

Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke
Abteilung Biochemie der Mikronährstoffe

Die Glutathionperoxidase 2
—
**Physiologische Funktion und Rolle in der
Azoxymethan-induzierten Colonkanzerogenese**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin „Biochemie der Ernährung“

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von

Mike-Freya Müller

Potsdam, den 02.04.2013

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/2013/6695/>
URN [urn:nbn:de:kobv:517-opus-66955](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-66955)
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-66955>

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Selen als essenzieller Mikronährstoff.....	1
1.1.1 Biosynthese von Selenoproteinen.....	1
1.1.2 Regulation der Selenoproteinbiosynthese.....	2
1.1.3 Selenoproteine.....	3
1.1.4 Glutathionperoxidasen.....	4
1.1.5 Glutathionperoxidase 2.....	5
1.2 Das Darmepithel.....	7
1.2.1 Morphologie und Homöostase.....	7
1.2.2 Apoptose.....	8
1.2.3 Colorektale Kanzerogenese.....	10
1.3 Selen und Krebs.....	11
1.4 Ziele der Arbeit.....	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Tierversuche.....	17
2.1.1 Genotypisierung.....	17
2.1.2 Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung.....	18
2.1.3 Tumoranalyse.....	19
2.1.4 Fraktionierte Isolation von Darmepithelzellen.....	20
2.1.5 <i>Ex vivo</i> -Kultur von Darmabschnitten.....	22
2.2 Assays.....	22
2.2.1 Caspase 3/7-Aktivität.....	22
2.2.2 Tnf α -Bestimmung.....	23
2.2.3 PGE ₂ -Metabolite.....	23
2.2.4 DHR-Assay.....	24
2.2.5 <i>Comet</i> -Assay.....	25
2.3 Proteinanalytik.....	25
2.3.1 Herstellung von Organlysaten.....	25
2.3.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	26
2.3.3 SDS-PAGE und Western Blot.....	26
2.3.4 Gesamt-GPx-Aktivität.....	28
2.4 Nukleinsäureanalytik.....	28

2.4.1	RNA-Isolation aus Darmepithelzellfraktionen.....	28
2.4.2	Reverse Transkription (RT-PCR).....	29
2.4.3	PCR-Array.....	30
2.4.4	PCR und quantitative <i>real time</i> PCR (qPCR).....	30
2.5	Histochemie und Immunhistochemie.....	32
2.5.1	Probenaufarbeitung	32
2.5.2	Immunhistochemische Färbungen.....	33
2.5.3	Hämatoxylin- und Eosinfärbung.....	34
2.5.4	Färbung von Mucinen	35
2.5.5	Auswertung immunhistochemischer Färbungen und Zählung von Apoptosen und Mitosen	35
2.6	Selenmessung.....	36
2.7	Statistische Auswertung	37
3	Ergebnisse.....	38
3.1	Selenstatus und Selenoproteinexpression	38
3.1.1	Biomarker für den Selenstatus.....	38
3.1.2	Gradient der GPx2-Expression in der Colonkrypte und Abhängigkeit vom Selenstatus	40
3.1.3	Erhöhte Proteinexpression von GPx1 und Sep15 im GPx2 KO.....	41
3.2	Erhöhte Apoptose und Sensitivität gegenüber oxidativem Stress im Darmepithel von GPx2 KO-Tieren.....	42
3.2.1	Oxidativer Stress und DNA-Schädigung	42
3.2.2	Caspase-abhängige Apoptose.....	43
3.3	Aktivierung stress-responsiver Signalwege im Darmepithel von GPx2 KO-Mäusen	44
3.3.1	Beeinflusste Signalwege im <i>PCR-Array</i>	44
3.3.2	Gesteigerte Tnf α -Expression im Darm von GPx2 KO-Mäusen.....	45
3.3.3	Hinweise auf ER-Stress in Kryptengrundepithelzellen von GPx2 KO-Mäusen	47
3.4	Rolle von Selen und GPx2 in der AOM-induzierten Colonkanzerogenese	50
3.4.1	Gewichtsverläufe	50
3.4.2	Tendenziell höhere Milzgewichte nach AOM-Behandlung und im GPx2 KO.....	51
3.4.3	Einfluss von GPx2 und Selen auf die Entstehung von ACF, MDF und Adenomen.....	51
3.4.4	Größere Tumore in GPx2 KO-Mäusen der +Se-Gruppe	54
3.4.5	Aktive Entzündung im Colon von selenarmen GPx2 KO-Tieren nach AOM-Behandlung	54
3.4.6	Erhöhte Expression von GPx2 und β -Catenin in MDF.....	55
3.5	Kurzzeitversuch zur Untersuchung der akuten AOM-Effekte.....	58

3.5.1	Mehr AOM-induzierte Apoptosen in der Kryptenmitte und basale Apoptosen im Kryptengrund des distalen Colons im GPx2 KO	58
3.5.2	Mehr proliferierende Zellen im GPx2 KO	60
3.5.3	Cytokinlevel im Plasma	62
4	Diskussion	64
4.1	Selenstatus	64
4.2	Gesteