM verabreicht wurde. Eine ausreichende Verfügbarkeit über Se scheint für die SFN-vermittelte Blockade der Tumori-
initiation essentiell. Eine mögliche Verhinderung der Entwicklung von ACF zu Tumoren durch SFN kann im verwendeten AOM/DSS-Modell nicht eindeutig beurteilt werden. Hingegen ist ein Einfluss von SFN auf die Initiation zu vermuten. Eine größere Anzahl an Tieren könnte die starke Streuung innerhalb der Gruppen verhindern und signifikante Effekte mit sich bringen.

4.7 Ausblick

Die Verabreichung der Reinsubstanzen SFN und Se-Met spiegelt deren Vorhandensein in der komplexen Pflanzenmatrix des Lebensmittels Brokkoli nur bedingt wieder und lässt eine Schlussfolgerung auf die Situation beim Konsum des *Brassica* Gemüses nicht direkt zu. Die Untersuchung des AOM/DSS-induzierten Tumormodells unter Nutzung des entsprechenden Pflanzenmaterials bzw. der -extrakte wäre indiziert. Metabolische Aspekte sollten stärker einbezogen werden. Eine gezielte Erforschung zeitraum- und zeitpunktabhängiger Effekte von SFN wäre von Nutzen, dies sollte ebenfalls in Verbindung mit verschiedenen Selenstatus erfolgen. Unterschiedliche Ergebnisse können zum Einen aufgrund der tageszeitlich unterschiedlichen Stoffwechselfähigkeit resultieren. Zum Anderen ist der Bezug zur Applikation des tumorinitiierenden Kanzerogens herauszustellen und zu analysieren. Wechselwirkungen mit weiteren, für Brokkoli typischen bioaktiven Inhaltsstoffen bilden ebenso Untersuchungspotential. Auch eventuell

modulierende Effekte von SFN und Se bzw. von Brokkoliextrakten auf die übrigen Phasen der Colonkanzerogenese sollten aufgeklärt werden. Hierfür könnte das reine AOM-Modell mit 6-maliger Applikation genutzt werden. Für die Untersuchung von Kombinationseffekten von SFN und Se bzw. anderen bioaktiven Substanzen während der 3 Phasen der Kanzerogenese ist dieses günstiger. Auswirkungen und zugrunde liegende Mechanismen könnten des Weiteren über humane Interventionsstudien mit einer Brokkoli-reichen Ernährung aufgedeckt werden.

5 Zusammenfassung

Das ITC SFN und der Mikronährstoff Se sind bekannt als chemopräventive Inhaltsstoffe von Gemüse der *Brassica*-Familie, welcher auch Brokkoli angehört. Die Wirkungen von sowohl SFN als auch Se beruhen auf zahlreichen verschiedenen Mechanismen. Es existieren jedoch Schnittstellen, an welchen Interaktionen beider Substanzen möglich sind. Basierend auf diesem Wissen wurden in dieser Arbeit Wechselwirkungen zwischen SFN und Se auf die Aktivität sowie Expression von Phase II Enzymen und Selenoproteinen untersucht. Der Einfluss der Kombination von SFN und Se auf die unter physiologischen Bedingungen stattfindende Proliferation und Apoptose war ebenso Gegenstand der Arbeit wie die Modulation von Entzündungsprozessen sowie der Tumorentstehung während der entzündungsverstärkten Colonkanzerogenese im Mausmodell. Das hinsichtlich seiner Wirksamkeit mit aus GRA hydrolysiertem SFN zunächst als vergleichbar befundene synthetische SFN wurde für die Untersuchung im AOM/DSS-induzierten Colontumormodell gewählt und in Kombination mit 3 verschiedenen Selendiäten verabreicht.

Der Einfluss von SFN und Se auf Phase II Enzyme und Selenoproteine entlang des GIT war organabhängig und nach 4 Wochen geringer als nach 7 Tagen. Die schwächere Induktion deutet auf eine Anpassung des Organismus hin. Ein SFN-vermittelter Effekt auf NQO1 war im Selenmangel am deutlichsten. Die Aktivität des Selenoproteins TrxR wurde hingegen erst bei ausreichender Selenversorgung durch SFN beeinflusst. Die als Nrf2-Zielgen bekannte und in der Hierarchie der Selenoproteine einen hohen Rang einnehmende GPx2 konnte in bestimmten Organen bereits unter selenarmen Bedingungen durch SFN induziert werden. Eine Überexpression des Enzyms war jedoch nicht möglich. SFN steigerte, unabhängig vom Selenstatus, im oberen Abschnitt des GIT und im Colon die Aktivität der GST. Eine Induktion des eigenen Metabolismus wäre somit denkbar. Im Falle eines Mangels an GPx2 wurde GPx1 bei hinreichender Selenversorgung stärker exprimiert, allerdings konnte sie die Funktion von GPx2 nicht völlig ersetzen. Im Selenmangel kann die Aktivitätssteigerung der TrxR im Dünndarm, dem Abschnitt der Selenabsorption, als ein Versuch der GPx2-Kompensation angesehen

werden. SFN war nicht in der Lage, über eine Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges kompensatorische Effekte zu induzieren.

Apoptotische Prozesse wurden unter physiologischen Bedingungen nur marginal durch SFN und Se moduliert. Das elektrophile ITC konnte lediglich im Selenmangel Apoptose im luminalen Bereich der Colontypen induzieren. Die durch supranutritive Selenkonzentration induzierte Apoptose im Kryptengrund wurde nicht durch SFN beeinflusst. Einer bei Abwesenheit der GPx2 erhöhten Apoptoserate im Kryptengrund wirkte SFN bei adäquater Selenversorgung entgegen, war indessen proapoptotisch unter selendefizienten Konditionen.

Der Einfluss von SFN auf die Entzündung war deutlich abhängig vom Selenstatus. Während SFN im Selenmangel anscheinend prooxidative Prozesse induzierte und die Entzündungssymptome verschlimmerte, wirkte es unter adäquatem Selenstatus antiinflammatorisch. Den vergleichsweise milden Grad der Entzündung im selensupplementierten Status konnte SFN nicht zusätzlich beeinflussen. SFN veränderte die Inzidenz colorektaler Tumore nicht. Ein, die Tumorentstehung blockierender SFN-Effekt durch direkte Hemmung der metabolischen Aktivierung des Prokanzerogens im selenausreichenden Zustand scheint offensichtlich. Eine Überversorgung mit Se kann protektiv im Hinblick auf Entzündung oder Colonkanzerogenese sein, jedoch bewirkt SFN keinen zusätzlichen Schutz.

Kombinationseffekte von SFN und Se in Bezug auf Phase II Enzyme, Selenoproteine und Apoptose sowie die entzündungsverstärkte Colonkanzerogenese sind nicht eindeutiger Natur und können, abhängig vom Endpunkt, synergistische oder antagonistische Züge aufweisen. Eine bei Selendefizienz deutlichere Wirkung von SFN kann mit Hilfe der gesteigerten Aktivierung von Nrf2 erklärt werden, dies muss jedoch nicht von Vorteil sein. Bei adäquater Selenversorgung kann SFN kurzfristig antiinflammatorische und antikanzerogene Prozesse induzieren. Von einer längerfristigen ständigen SFN-Aufnahme in Form von GRA-reichen *Brassicaceae* ist jedoch abzuraten, da von einer Adaptation auszugehen ist. Die Wirkung von SFN innerhalb der komplexen Pflanzenmatrix bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

6 Literaturverzeichnis

1. Block, G., Patterson, B. and Subar, A., *Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence*. Nutr Cancer, 1992. **18**(1): p. 1-29.
2. Verhoeven, D. T., Goldbohm, R. A., van Poppel, G., Verhagen, H. and van den Brandt, P. A., *Epidemiological studies on brassica vegetables and cancer risk*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1996. **5**(9): p. 733-748.
3. Ludikhuyze, L., Rodrigo, L. and Hendrickx, M., *The activity of myrosinase from broccoli (Brassica oleracea L. cv. Italica): influence of intrinsic and extrinsic factors*. J Food Prot, 2000. **63**(3): p. 400-403.
4. Fahey, J. W., Zhang, Y. and Talalay, P., *Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(19): p. 10367-10372.
5. Kelloff, G. J., Crowell, J. A., Steele, V. E., Lubet, R. A., Malone, W. A., Boone, C. W., Kopelovich, L., Hawk, E. T., Lieberman, R., Lawrence, J. A., Ali, I., Viner, J. L. and Sigman, C. C., *Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents*. J Nutr, 2000. **130**(2S Suppl): p. 467S-471S.
6. Steinbrecher, A. and Linseisen, J., *Dietary intake of individual glucosinolates in participants of the EPIC-Heidelberg cohort study*. Ann Nutr Metab, 2009. **54**(2): p. 87-96.
7. Petri, N., Tannergren, C., Holst, B., Mellon, F. A., Bao, Y., Plumb, G. W., Bacon, J., O'Leary, K. A., Kroon, P. A., Knutson, L., Forsell, P., Eriksson, T., Lennernas, H. and Williamson, G., *Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase II enzymes, in human jejunum in vivo*. Drug Metab Dispos, 2003. **31**(6): p. 805-813.
8. Ye, L., Dinkova-Kostova, A. T., Wade, K. L., Zhang, Y., Shapiro, T. A. and Talalay, P., *Quantitative determination of dithiocarbamates in human plasma, serum, erythrocytes and urine: pharmacokinetics of broccoli sprout isothiocyanates in humans*. Clin Chim Acta, 2002. **316**(1-2): p. 43-53.
9. Bheemreddy, R. M. and Jeffery, E. H., *The metabolic fate of purified glucoraphanin in F344 rats*. J Agric Food Chem, 2007. **55**(8): p. 2861-2866.
10. Zhang, Y., *Role of glutathione in the accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates and their glutathione conjugates by murine hepatoma cells*. Carcinogenesis, 2000. **21**(6): p. 1175-1182.
11. Callaway, E. C., Zhang, Y., Chew, W. and Chow, H. H., *Cellular accumulation of dietary anticarcinogenic isothiocyanates is followed by transporter-mediated export as dithiocarbamates*. Cancer Lett, 2004. **204**(1): p. 23-31.
12. Kassahun, K., Davis, M., Hu, P., Martin, B. and Baillie, T., *Biotransformation of the naturally occurring isothiocyanate sulforaphane in the rat: identification of phase I metabolites and glutathione conjugates*. Chem Res Toxicol, 1997. **10**(11): p. 1228-1233.

13. Chung, F. L., Jiao, D., Getahun, S. M. and Yu, M. C., *A urinary biomarker for uptake of dietary isothiocyanates in humans*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1998. **7**(2): p. 103-108.
14. Clarke, J. D., Dashwood, R. H. and Ho, E., *Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane*. *Cancer Lett*, 2008. **269**(2): p. 291-304.
15. Conaway, C. C., Krzeminski, J., Amin, S. and Chung, F. L., *Decomposition rates of isothiocyanate conjugates determine their activity as inhibitors of cytochrome p450 enzymes*. *Chem Res Toxicol*, 2001. **14**(9): p. 1170-1176.
16. Maheo, K., Morel, F., Langouet, S., Kramer, H., Le Ferrec, E., Ketterer, B. and Guillouzo, A., *Inhibition of cytochromes P-450 and induction of glutathione S-transferases by sulforaphane in primary human and rat hepatocytes*. *Cancer Res*, 1997. **57**(17): p. 3649-3652.
17. Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C. G. and Posner, G. H., *A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(6): p. 2399-2403.
18. Payen, L., Courtois, A., Loewert, M., Guillouzo, A. and Fardel, O., *Reactive oxygen species-related induction of multidrug resistance-associated protein 2 expression in primary hepatocytes exposed to sulforaphane*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **282**(1): p. 257-263.
19. Shinkai, Y., Sumi, D., Fukami, I., Ishii, T. and Kumagai, Y., *Sulforaphane, an activator of Nrf2, suppresses cellular accumulation of arsenic and its cytotoxicity in primary mouse hepatocytes*. *FEBS Lett*, 2006. **580**(7): p. 1771-1774.
20. Gamet-Payraastre, L., Li, P., Lumeau, S., Cassar, G., Dupont, M. A., Chevolleau, S., Gasc, N., Tulliez, J. and Terce, F., *Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells*. *Cancer Res*, 2000. **60**(5): p. 1426-1433.
21. Bonnesen, C., Eggleston, I. M. and Hayes, J. D., *Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines*. *Cancer Res*, 2001. **61**(16): p. 6120-6130.
22. Fimognari, C., Nusse, M., Cesari, R., Iori, R., Cantelli-Forti, G. and Hrelia, P., *Growth inhibition, cell-cycle arrest and apoptosis in human T-cell leukemia by the isothiocyanate sulforaphane*. *Carcinogenesis*, 2002. **23**(4): p. 581-586.
23. Jeong, W. S., Kim, I. W., Hu, R. and Kong, A. N., *Modulation of AP-1 by natural chemopreventive compounds in human colon HT-29 cancer cell line*. *Pharm Res*, 2004. **21**(4): p. 649-660.
24. Jakubikova, J., Sedlak, J., Mithen, R. and Bao, Y., *Role of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways in sulforaphane- and erucin-induced phase II enzymes and MRP2 transcription, G2/M arrest and cell death in Caco-2 cells*. *Biochem Pharmacol*, 2005. **69**(11): p. 1543-1552.
25. Pappa, G., Bartsch, H. and Gerhauser, C., *Biphasic modulation of cell proliferation by sulforaphane at physiologically relevant exposure times in a human colon cancer cell line*. *Mol Nutr Food Res*, 2007. **51**(8): p. 977-984.

26. Shen, G., Xu, C., Chen, C., Hebbar, V. and Kong, A. N., *p53-independent G1 cell cycle arrest of human colon carcinoma cells HT-29 by sulforaphane is associated with induction of p21CIP1 and inhibition of expression of cyclin D1*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2006. **57**(3): p. 317-327.
27. Parnaud, G., Li, P., Cassar, G., Rouimi, P., Tulliez, J., Combaret, L. and Gamet-Payraastre, L., *Mechanism of sulforaphane-induced cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells*. *Nutr Cancer*, 2004. **48**(2): p. 198-206.
28. Choi, S., Lew, K. L., Xiao, H., Herman-Antosiewicz, A., Xiao, D., Brown, C. K. and Singh, S. V., *D,L-Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is regulated by inhibitor of apoptosis family proteins and Apaf-1*. *Carcinogenesis*, 2007. **28**(1): p. 151-162.
29. Pappa, G., Lichtenberg, M., Iori, R., Barillari, J., Bartsch, H. and Gerhauser, C., *Comparison of growth inhibition profiles and mechanisms of apoptosis induction in human colon cancer cell lines by isothiocyanates and indoles from Brassicaceae*. *Mutat Res*, 2006. **599**(1-2): p. 76-87.
30. Singh, S. V., Srivastava, S. K., Choi, S., Lew, K. L., Antosiewicz, J., Xiao, D., Zeng, Y., Watkins, S. C., Johnson, C. S., Trump, D. L., Lee, Y. J., Xiao, H. and Herman-Antosiewicz, A., *Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(20): p. 19911-19924.
31. Heiss, E., Herhaus, C., Klimo, K., Bartsch, H. and Gerhauser, C., *Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(34): p. 32008-32015.
32. Song, M. Y., Kim, E. K., Moon, W. S., Park, J. W., Kim, H. J., So, H. S., Park, R., Kwon, K. B. and Park, B. H., *Sulforaphane protects against cytokine- and streptozotocin-induced beta-cell damage by suppressing the NF-kappaB pathway*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009. **235**(1): p. 57-67.
33. Lin, W., Wu, R. T., Wu, T., Khor, T. O., Wang, H. and Kong, A. N., *Sulforaphane suppressed LPS-induced inflammation in mouse peritoneal macrophages through Nrf2 dependent pathway*. *Biochem Pharmacol*, 2008. **76**(8): p. 967-973.
34. Shibata, A., Nakagawa, K., Yamanoi, H., Tsuduki, T., Sookwong, P., Higuchi, O., Kimura, F. and Miyazawa, T., *Sulforaphane suppresses ultraviolet B-induced inflammation in HaCaT keratinocytes and HR-1 hairless mice*. *J Nutr Biochem*, 2009.
35. Shan, Y., Wang, X., Wang, W., He, C. and Bao, Y., *p38 MAPK plays a distinct role in sulforaphane-induced up-regulation of ARE-dependent enzymes and down-regulation of COX-2 in human bladder cancer cells*. *Oncol Rep*, 2010. **23**(4): p. 1133-1138.
36. Shan, Y., Wu, K., Wang, W., Wang, S., Lin, N., Zhao, R., Cassidy, A. and Bao, Y., *Sulforaphane down-regulates COX-2 expression by activating p38 and inhibiting NF-kappaB-DNA-binding activity in human bladder T24 cells*. *Int J Oncol*, 2009. **34**(4): p. 1129-1134.

37. Woo, K. J. and Kwon, T. K., *Sulforaphane suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression through the modulation of multiple targets in COX-2 gene promoter*. *Int Immunopharmacol*, 2007. **7**(13): p. 1776-1783.
38. Myzak, M. C., Karplus, P. A., Chung, F. L. and Dashwood, R. H., *A novel mechanism of chemoprotection by sulforaphane: inhibition of histone deacetylase*. *Cancer Res.*, 2004. **64**(16): p. 5767-5774.
39. Myzak, M. C., Dashwood, W. M., Orner, G. A., Ho, E. and Dashwood, R. H., *Sulforaphane inhibits histone deacetylase in vivo and suppresses tumorigenesis in Apc-minus mice*. *Faseb J*, 2006. **20**(3): p. 506-508.
40. Aires, A., Mota, V. R., Saavedra, M. J., Rosa, E. A. and Bennett, R. N., *The antimicrobial effects of glucosinolates and their respective enzymatic hydrolysis products on bacteria isolated from the human intestinal tract*. *J Appl Microbiol*, 2009. **106**(6): p. 2086-2095.
41. Johansson, N. L., Pavia, C. S. and Chiao, J. W., *Growth inhibition of a spectrum of bacterial and fungal pathogens by sulforaphane, an isothiocyanate product found in broccoli and other cruciferous vegetables*. *Planta Med*, 2008. **74**(7): p. 747-750.
42. Chung, F. L., Conaway, C. C., Rao, C. V. and Reddy, B. S., *Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci in Fischer rats by sulforaphane and phenethyl isothiocyanate*. *Carcinogenesis*, 2000. **21**(12): p. 2287-2291.
43. Zhang, Y., Kensler, T. W., Cho, C. G., Posner, G. H. and Talalay, P., *Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(8): p. 3147-3150.
44. Conaway, C. C., Wang, C. X., Pittman, B., Yang, Y. M., Schwartz, J. E., Tian, D., McIntee, E. J., Hecht, S. S. and Chung, F. L., *Phenethyl isothiocyanate and sulforaphane and their N-acetylcysteine conjugates inhibit malignant progression of lung adenomas induced by tobacco carcinogens in A/J mice*. *Cancer Res*, 2005. **65**(18): p. 8548-8557.
45. Fahey, J. W., Haristoy, X., Dolan, P. M., Kensler, T. W., Scholtus, I., Stephenson, K. K., Talalay, P. and Lozniewski, A., *Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of Helicobacter pylori and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(11): p. 7610-7615.
46. Xu, C., Huang, M. T., Shen, G., Yuan, X., Lin, W., Khor, T. O., Conney, A. H. and Kong, A. N., *Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced skin tumorigenesis in C57BL/6 mice by sulforaphane is mediated by nuclear factor E2-related factor 2*. *Cancer Res*, 2006. **66**(16): p. 8293-8296.
47. Hu, R., Khor, T. O., Shen, G., Jeong, W. S., Hebbar, V., Chen, C., Xu, C., Reddy, B., Chada, K. and Kong, A. N., *Cancer chemoprevention of intestinal polyposis in ApcMin/+ mice by sulforaphane, a natural product derived from cruciferous vegetable*. *Carcinogenesis*, 2006. **27**(10): p. 2038-2046.
48. Singh, A. V., Xiao, D., Lew, K. L., Dhir, R. and Singh, S. V., *Sulforaphane induces caspase-mediated apoptosis in cultured PC-3 human prostate cancer cells*

- and retards growth of PC-3 xenografts in vivo*. *Carcinogenesis*, 2004. **25**(1): p. 83-90.
49. Kuroiwa, Y., Nishikawa, A., Kitamura, Y., Kanki, K., Ishii, Y., Umemura, T. and Hirose, M., *Protective effects of benzyl isothiocyanate and sulforaphane but not resveratrol against initiation of pancreatic carcinogenesis in hamsters*. *Cancer Lett*, 2006. **241**(2): p. 275-280.
 50. Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M. and Nabeshima, Y., *An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **236**(2): p. 313-322.
 51. Ramos-Gomez, M., Kwak, M. K., Dolan, P. M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P. and Kensler, T. W., *Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(6): p. 3410-3415.
 52. McWalter, G. K., Higgins, L. G., McLellan, L. I., Henderson, C. J., Song, L., Thornalley, P. J., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J. D., *Transcription factor Nrf2 is essential for induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, glutathione S-transferases, and glutamate cysteine ligase by broccoli seeds and isothiocyanates*. *J Nutr*, 2004. **134**(12 Suppl): p. 3499S-3506S.
 53. Zhang, D. D. and Hannink, M., *Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(22): p. 8137-8151.
 54. McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J. D., *Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(24): p. 21592-21600.
 55. Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D. and Yamamoto, M., *Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain*. *Genes Dev*, 1999. **13**(1): p. 76-86.
 56. Motohashi, H. and Yamamoto, M., *Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism*. *Trends Mol Med*, 2004. **10**(11): p. 549-557.
 57. Siegel, D. and Ross, D., *Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues*. *Free Radic Biol Med*, 2000. **29**(3-4): p. 246-253.
 58. Li, R., Bianchet, M. A., Talalay, P. and Amzel, L. M., *The three-dimensional structure of NAD(P)H:quinone reductase, a flavoprotein involved in cancer chemoprotection and chemotherapy: mechanism of the two-electron reduction*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(19): p. 8846-8850.
 59. Hollander, P. M. and Ernster, L., *Studies on the reaction mechanism of DT diaphorase. Action of dead-end inhibitors and effects of phospholipids*. *Arch Biochem Biophys*, 1975. **169**(2): p. 560-567.

60. Winski, S. L., Koutalos, Y., Bentley, D. L. and Ross, D., *Subcellular localization of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in human cancer cells*. *Cancer Res*, 2002. **62**(5): p. 1420-1424.
61. Mikami, K., Naito, M., Ishiguro, T., Yano, H., Tomida, A., Yamada, T., Tanaka, N., Shirakusa, T. and Tsuruo, T., *Immunological quantitation of DT-diaphorase in carcinoma cell lines and clinical colon cancers: advanced tumors express greater levels of DT-diaphorase*. *Jpn J Cancer Res*, 1998. **89**(9): p. 910-915.
62. Siegel, D., Franklin, W. A. and Ross, D., *Immunohistochemical detection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase in human lung and lung tumors*. *Clin Cancer Res*, 1998. **4**(9): p. 2065-2070.
63. Ross, D., Kepa, J. K., Winski, S. L., Beall, H. D., Anwar, A. and Siegel, D., *NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms*. *Chem Biol Interact*, 2000. **129**(1-2): p. 77-97.
64. Chasseaud, L. F., *The role of glutathione and glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents*. *Adv Cancer Res*, 1979. **29**: p. 175-274.
65. Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jensson, H., Tahir, M. K., Warholm, M. and Jornvall, H., *Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(21): p. 7202-7206.
66. Seow, A., Shi, C. Y., Chung, F. L., Jiao, D., Hankin, J. H., Lee, H. P., Coetzee, G. A. and Yu, M. C., *Urinary total isothiocyanate (ITC) in a population-based sample of middle-aged and older Chinese in Singapore: relationship with dietary total ITC and glutathione S-transferase M1/T1/P1 genotypes*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1998. **7**(9): p. 775-781.
67. Seow, A., Vainio, H. and Yu, M. C., *Effect of glutathione-S-transferase polymorphisms on the cancer preventive potential of isothiocyanates: an epidemiological perspective*. *Mutat Res*, 2005. **592**(1-2): p. 58-67.
68. Joseph, M. A., Moysich, K. B., Freudenheim, J. L., Shields, P. G., Bowman, E. D., Zhang, Y., Marshall, J. R. and Ambrosone, C. B., *Cruciferous vegetables, genetic polymorphisms in glutathione S-transferases M1 and T1, and prostate cancer risk*. *Nutr Cancer*, 2004. **50**(2): p. 206-213.
69. Jacob, C., Giles, G. I., Giles, N. M. and Sies, H., *Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2003. **42**(39): p. 4742-4758.
70. Wessjohann, L. A., Schneider, A., Abbas, M. and Brandt, W., *Selenium in chemistry and biochemistry in comparison to sulfur*. *Biol Chem*, 2007. **388**(10): p. 997-1006.
71. Franke, K. W., *A new toxicant occurring naturally in certain samples of plant food-stuffs*. *J. Nutr.*, 1934. **8**: p. 597-608.
72. Schwarz, K. and Foltz, C. M., *Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1957. **79**: p. 3292-3293.

73. DGE, *Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr*. Umschau/Braus, Frankfurt, Deutschland, 2000.
74. Flohe, L., *Selenium in mammalian spermiogenesis*. Biol Chem, 2007. **388**(10): p. 987-995.
75. Beck, M. A., *Selenium and host defence towards viruses*. Proc Nutr Soc, 1999. **58**(3): p. 707-711.
76. Ge, K., Xue, A., Bai, J. and Wang, S., *Keshan disease-an endemic cardiomyopathy in China*. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1983. **401**(1): p. 1-15.
77. Beck, M. A., Levander, O. A. and Handy, J., *Selenium deficiency and viral infection*. J Nutr, 2003. **133**(5 Suppl 1): p. 1463S-1467S.
78. Levander, O. A., *A global view of human selenium nutrition*. Annu Rev Nutr, 1987. **7**: p. 227-250.
79. Rayman, M. P., *The importance of selenium to human health*. Lancet, 2000. **356**(9225): p. 233-241.
80. Rayman, M. P., *Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action*. Proc Nutr Soc, 2005. **64**(4): p. 527-542.
81. Combs, G. F., Jr. and Gray, W. P., *Chemopreventive agents: selenium*. Pharmacol Ther, 1998. **79**(3): p. 179-192.
82. Whanger, P., Vendeland, S., Park, Y. C. and Xia, Y., *Metabolism of subtoxic levels of selenium in animals and humans*. Ann Clin Lab Sci, 1996. **26**(2): p. 99-113.
83. Clark, L. C., Combs, G. F., Jr., Turnbull, B. W., Slate, E. H., Chalker, D. K., Chow, J., Davis, L. S., Glover, R. A., Graham, G. F., Gross, E. G., Krongrad, A., Leshner, J. L., Jr., Park, H. K., Sanders, B. B., Jr., Smith, C. L. and Taylor, J. R., *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.
84. El-Bayoumy, K. and Sinha, R., *Molecular chemoprevention by selenium: a genomic approach*. Mutat Res, 2005. **591**(1-2): p. 224-236.
85. Lu, J., *Apoptosis and angiogenesis in cancer prevention by selenium*. Adv Exp Med Biol, 2001. **492**: p. 131-145.
86. Ip, C., *Lessons from basic research in selenium and cancer prevention*. J Nutr, 1998. **128**(11): p. 1845-1854.
87. McKeehan, W. L., Hamilton, W. G. and Ham, R. G., *Selenium is an essential trace nutrient for growth of WI-38 diploid human fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(6): p. 2023-2027.
88. Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N., *How selenium has altered our understanding of the genetic code*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(11): p. 3565-3576.
89. Andreesen, J. R. and Ljungdahl, L. G., *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.

90. Flohe, L., Gunzler, W. A. and Schock, H. H., *Glutathione peroxidase: a selenoenzyme*. FEBS Lett, 1973. **32**(1): p. 132-134.
91. Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G. and Hoekstra, W. G., *Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase*. Science, 1973. **179**(73): p. 588-590.
92. Driscoll, D. M. and Copeland, P. R., *Mechanism and regulation of selenoprotein synthesis*. Annu Rev Nutr, 2003. **23**: p. 17-40.
93. Stadtman, T. C., *Selenium biochemistry*. Annu Rev Biochem, 1990. **59**: p. 111-127.
94. Kryukov, G. V., Castellano, S., Novoselov, S. V., Lobanov, A. V., Zehtab, O., Guigo, R. and Gladyshev, V. N., *Characterization of mammalian selenoproteomes*. Science, 2003. **300**(5624): p. 1439-1443.
95. Papp, L. V., Lu, J., Holmgren, A. and Khanna, K. K., *From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health*. Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(7): p. 775-806.
96. Chu, F. F., Doroshov, J. H. and Esworthy, R. S., *Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI*. J Biol Chem, 1993. **268**(4): p. 2571-2576.
97. Wingler, K., Bocher, M., Flohé, L., Kollmus, H. and Brigelius-Flohé, R., *mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins*. Eur. J. Biochem., 1999. **259**(1-2): p. 149-157.
98. Takahashi, K., Avissar, N., Whitin, J. and Cohen, H., *Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme*. Arch Biochem Biophys, 1987. **256**(2): p. 677-686.
99. Yamamoto, Y. and Takahashi, K., *Glutathione peroxidase isolated from plasma reduces phospholipid hydroperoxides*. Arch Biochem Biophys, 1993. **305**(2): p. 541-545.
100. Ursini, F., Maiorino, M. and Gregolin, C., *The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase*. Biochim. Biophys. Acta, 1985. **839**(1): p. 62-70.
101. Brigelius-Flohe, R., Aumann, K. D., Blocker, H., Gross, G., Kiess, M., Kloppel, K. D., Maiorino, M., Roveri, A., Schuckelt, R., Usani, F. and et al., *Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence*. J Biol Chem, 1994. **269**(10): p. 7342-7348.
102. Vaishnav, R. A., Getchell, M. L., Huang, L., Hersh, M. A., Stromberg, A. J. and Getchell, T. V., *Cellular and molecular characterization of oxidative stress in olfactory epithelium of Harlequin mutant mouse*. J Neurosci Res, 2008. **86**(1): p. 165-182.
103. Gladyshev, V. N., Jeang, K. T. and Stadtman, T. C., *Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corre-*

- sponds to TGA in the human placental gene. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(12): p. 6146-6151.
104. Lee, S. R., Kim, J. R., Kwon, K. S., Yoon, H. W., Levine, R. L., Ginsburg, A. and Rhee, S. G., *Molecular cloning and characterization of a mitochondrial selenocysteine-containing thioredoxin reductase from rat liver*. J Biol Chem, 1999. **274**(8): p. 4722-4734.
 105. Sun, Q. A., Wu, Y., Zappacosta, F., Jeang, K. T., Lee, B. J., Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N., *Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases*. J Biol Chem, 1999. **274**(35): p. 24522-24530.
 106. Behne, D., Kyriakopoulos, A., Meinhold, H. and Kohrle, J., *Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **173**(3): p. 1143-1149.
 107. Davey, J. C., Becker, K. B., Schneider, M. J., St Germain, D. L. and Galton, V. A., *Cloning of a cDNA for the type II iodothyronine deiodinase*. J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 26786-26789.
 108. Croteau, W., Davey, J. C., Galton, V. A. and St Germain, D. L., *Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. A selenoprotein differentially expressed and regulated in human and rat brain and other tissues*. J Clin Invest, 1996. **98**(2): p. 405-417.
 109. Xu, X. M., Carlson, B. A., Irons, R., Mix, H., Zhong, N., Gladyshev, V. N. and Hatfield, D. L., *Selenophosphate synthetase 2 is essential for selenoprotein biosynthesis*. Biochem J, 2007. **404**(1): p. 115-120.
 110. Panee, J., Stoytcheva, Z. R., Liu, W. and Berry, M. J., *Selenoprotein H is a redox-sensing high mobility group family DNA-binding protein that up-regulates genes involved in glutathione synthesis and phase II detoxification*. J Biol Chem, 2007. **282**(33): p. 23759-23765.
 111. Novoselov, S. V., Kryukov, G. V., Xu, X. M., Carlson, B. A., Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N., *Selenoprotein H is a nucleolar thioredoxin-like protein with a unique expression pattern*. J Biol Chem, 2007. **282**(16): p. 11960-11968.
 112. Horibata, Y. and Hirabayashi, Y., *Identification and characterization of human ethanolaminephosphotransferase I*. J Lipid Res, 2007. **48**(3): p. 503-508.
 113. Lu, C., Qiu, F., Zhou, H., Peng, Y., Hao, W., Xu, J., Yuan, J., Wang, S., Qiang, B., Xu, C. and Peng, X., *Identification and characterization of selenoprotein K: an antioxidant in cardiomyocytes*. FEBS Lett, 2006. **580**(22): p. 5189-5197.
 114. Korotkov, K. V., Novoselov, S. V., Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N., *Mammalian selenoprotein in which selenocysteine (Sec) incorporation is supported by a new form of Sec insertion sequence element*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(5): p. 1402-1411.
 115. Hwang, D. Y., Cho, J. S., Oh, J. H., Shim, S. B., Jee, S. W., Lee, S. H., Seo, S. J., Lee, S. K. and Kim, Y. K., *Differentially expressed genes in transgenic mice carrying human mutant presenilin-2 (N141I): correlation of selenoprotein M with Alzheimer's disease*. Neurochem Res, 2005. **30**(8): p. 1009-1019.

116. Petit, N., Lescure, A., Rederstorff, M., Krol, A., Moghadaszadeh, B., Wewer, U. M. and Guichenev, P., *Selenoprotein N: an endoplasmic reticulum glycoprotein with an early developmental expression pattern*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(9): p. 1045-1053.
117. Arbogast, S. and Ferreiro, A., *Selenoproteins and protection against oxidative stress: selenoprotein N as a novel player at the crossroads of redox signaling and calcium homeostasis*. Antioxid Redox Signal. **12**(7): p. 893-904.
118. Pappas, A. C., Zoidis, E., Surai, P. F. and Zervas, G., *Selenoproteins and maternal nutrition*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2008. **151**(4): p. 361-372.
119. Burk, R. F. and Hill, K. E., *Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis*. Annu Rev Nutr, 2005. **25**: p. 215-235.
120. Walder, K., Kantham, L., McMillan, J. S., Trevaskis, J., Kerr, L., De Silva, A., Sunderland, T., Godde, N., Gao, Y., Bishara, N., Windmill, K., Tenne-Brown, J., Augert, G., Zimmet, P. Z. and Collier, G. R., *Tanis: a link between type 2 diabetes and inflammation?* Diabetes, 2002. **51**(6): p. 1859-1866.
121. Gao, Y., Hannan, N. R., Wanyonyi, S., Konstantopolous, N., Pagnon, J., Feng, H. C., Jowett, J. B., Kim, K. H., Walder, K. and Collier, G. R., *Activation of the selenoprotein SEPS1 gene expression by pro-inflammatory cytokines in HepG2 cells*. Cytokine, 2006. **33**(5): p. 246-251.
122. Grumolato, L., Ghzili, H., Montero-Hadjadje, M., Gasman, S., Lesage, J., Tanguy, Y., Galas, L., Ait-Ali, D., Leprince, J., Guerineau, N. C., Elkahloun, A. G., Fournier, A., Vieau, D., Vaudry, H. and Anouar, Y., *Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca²⁺ mobilization and neuroendocrine secretion*. Faseb J, 2008. **22**(6): p. 1756-1768.
123. Vendeland, S. C., Beilstein, M. A., Chen, C. L., Jensen, O. N., Barofsky, E. and Whanger, P. D., *Purification and properties of selenoprotein W from rat muscle*. J Biol Chem, 1993. **268**(23): p. 17103-17107.
124. Kryukov, G. V., Kumar, R. A., Koc, A., Sun, Z. and Gladyshev, V. N., *Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(7): p. 4245-4250.
125. Kim, H. Y. and Gladyshev, V. N., *Methionine sulfoxide reduction in mammals: characterization of methionine-R-sulfoxide reductases*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(3): p. 1055-1064.
126. Kumaraswamy, E., Malykh, A., Korotkov, K. V., Kozyavkin, S., Hu, Y., Kwon, S. Y., Moustafa, M. E., Carlson, B. A., Berry, M. J., Lee, B. J., Hatfield, D. L., Diamond, A. M. and Gladyshev, V. N., *Structure-expression relationships of the 15-kDa selenoprotein gene. Possible role of the protein in cancer etiology*. J Biol Chem, 2000. **275**(45): p. 35540-35547.
127. Chambers, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Affara, N., McBain, W. and Harrison, P. R., *The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA*. Embo J, 1986. **5**(6): p. 1221-1227.

128. Mehta, A., Rebsch, C. M., Kinzy, S. A., Fletcher, J. E. and Copeland, P. R., *Efficiency of mammalian selenocysteine incorporation*. J Biol Chem, 2004. **279**(36): p. 37852-37859.
129. Nirenberg, M., Leder, P., Bernfield, M., Brimacombe, R., Trupin, J., Rottman, F. and O'Neal, C., *RNA codewords and protein synthesis, VII. On the general nature of the RNA code*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1965. **53**(5): p. 1161-1168.
130. Tamura, T., Yamamoto, S., Takahata, M., Sakaguchi, H., Tanaka, H., Stadtman, T. C. and Inagaki, K., *Selenophosphate synthetase genes from lung adenocarcinoma cells: Sps1 for recycling L-selenocysteine and Sps2 for selenite assimilation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(46): p. 16162-16167.
131. Yuan, J., Palioura, S., Salazar, J. C., Su, D., O'Donoghue, P., Hohn, M. J., Cardoso, A. M., Whitman, W. B. and Soll, D., *RNA-dependent conversion of phosphoserine forms selenocysteine in eukaryotes and archaea*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(50): p. 18923-18927.
132. Chavatte, L., Brown, B. A. and Driscoll, D. M., *Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(5): p. 408-416.
133. Small-Howard, A., Morozova, N., Stoytcheva, Z., Forry, E. P., Mansell, J. B., Harney, J. W., Carlson, B. A., Xu, X. M., Hatfield, D. L. and Berry, M. J., *Supramolecular complexes mediate selenocysteine incorporation in vivo*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(6): p. 2337-2346.
134. Bosl, M. R., Takaku, K., Oshima, M., Nishimura, S. and Taketo, M. M., *Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (Trsp)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(11): p. 5531-5534.
135. Diamond, A. M., Choi, I. S., Crain, P. F., Hashizume, T., Pomerantz, S. C., Cruz, R., Steer, C. J., Hill, K. E., Burk, R. F., McCloskey, J. A. and et al., *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.
136. Carlson, B. A., Xu, X. M., Gladyshev, V. N. and Hatfield, D. L., *Selective rescue of selenoprotein expression in mice lacking a highly specialized methyl group in selenocysteine tRNA*. J Biol Chem, 2005. **280**(7): p. 5542-5548.
137. Sun, X., Moriarty, P. M. and Maquat, L. E., *Nonsense-mediated decay of glutathione peroxidase 1 mRNA in the cytoplasm depends on intron position*. Embo J, 2000. **19**(17): p. 4734-4744.
138. Allan, C. B., Lacourciere, G. M. and Stadtman, T. C., *Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium*. Annu Rev Nutr, 1999. **19**: p. 1-16.
139. Budiman, M. E., Bubenik, J. L., Miniard, A. C., Middleton, L. M., Gerber, C. A., Cash, A. and Driscoll, D. M., *Eukaryotic initiation factor 4a3 is a selenium-regulated RNA-binding protein that selectively inhibits selenocysteine incorporation*. Mol Cell, 2009. **35**(4): p. 479-489.
140. Kipp, A., Banning, A., van Schothorst, E. M., Meplan, C., Schomburg, L., Evelo, C., Coort, S., Gaj, S., Keijer, J., Hesketh, J. and Brigelius-Flohe, R., *Four seleno-*

- proteins, protein biosynthesis, and Wnt signalling are particularly sensitive to limited selenium intake in mouse colon.* Mol. Nutr. Food. Res., 2009.
141. Xia, Y., Hill, K. E., Li, P., Xu, J., Zhou, D., Motley, A. K., Wang, L., Byrne, D. W. and Burk, R. F., *Optimization of selenoprotein P and other plasma selenium biomarkers for the assessment of the selenium nutritional requirement: a placebo-controlled double-blind study of selenomethionine supplementation in selenium-deficient Chinese subjects.* Am J Clin Nutr, 2010.
 142. Brigelius-Flohé, R., Maiorino, M., Ursini, F. and Flohé, L., *Selenium: An Antioxidant?*, in *Handbook of Antioxidants*, Packer, E. C. a. L., Editor. 2001, Marcel Dekker: New York, Basel. p. pp. 633-664.
 143. Brigelius-Flohé, R., *Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases.* Free Radic. Biol. Med., 1999. **27**(9-10): p. 951-965.
 144. Maiorino, M., Aumann, K. D., Brigelius-Flohe, R., Doria, D., van den Heuvel, J., McCarthy, J., Roveri, A., Ursini, F. and Flohe, L., *Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx).* Biol Chem Hoppe Seyler, 1995. **376**(11): p. 651-660.
 145. Cheng, W. H., Ho, Y. S., Valentine, B. A., Ross, D. A., Combs, G. F., Jr. and Lei, X. G., *Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice.* J Nutr, 1998. **128**(7): p. 1070-1076.
 146. Esworthy, R. S., Mann, J. R., Sam, M. and Chu, F. F., *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.
 147. Ho, Y. S., Magnenat, J. L., Bronson, R. T., Cao, J., Gargano, M., Sugawara, M. and Funk, C. D., *Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia.* J Biol Chem, 1997. **272**(26): p. 16644-16651.
 148. Nasr, M. A., Fedele, M. J., Esser, K. and Diamond, A. M., *GPx-1 modulates Akt and P70S6K phosphorylation and Gadd45 levels in MCF-7 cells.* Free Radic Biol Med, 2004. **37**(2): p. 187-195.
 149. Irons, R., Carlson, B. A., Hatfield, D. L. and Davis, C. D., *Both selenoproteins and low molecular weight selenocompounds reduce colon cancer risk in mice with genetically impaired selenoprotein expression.* J Nutr, 2006. **136**(5): p. 1311-1317.
 150. Faucher, K., Rabinovitch-Chable, H., Cook-Moreau, J., Barriere, G., Sturtz, F. and Rigaud, M., *Overexpression of human GPX1 modifies Bax to Bcl-2 apoptotic ratio in human endothelial cells.* Mol. Cell. Biochem., 2005. **277**(1-2): p. 81-87.
 151. Lei, X. G., Cheng, W. H. and McClung, J. P., *Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1.* Annu. Rev. Nutr., 2007. **27**: p. 41-61.
 152. Esworthy, R. S., Swiderek, K. M., Ho, Y. S. and Chu, F. F., *Selenium-dependent glutathione peroxidase-GI is a major glutathione peroxidase activity in the mucosal epithelium of rodent intestine.* Biochim Biophys Acta, 1998. **1381**(2): p. 213-226.

153. Wingler, K., Muller, C., Schmehl, K., Florian, S. and Brigelius-Flohe, R., *Gastrointestinal glutathione peroxidase prevents transport of lipid hydroperoxides in CaCo-2 cells*. Gastroenterology, 2000. **119**(2): p. 420-430.
154. Florian, S., Wingler, K., Schmehl, K., Jacobasch, G., Kreuzer, O. J., Meyerhof, W. and Brigelius-Flohe, R., *Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue*. Free Radic. Res., 2001. **35**: p. 655-663.
155. Kipp, A., Banning, A. and Brigelius-Flohe, R., *Activation of the glutathione peroxidase 2 (GPx2) promoter by beta-catenin*. Biol Chem, 2007. **388**(10): p. 1027-1033.
156. Esworthy, R. S., Baker, M. A. and Chu, F. F., *Expression of selenium-dependent glutathione peroxidase in human breast tumor cell lines*. Cancer Res, 1995. **55**(4): p. 957-962.
157. Serewko, M. M., Popa, C., Dahler, A. L., Smith, L., Strutton, G. M., Coman, W., Dicker, A. J. and Saunders, N. A., *Alterations in gene expression and activity during squamous cell carcinoma development*. Cancer Res, 2002. **62**(13): p. 3759-3765.
158. Mörk, H., Scheurlen, M., Al-Taie, O., Zierer, A., Kraus, M., Schottker, K., Jakob, F. and Köhrle, J., *Glutathione peroxidase isoforms as part of the local antioxidative defense system in normal and Barrett's esophagus*. Int. J. Cancer, 2003. **105**(3): p. 300-304.
159. Lin, Y. M., Furukawa, Y., Tsunoda, T., Yue, C. T., Yang, K. C. and Nakamura, Y., *Molecular diagnosis of colorectal tumors by expression profiles of 50 genes expressed differentially in adenomas and carcinomas*. Oncogene, 2002. **21**(26): p. 4120-4128.
160. Mork, H., al-Taie, O. H., Bahr, K., Zierer, A., Beck, C., Scheurlen, M., Jakob, F. and Kohrle, J., *Inverse mRNA expression of the selenocysteine-containing proteins GI-GPx and SeP in colorectal adenomas compared with adjacent normal mucosa*. Nutr Cancer, 2000. **37**(1): p. 108-116.
161. Esworthy, R. S., Aranda, R., Martin, M. G., Doroshov, J. H., Binder, S. W. and Chu, F. F., *Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis*. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 2001. **281**(3): p. G848-855.
162. Chu, F. F., Esworthy, R. S., Chu, P. G., Longmate, J. A., Huycke, M. M., Wilczynski, S. and Doroshov, J. H., *Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes*. Cancer Res., 2004. **64**(3): p. 962-968.
163. Esworthy, R. S., Yang, L., Frankel, P. H. and Chu, F. F., *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.
164. Banning, A., Florian, S., Deubel, S., Thalmann, S., Muller-Schmehl, K., Jacobasch, G. and Brigelius-Flohe, R., *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. Kulmacz, R. J., *Regulation of cyclooxygenase catalysis by hydroperoxides*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(1): p. 25-33.
166. Faour, W. H., He, Y., He, Q. W., de Ladurantaye, M., Quintero, M., Mancini, A. and Di Battista, J. A., *Prostaglandin E(2) regulates the level and stability of cyclooxygenase-2 mRNA through activation of p38 mitogen-activated protein kinase in interleukin-1 beta-treated human synovial fibroblasts*. J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 31720-31731.
167. Banning, A., Kipp, A., Schmitmeier, S., Lowinger, M., Florian, S., Krehl, S., Thalmann, S., Thierbach, R., Steinberg, P. and Brigelius-Flohe, R., *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.
168. Brigelius-Flohe, R. and Kipp, A., *Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**(11): p. 1555-1568.
169. Banning, A., Deubel, S., Kluth, D., Zhou, Z. and Brigelius-Flohe, R., *The GI-GPx gene is a target for Nrf2*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(12): p. 4914-4923.
170. Hintze, K. J., Keck, A.-S., Finley, J. W. and Jeffery, E. H., *Induction of hepatic thioredoxin reductase activity by sulforaphane, both in Hepa1c1c7 cells and in male Fisher 344 rats*. J Nutr Biochem, 2003. **14**: p. 173-179.
171. Zhang, J., Svehlikova, V., Bao, Y., Howie, A. F., Beckett, G. J. and Williamson, G., *Synergy between sulforaphane and selenium in the induction of thioredoxin reductase 1 requires both transcriptional and translational modulation*. Carcinogenesis, 2003. **24**(3): p. 497-503.
172. Hintze, K. J., Wald, K. and Finley, J. W., *Phytochemicals in broccoli transcriptionally induce thioredoxin reductase*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(14): p. 5535-5540.
173. Wang, W., Wang, S., Howie, A. F., Beckett, G. J., Mithen, R. and Bao, Y., *Sulforaphane, erucin, and iberin up-regulate thioredoxin reductase 1 expression in human MCF-7 cells*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(5): p. 1417-1421.
174. Campbell, L., Howie, F., Arthur, J. R., Nicol, F. and Beckett, G., *Selenium and sulforaphane modify the expression of selenoenzymes in the human endothelial cell line EAhy926 and protect cells from oxidative damage*. Nutrition, 2007. **23**(2): p. 138-144.
175. Gasdaska, J. R., Berggren, M. and Powis, G., *Cell growth stimulation by the redox protein thioredoxin occurs by a novel helper mechanism*. Cell Growth Differ, 1995. **6**(12): p. 1643-1650.
176. Baker, A., Payne, C. M., Briehl, M. M. and Powis, G., *Thioredoxin, a gene found overexpressed in human cancer; inhibits apoptosis in vitro and in vivo*. Cancer Res, 1997. **57**(22): p. 5162-5167.
177. Mustacich, D. and Powis, G., *Thioredoxin reductase*. Biochem J, 2000. **346 Pt 1**: p. 1-8.

178. Conrad, M., Jakupoglu, C., Moreno, S. G., Lippl, S., Banjac, A., Schneider, M., Beck, H., Hatzopoulos, A. K., Just, U., Sinowatz, F., Schmahl, W., Chien, K. R., Wurst, W., Bornkamm, G. W. and Brielmeier, M., *Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(21): p. 9414-9423.
179. Lincoln, D. T., Ali Emadi, E. M., Tonissen, K. F. and Clarke, F. M., *The thioredoxin-thioredoxin reductase system: over-expression in human cancer*. Anticancer Res, 2003. **23**(3B): p. 2425-2433.
180. Turunen, N., Karihtala, P., Mantyniemi, A., Sormunen, R., Holmgren, A., Kinnula, V. L. and Soini, Y., *Thioredoxin is associated with proliferation, p53 expression and negative estrogen and progesterone receptor status in breast carcinoma*. Apamis, 2004. **112**(2): p. 123-132.
181. Raffel, J., Bhattacharyya, A. K., Gallegos, A., Cui, H., Einspahr, J. G., Alberts, D. S. and Powis, G., *Increased expression of thioredoxin-1 in human colorectal cancer is associated with decreased patient survival*. J Lab Clin Med, 2003. **142**(1): p. 46-51.
182. Yoo, M. H., Xu, X. M., Carlson, B. A., Gladyshev, V. N. and Hatfield, D. L., *Thioredoxin reductase 1 deficiency reverses tumor phenotype and tumorigenicity of lung carcinoma cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(19): p. 13005-13008.
183. Yoo, M. H., Xu, X. M., Carlson, B. A., Patterson, A. D., Gladyshev, V. N. and Hatfield, D. L., *Targeting thioredoxin reductase 1 reduction in cancer cells inhibits self-sufficient growth and DNA replication*. PLoS One, 2007. **2**(10): p. e1112.
184. Perocco, P., Bronzetti, G., Canistro, D., Valgimigli, L., Sapone, A., Affatato, A., Pedulli, G. F., Pozzetti, L., Broccoli, M., Iori, R., Barillari, J., Sblendorio, V., Legator, M. S., Paolini, M. and Abdel-Rahman, S. Z., *Glucoraphanin, the bioprecursor of the widely extolled chemopreventive agent sulforaphane found in broccoli, induces phase-I xenobiotic metabolizing enzymes and increases free radical generation in rat liver*. Mutat Res, 2006. **595**(1-2): p. 125-136.
185. Murashima, M., Watanabe, S., Zhuo, X. G., Uehara, M. and Kurashige, A., *Phase I study of multiple biomarkers for metabolism and oxidative stress after one-week intake of broccoli sprouts*. Biofactors, 2004. **22**(1-4): p. 271-275.
186. Mukherjee, S., Gangopadhyay, H. and Das, D. K., *Broccoli: a unique vegetable that protects mammalian hearts through the redox cycling of the thioredoxin superfamily*. J Agric Food Chem, 2008. **56**(2): p. 609-617.
187. Finley, J. W., Ip, C., Lisk, D. J., Davis, C. D., Hintze, K. J. and Whanger, P. D., *Cancer-protective properties of high-selenium broccoli*. J Agric Food Chem, 2001. **49**(5): p. 2679-2683.
188. Finley, J. W., Davis, C. D. and Feng, Y., *Selenium from high selenium broccoli protects rats from colon cancer*. J Nutr, 2000. **130**(9): p. 2384-2389.
189. Davis, C. D., Zeng, H. and Finley, J. W., *Selenium-enriched broccoli decreases intestinal tumorigenesis in multiple intestinal neoplasia mice*. J Nutr, 2002. **132**(2): p. 307-309.

190. Robbins, R. J., Keck, A. S., Banuelos, G. and Finley, J. W., *Cultivation conditions and selenium fertilization alter the phenolic profile, glucosinolate, and sulforaphane content of broccoli*. J. Med. Food, 2005. **8**(2): p. 204-214.
191. Keck, A. S. and Finley, J. W., *Aqueous extracts of selenium-fertilized broccoli increase selenoprotein activity and inhibit DNA single-strand breaks, but decrease the activity of quinone reductase in Hepa 1c1c7 cells*. Food Chem Toxicol, 2006. **44**(5): p. 695-703.
192. Burk, R. F., Hill, K. E., Nakayama, A., Mostert, V., Levander, X. A., Motley, A. K., Johnson, D. A., Johnson, J. A., Freeman, M. L. and Austin, L. M., *Selenium deficiency activates mouse liver Nrf2-ARE but vitamin E deficiency does not*. Free Radic Biol Med, 2008. **44**(8): p. 1617-1623.
193. Suzuki, T., Kelly, V. P., Motohashi, H., Nakajima, O., Takahashi, S., Nishimura, S. and Yamamoto, M., *Deletion of the selenocysteine tRNA gene in macrophages and liver results in compensatory gene induction of cytoprotective enzymes by Nrf2*. J Biol Chem, 2008. **283**(4): p. 2021-2030.
194. Hall, P. A., Coates, P. J., Ansari, B. and Hopwood, D., *Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis*. J Cell Sci, 1994. **107** (Pt 12): p. 3569-3577.
195. Hengartner, M. O., *The biochemistry of apoptosis*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 770-776.
196. Zeng, H. and Combs, G. F., Jr., *Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion*. J Nutr Biochem, 2008. **19**(1): p. 1-7.
197. Fearon, E. R. and Vogelstein, B., *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-767.
198. Balkwill, F. and Mantovani, A., *Inflammation and cancer: back to Virchow?* Lancet, 2001. **357**(9255): p. 539-545.
199. Sartor, R. B., *Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis*. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2006. **3**(7): p. 390-407.
200. Eaden, J. A., Abrams, K. R. and Mayberry, J. F., *The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis*. Gut, 2001. **48**(4): p. 526-535.
201. Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S. and Mori, H., *A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate*. Cancer Sci, 2003. **94**(11): p. 965-973.
202. Fiala, E. S., *Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogens 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane*. Cancer, 1977. **40**(5 Suppl): p. 2436-2445.
203. Sohn, O. S., Ishizaki, H., Yang, C. S. and Fiala, E. S., *Metabolism of azoxymethane, methylazoxymethanol and N-nitrosodimethylamine by cytochrome P450IIE1*. Carcinogenesis, 1991. **12**(1): p. 127-131.
204. Vivona, A. A., Shpitz, B., Medline, A., Bruce, W. R., Hay, K., Ward, M. A., Stern, H. S. and Gallinger, S., *K-ras mutations in aberrant crypt foci, adenomas and*

- adenocarcinomas during azoxymethane-induced colon carcinogenesis*. *Carcinogenesis*, 1993. **14**(9): p. 1777-1781.
205. Takahashi, M., Mutoh, M., Kawamori, T., Sugimura, T. and Wakabayashi, K., *Altered expression of beta-catenin, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis*. *Carcinogenesis*, 2000. **21**(7): p. 1319-1327.
206. Takahashi, M. and Wakabayashi, K., *Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents*. *Cancer Sci*, 2004. **95**(6): p. 475-480.
207. Bird, R. P., *Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer*. *Cancer Lett*, 1995. **93**(1): p. 55-71.
208. Seril, D. N., Liao, J., Yang, G. Y. and Yang, C. S., *Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models*. *Carcinogenesis*, 2003. **24**(3): p. 353-362.
209. Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S. and Tanaka, T., *Sequential observations on the occurrence of preneoplastic and neoplastic lesions in mouse colon treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate*. *Cancer Sci*, 2004. **95**(9): p. 721-727.
210. Higdon, J. V., Delage, B., Williams, D. E. and Dashwood, R. H., *Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis*. *Pharmacol Res*, 2007. **55**(3): p. 224-236.
211. Kim, M. K. and Park, J. H., *Conference on "Multidisciplinary approaches to nutritional problems". Symposium on "Nutrition and health". Cruciferous vegetable intake and the risk of human cancer: epidemiological evidence*. *Proc Nutr Soc*, 2009. **68**(1): p. 103-110.
212. Lin, H. J., Probst-Hensch, N. M., Louie, A. D., Kau, I. H., Witte, J. S., Ingles, S. A., Frankl, H. D., Lee, E. R. and Haile, R. W., *Glutathione transferase null genotype, broccoli, and lower prevalence of colorectal adenomas*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1998. **7**(8): p. 647-652.
213. Herr, I. and Buchler, M. W., *Dietary constituents of broccoli and other cruciferous vegetables: Implications for prevention and therapy of cancer*. *Cancer Treat Rev*, 2010.
214. Shen, G., Jeong, W. S., Hu, R. and Kong, A. N., *Regulation of Nrf2, NF-kappaB, and AP-1 signaling pathways by chemopreventive agents*. *Antioxid Redox Signal*, 2005. **7**(11-12): p. 1648-1663.
215. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. *J Immunol Methods*, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
216. NRC, N. R. C., *Nutrient requirements of laboratory animals*. 1995, National Academy Press: Washington, DC.
217. Sheehan, T. M. and Gao, M., *Simplified fluorometric assay of total selenium in plasma and urine*. *Clin Chem*, 1990. **36**(12): p. 2124-2126.

218. Bradford, M. M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-254.
219. Prochaska, H. J. and Talalay, P., *Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver*. Cancer Res, 1988. **48**(17): p. 4776-4782.
220. Prochaska, H. J., Santamaria, A. B. and Talalay, P., *Rapid detection of inducers of enzymes that protect against carcinogens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(6): p. 2394-2398.
221. Gromer, S. and Gross, J. H., *Methylseleninate is a substrate rather than an inhibitor of mammalian thioredoxin reductase. Implications for the antitumor effects of selenium*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 9701-9706.
222. Brigelius-Flohe, R., Wingler, K. and Muller, C., *Estimation of individual types of glutathione peroxidases*. Methods Enzymol, 2002. **347**: p. 101-112.
223. Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B., *Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation*. J Biol Chem, 1974. **249**(22): p. 7130-7139.
224. Laemmli, U. K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-685.
225. Kruschewski, M., Foitzik, T., Perez-Canto, A., Hubotter, A. and Buhr, H. J., *Changes of colonic mucosal microcirculation and histology in two colitis models: an experimental study using intravital microscopy and a new histological scoring system*. Dig Dis Sci, 2001. **46**(11): p. 2336-2343.
226. Geboes, K. and Dalle, I., *Influence of treatment on morphological features of mucosal inflammation*. Gut, 2002. **50 Suppl 3**: p. III37-42.
227. Vos, R. M. and Van Bladeren, P. J., *Glutathione S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics*. Chem Biol Interact, 1990. **75**(3): p. 241-265.
228. Sengupta, A., Carlson, B. A., Weaver, J. A., Novoselov, S. V., Fomenko, D. E., Gladyshev, V. N. and Hatfield, D. L., *A functional link between housekeeping selenoproteins and phase II enzymes*. Biochem J, 2008. **413**(1): p. 151-161.
229. Pham, N. A., Jacobberger, J. W., Schimmer, A. D., Cao, P., Gronda, M. and Hedley, D. W., *The dietary isothiocyanate sulforaphane targets pathways of apoptosis, cell cycle arrest, and oxidative stress in human pancreatic cancer cells and inhibits tumor growth in severe combined immunodeficient mice*. Mol Cancer Ther, 2004. **3**(10): p. 1239-1248.
230. Zeng, H., *Selenite and selenomethionine promote HL-60 cell cycle progression*. J Nutr, 2002. **132**(4): p. 674-679.
231. Saito, Y., Yoshida, Y., Akazawa, T., Takahashi, K. and Niki, E., *Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants*. J Biol Chem, 2003. **278**(41): p. 39428-39434.

232. Feng, Y., Finley, J. W., Davis, C. D., Becker, W. K., Fretland, A. J. and Hein, D. W., *Dietary selenium reduces the formation of aberrant crypts in rats administered 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1999. **157**(1): p. 36-42.
233. Cheung, K. L. and Kong, A. N., *Molecular targets of dietary phenethyl isothiocyanate and sulforaphane for cancer chemoprevention*. *Aaps J*, 2010. **12**(1): p. 87-97.
234. Keck, A. S. and Finley, J. W., *Cruciferous vegetables: cancer protective mechanisms of glucosinolate hydrolysis products and selenium*. *Integr Cancer Ther*, 2004. **3**(1): p. 5-12.
235. Zhang, Y. and Tang, L., *Discovery and development of sulforaphane as a cancer chemopreventive phytochemical*. *Acta Pharmacol Sin*, 2007. **28**(9): p. 1343-1354.
236. Hanlon, N., Coldham, N., Gielbert, A., Kuhnert, N., Sauer, M. J., King, L. J. and Ioannides, C., *Absolute bioavailability and dose-dependent pharmacokinetic behaviour of dietary doses of the chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in rat*. *Br J Nutr*, 2008. **99**(3): p. 559-564.
237. Shapiro, T. A., Fahey, J. W., Wade, K. L., Stephenson, K. K. and Talalay, P., *Chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts: metabolism and excretion in humans*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2001. **10**(5): p. 501-508.
238. Zhang, Y., Kolm, R. H., Mannervik, B. and Talalay, P., *Reversible conjugation of isothiocyanates with glutathione catalyzed by human glutathione transferases*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. **206**(2): p. 748-755.
239. Zhang, Y. and Callaway, E. C., *High cellular accumulation of sulphoraphane, a dietary anticarcinogen, is followed by rapid transporter-mediated export as a glutathione conjugate*. *Biochem J*, 2002. **364**(Pt 1): p. 301-307.
240. Hanlon, N., Coldham, N., Gielbert, A., Sauer, M. J. and Ioannides, C., *Repeated intake of broccoli does not lead to higher plasma levels of sulforaphane in human volunteers*. *Cancer Lett*, 2009. **284**(1): p. 15-20.
241. Basten, G. P., Bao, Y. and Williamson, G., *Sulforaphane and its glutathione conjugate but not sulforaphane nitrile induce UDP-glucuronosyl transferase (UGT1A1) and glutathione transferase (GSTA1) in cultured cells*. *Carcinogenesis*, 2002. **23**(8): p. 1399-1404.
242. Wang, L. I., Giovannucci, E. L., Hunter, D., Neubergh, D., Su, L. and Christiani, D. C., *Dietary intake of Cruciferous vegetables, Glutathione S-transferase (GST) polymorphisms and lung cancer risk in a Caucasian population*. *Cancer Causes Control*, 2004. **15**(10): p. 977-985.
243. Gasper, A. V., Al-Janobi, A., Smith, J. A., Bacon, J. R., Fortun, P., Atherton, C., Taylor, M. A., Hawkey, C. J., Barrett, D. A. and Mithen, R. F., *Glutathione S-transferase M1 polymorphism and metabolism of sulforaphane from standard and high-glucosinolate broccoli*. *Am J Clin Nutr*, 2005. **82**(6): p. 1283-1291.
244. Traka, M., Gasper, A. V., Melchini, A., Bacon, J. R., Needs, P. W., Frost, V., Chantry, A., Jones, A. M., Ortori, C. A., Barrett, D. A., Ball, R. Y., Mills, R. D. and

- Mithen, R. F., *Broccoli consumption interacts with GSTM1 to perturb oncogenic signalling pathways in the prostate*. PLoS One, 2008. **3**(7): p. e2568.
245. Hintze, K. J., Wald, K. A., Zeng, H., Jeffery, E. H. and Finley, J. W., *Thioredoxin reductase in human hepatoma cells is transcriptionally regulated by sulforaphane and other electrophiles via an antioxidant response element*. J. Nutr., 2003. **133**(9): p. 2721-2727.
246. Müller, M., Banning, A., Brigelius-Flohe, R. and Kipp, A., *Nrf2 target genes are induced under marginal selenium-deficiency*. Genes Nutr, 2010: ahead of print.
247. Hooper, L. V., Midtvedt, T. and Gordon, J. I., *How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine*. Annu Rev Nutr, 2002. **22**: p. 283-307.
248. Meinl, W., Sczesny, S., Brigelius-Flohe, R., Blaut, M. and Glatt, H., *Impact of gut microbiota on intestinal and hepatic levels of phase 2 xenobiotic-metabolizing enzymes in the rat*. Drug Metab Dispos, 2009. **37**(6): p. 1179-1186.
249. Wolffram, S., Arduser, F. and Scharrer, E., *In vivo intestinal absorption of selenate and selenite by rats*. J Nutr, 1985. **115**(4): p. 454-459.
250. McConnell, K. P. and Cho, G. J., *Transmucosal Movement of Selenium*. Am J Physiol, 1965. **208**: p. 1191-1195.
251. Ashton, K., Hooper, L., Harvey, L. J., Hurst, R., Casgrain, A. and Fairweather-Tait, S. J., *Methods of assessment of selenium status in humans: a systematic review*. Am J Clin Nutr, 2009. **89**(6): p. 2025S-2039S.
252. Nguyen, T., Nioi, P. and Pickett, C. B., *The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress*. J Biol Chem, 2009. **284**(20): p. 13291-13295.
253. Fourquet, S., Guerois, R., Biard, D. and Toledano, M. B., *Activation of NRF2 by nitrosative agents and H2O2 involves KEAP1 disulfide formation*. J Biol Chem, 2010. **285**(11): p. 8463-8471.
254. Rundlof, A. K. and Arner, E. S., *Regulation of the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase 1 in relation to cellular phenotype, growth, and signaling events*. Antioxid Redox Signal, 2004. **6**(1): p. 41-52.
255. Te Velde, A. A., Pronk, I., de Kort, F. and Stokkers, P. C., *Glutathione peroxidase 2 and aquaporin 8 as new markers for colonic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases: an important role for H2O2?* Eur J Gastroenterol Hepatol, 2008. **20**(6): p. 555-560.
256. Hatfield, D. L., Yoo, M. H., Carlson, B. A. and Gladyshev, V. N., *Selenoproteins that function in cancer prevention and promotion*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**(11): p. 1541-1545.
257. Irons, R., Tsuji, P. A., Carlson, B. A., Ouyang, P., Yoo, M. H., Xu, X. M., Hatfield, D. L., Gladyshev, V. N. and Davis, C. D., *Deficiency in the 15-kDa selenoprotein inhibits tumorigenicity and metastasis of colon cancer cells*. Cancer Prev Res (Phila Pa), 2010. **3**(5): p. 630-639.

258. Tham, D. M., Whitin, J. C. and Cohen, H. J., *Increased expression of extracellular glutathione peroxidase in mice with dextran sodium sulfate-induced experimental colitis*. *Pediatr Res*, 2002. **51**(5): p. 641-646.
259. Mostert, V., Hill, K. E. and Burk, R. F., *Loss of activity of the selenoenzyme thioredoxin reductase causes induction of hepatic heme oxygenase-1*. *FEBS Lett*, 2003. **541**(1-3): p. 85-88.
260. Xiao-Long, W., Chuan-Ping, Y., Kai, X. and Ou-Jv, Q., *Selenoprotein W depletion in vitro might indicate that its main function is not as an antioxidative enzyme*. *Biochemistry (Mosc)*, 2010. **75**(2): p. 201-207.
261. Florian, S., Krehl, S., Loewinger, M., Kipp, A., Banning, A., Esworthy, R. S., Chu, F. F. and Brigelius-Flohe, R., *Loss of GPx2 increases apoptosis and GPx1 expression in the intestine of mice*. *FRBM*, 2010. **submitted**.
262. Tang, L. and Zhang, Y., *Mitochondria are the primary target in isothiocyanate-induced apoptosis in human bladder cancer cells*. *Mol Cancer Ther*, 2005. **4**(8): p. 1250-1259.
263. Shankar, S., Ganapathy, S. and Srivastava, R. K., *Sulforaphane enhances the therapeutic potential of TRAIL in prostate cancer orthotopic model through regulation of apoptosis, metastasis, and angiogenesis*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(21): p. 6855-6866.
264. Rudolf, E., Andelova, H. and Cervinka, M., *Activation of several concurrent proapoptotic pathways by sulforaphane in human colon cancer cells SW620*. *Food Chem Toxicol*, 2009. **47**(9): p. 2366-2373.
265. Gouaze, V., Andrieu-Abadie, N., Cuvillier, O., Malagarie-Cazenave, S., Frisach, M. F., Mirault, M. E. and Levade, T., *Glutathione peroxidase-1 protects from CD95-induced apoptosis*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(45): p. 42867-42874.
266. Fischer, J. L., Mihelc, E. M., Pollok, K. E. and Smith, M. L., *Chemotherapeutic selectivity conferred by selenium: a role for p53-dependent DNA repair*. *Mol Cancer Ther*, 2007. **6**(1): p. 355-361.
267. Goel, A., Fuerst, F., Hotchkiss, E. and Boland, C. R., *Selenomethionine induces p53 mediated cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells*. *Cancer Biol Ther*, 2006. **5**(5): p. 529-535.
268. Yang, Y., Huang, F., Ren, Y., Xing, L., Wu, Y., Li, Z., Pan, H. and Xu, C., *The anticancer effects of sodium selenite and selenomethionine on human colorectal carcinoma cell lines in nude mice*. *Oncol Res*, 2009. **18**(1): p. 1-8.
269. Stewart, M. S., Spallholz, J. E., Neldner, K. H. and Pence, B. C., *Selenium compounds have disparate abilities to impose oxidative stress and induce apoptosis*. *Free Radic Biol Med*, 1999. **26**(1-2): p. 42-48.
270. Gasparian, A. V., Yao, Y. J., Lu, J., Yemelyanov, A. Y., Lyakh, L. A., Slaga, T. J. and Budunova, I. V., *Selenium compounds inhibit I kappa B kinase (IKK) and nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) in prostate cancer cells*. *Mol Cancer Ther*, 2002. **1**(12): p. 1079-1087.

271. Yan, W. and Chen, X., *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.
272. Bensaad, K. and Vousden, K. H., *Savior and slayer: the two faces of p53*. Nat Med, 2005. **11**(12): p. 1278-1279.
273. Bhattacharyya, S., Dudeja, P. K. and Tobacman, J. K., *ROS, Hsp27, and IKKbeta mediate dextran sodium sulfate (DSS) activation of IkappaBa, NFkappaB, and IL-8*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(5): p. 673-683.
274. Zamamiri-Davis, F., Lu, Y., Thompson, J. T., Prabhu, K. S., Reddy, P. V., Sordillo, L. M. and Reddy, C. C., *Nuclear factor-kappaB mediates over-expression of cyclooxygenase-2 during activation of RAW 264.7 macrophages in selenium deficiency*. Free Radic Biol Med, 2002. **32**(9): p. 890-897.
275. Vunta, H., Belda, B. J., Arner, R. J., Channa Reddy, C., Vanden Heuvel, J. P. and Sandeep Prabhu, K., *Selenium attenuates pro-inflammatory gene expression in macrophages*. Mol Nutr Food Res, 2008. **52**(11): p. 1316-1323.
276. Zhang, F., Yu, W., Hargrove, J. L., Greenspan, P., Dean, R. G., Taylor, E. W. and Hartle, D. K., *Inhibition of TNF-alpha induced ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression by selenium*. Atherosclerosis, 2002. **161**(2): p. 381-386.
277. Broome, C. S., McArdle, F., Kyle, J. A., Andrews, F., Lowe, N. M., Hart, C. A., Arthur, J. R. and Jackson, M. J., *An increase in selenium intake improves immune function and poliovirus handling in adults with marginal selenium status*. Am J Clin Nutr, 2004. **80**(1): p. 154-162.
278. Angstwurm, M. W., Engelmann, L., Zimmermann, T., Lehmann, C., Spes, C. H., Abel, P., Strauss, R., Meier-Hellmann, A., Insel, R., Radke, J., Schuttler, J. and Gartner, R., *Selenium in Intensive Care (SIC): results of a prospective randomized, placebo-controlled, multiple-center study in patients with severe systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock*. Crit Care Med, 2007. **35**(1): p. 118-126.
279. Sheridan, P. A., Zhong, N., Carlson, B. A., Perella, C. M., Hatfield, D. L. and Beck, M. A., *Decreased selenoprotein expression alters the immune response during influenza virus infection in mice*. J Nutr, 2007. **137**(6): p. 1466-1471.
280. Xu, C., Shen, G., Chen, C., Gelinas, C. and Kong, A. N., *Suppression of NF-kappaB and NF-kappaB-regulated gene expression by sulforaphane and PEITC through IkappaBalpha, IKK pathway in human prostate cancer PC-3 cells*. Oncogene, 2005. **24**(28): p. 4486-4495.
281. Li, W., Khor, T. O., Xu, C., Shen, G., Jeong, W. S., Yu, S. and Kong, A. N., *Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NFkappaB-inflammatory response and elicits apoptosis*. Biochem Pharmacol, 2008. **76**(11): p. 1485-1489.
282. Schwab, M., Reynders, V., Loitsch, S., Steinhilber, D., Schroder, O. and Stein, J., *The dietary histone deacetylase inhibitor sulforaphane induces human beta-defensin-2 in intestinal epithelial cells*. Immunology, 2008. **125**(2): p. 241-251.

283. Murata, M., Yamashita, N., Inoue, S. and Kawanishi, S., *Mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic allyl isothiocyanate*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(5): p. 797-805.
284. Zhang, Y., Tang, L. and Gonzalez, V., *Selected isothiocyanates rapidly induce growth inhibition of cancer cells*. Mol Cancer Ther, 2003. **2**(10): p. 1045-1052.
285. Paolini, M., Perocco, P., Canistro, D., Valgimigli, L., Pedulli, G. F., Iori, R., Croce, C. D., Cantelli-Forti, G., Legator, M. S. and Abdel-Rahman, S. Z., *Induction of cytochrome P450, generation of oxidative stress and in vitro cell-transforming and DNA-damaging activities by glucoraphanin, the bioprecursor of the chemopreventive agent sulforaphane found in broccoli*. Carcinogenesis, 2004. **25**(1): p. 61-67.
286. Hanlon, N., Coldham, N., Sauer, M. J. and Ioannides, C., *Modulation of rat pulmonary carcinogen-metabolising enzyme systems by the isothiocyanates erucin and sulforaphane*. Chem Biol Interact, 2009. **177**(2): p. 115-120.
287. Barcelo, S., Gardiner, J. M., Gescher, A. and Chipman, J. K., *CYP2E1-mediated mechanism of anti-genotoxicity of the broccoli constituent sulforaphane*. Carcinogenesis, 1996. **17**(2): p. 277-282.
288. Conaway, C. C., Jiao, D. and Chung, F. L., *Inhibition of rat liver cytochrome P450 isozymes by isothiocyanates and their conjugates: a structure-activity relationship study*. Carcinogenesis, 1996. **17**(11): p. 2423-2427.
289. Purdom-Dickinson, S. E., Sheveleva, E. V., Sun, H. and Chen, Q. M., *Translational control of nrf2 protein in activation of antioxidant response by oxidants*. Mol Pharmacol, 2007. **72**(4): p. 1074-1081.
290. Finley, J. W., *Bioavailability of selenium from foods*. Nutr Rev, 2006. **64**(3): p. 146-151.
291. Reddy, B. S., Upadhyaya, P., Simi, B. and Rao, C. V., *Evaluation of organoselenium compounds for potential chemopreventive properties in colon carcinogenesis*. Anticancer Res, 1994. **14**(6B): p. 2509-2514.
292. Ghosh, S., Das, R. K., Sengupta, A. and Bhattacharya, S., *Inhibition of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in rat by diphenylmethyl selenocyanate through downregulation of COX-2 and modulation of glutathione-S-transferase and lipid peroxidation*. Biol Trace Elem Res, 2005. **105**(1-3): p. 171-185.
293. Steinbrenner, H. and Sies, H., *Protection against reactive oxygen species by selenoproteins*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**(11): p. 1478-1485.
294. Fiala, E. S., Kulakis, C., Christiansen, G. and Weisburger, J. H., *Inhibition of the metabolism of the colon carcinogen, azoxymethane, by pyrazole*. Cancer Res, 1978. **38**(12): p. 4515-4521.
295. Sohn, O. S., Fiala, E. S., Requeijo, S. P., Weisburger, J. H. and Gonzalez, F. J., *Differential effects of CYP2E1 status on the metabolic activation of the colon carcinogens azoxymethane and methylazoxymethanol*. Cancer Res, 2001. **61**(23): p. 8435-8440.
296. Zordoky, B. N. and El-Kadi, A. O., *Role of NF-kappaB in the regulation of cytochrome P450 enzymes*. Curr Drug Metab, 2009. **10**(2): p. 164-178.

297. Kennedy, S. W. and Jones, S. P., *Simultaneous measurement of cytochrome P4501A catalytic activity and total protein concentration with a fluorescence plate reader*. Anal Biochem, 1994. **222**(1): p. 217-223.
298. Swenberg, J. A., Cooper, H. K., Bucheler, J. and Kleihues, P., *1,2-Dimethylhydrazine-induced methylation of DNA bases in various rat organs and the effect of pretreatment with disulfiram*. Cancer Res, 1979. **39**(2 Pt 1): p. 465-467.
299. Fiala, E. S., Joseph, C., Sohn, O. S., el-Bayoumy, K. and Reddy, B. S., *Mechanism of benzylselenocyanate inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats*. Cancer Res, 1991. **51**(11): p. 2826-2830.
300. Rao, C. V., Rivenson, A., Katiwalla, M., Kelloff, G. J. and Reddy, B. S., *Chemopreventive effect of oltipraz during different stages of experimental colon carcinogenesis induced by azoxymethane in male F344 rats*. Cancer Res, 1993. **53**(11): p. 2502-2506.
301. Bull, A. W., Burd, A. D. and Nigro, N. D., *Effect of inhibitors of tumorigenesis on the formation of O6-methylguanine in the colon of 1,2-dimethylhydrazine-treated rats*. Cancer Res, 1981. **41**(12 Pt 1): p. 4938-4941.
302. Tanaka, T., Kawabata, K., Kakumoto, M., Makita, H., Hara, A., Mori, H., Satoh, K., Murakami, A., Kuki, W., Takahashi, Y., Yonei, H., Koshimizu, K. and Ohigashi, H., *Citrus auraptene inhibits chemically induced colonic aberrant crypt foci in male F344 rats*. Carcinogenesis, 1997. **18**(11): p. 2155-2161.
303. Kassie, F., Uhl, M., Rabot, S., Grasl-Kraupp, B., Verkerk, R., Kundi, M., Chabircovsky, M., Schulte-Hermann, R. and Knasmüller, S., *Chemoprevention of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)-induced colonic and hepatic preneoplastic lesions in the F344 rat by cruciferous vegetables administered simultaneously with the carcinogen*. Carcinogenesis, 2003. **24**(2): p. 255-261.
304. Nakajima, M., Yoshida, R., Shimada, N., Yamazaki, H. and Yokoi, T., *Inhibition and inactivation of human cytochrome P450 isoforms by phenethyl isothiocyanate*. Drug Metab Dispos, 2001. **29**(8): p. 1110-1113.
305. Myzak, M. C. and Dashwood, R. H., *Chemoprotection by sulforaphane: keep one eye beyond Keap1*. Cancer Lett, 2006. **233**(2): p. 208-218.
306. Dashwood, R. H. and Ho, E., *Dietary histone deacetylase inhibitors: from cells to mice to man*. Semin Cancer Biol, 2007. **17**(5): p. 363-369.
307. Khor, T. O., Huang, M. T., Prawan, A., Liu, Y., Hao, X., Yu, S., Cheung, W. K., Chan, J. Y., Reddy, B. S., Yang, C. S. and Kong, A. N., *Increased susceptibility of Nrf2 knockout mice to colitis-associated colorectal cancer*. Cancer Prev Res (Phila Pa), 2008. **1**(3): p. 187-191.
308. Shen, G., Khor, T. O., Hu, R., Yu, S., Nair, S., Ho, C. T., Reddy, B. S., Huang, M. T., Newmark, H. L. and Kong, A. N., *Chemoprevention of familial adenomatous polyposis by natural dietary compounds sulforaphane and dibenzoylmethane alone and in combination in ApcMin/+ mouse*. Cancer Res, 2007. **67**(20): p. 9937-9944.

309. Ilyas, M., Straub, J., Tomlinson, I. P. and Bodmer, W. F., *Genetic pathways in colorectal and other cancers*. Eur J Cancer, 1999. **35**(3): p. 335-351.

Danksagung

Vielen Dank an alle, die mit ihrer Hilfe und Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke zunächst Frau Prof. Regina Brigelius-Flohé für die Ermöglichung und Förderung dieser Doktorarbeit, für die interessante Themenstellung sowie die wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Dr. R. Iori für die Herstellung von Glucoraphanin, sowie bei Prof. L. Wessjohann für die Synthese von Sulforaphan.

Für die gute Zusammenarbeit und gemeinsame Verwirklichung des Tierversuches danke ich im Besonderen Susanne Krehl. Simone Florian bin ich für Ihre vielen aufschlussreichen Anregungen, ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft, viele motivierenden Gespräche, sowie das Korrekturlesen der Arbeit sehr dankbar. Ebenso möchte ich Antje Banning und Dirk Kluth nicht nur für das Korrekturlesen und Ihre Hinweise danken. Auch Doris Lippmann gebührt für ihre zahlreichen Ratschläge, ihre immerwährende gute Laune und aufmunternden Worte mein Dank. Michael Haack danke ich für zahlreiche Diskussionen und die moralische Unterstützung.

Für eine vielfältige praktische Unterstützung und das ständig gute Arbeitsklima möchte ich mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Kollegen der Abteilung Biochemie der Mikronährstoffe ganz herzlich bedanken. Besonders Stefanie Deubel war stets für jegliche - auch lange - Fragen offen und sorgte immer für erfolgreiche OP's, gute Laune und neue Ideen. Auch Jörg-Uwe Bittner und Elvira Krohn danke ich für die tatkräftige Hilfe. Elke Thom und allen Mitarbeitern des MRL sei für die beständige Hilfe mit all den Mäusen gedankt. Insbesondere Swetlana König und Astrid Wagner-Hopf standen uns täglich sehr hilfreich zur Seite, herzlichen Dank dafür. Elisabeth Meyer danke ich für ihre tolle Arbeit und Hilfe mit der Histologie und Immunhistochemie.

Unendlich dankbar bin ich Bernhard Schmidt. Seine unaufhörliche Unterstützung gab mir immer Halt und Motivation. Er und unsere Familien haben stets an mich geglaubt und mich positiv beeinflusst, sodass eine Realisierung der Arbeit und die Bewältigung manch schwerer Momente erst möglich wurden.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ausschließlich die aufgeführten Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Maria Löwinger

Potsdam, 31. August 2010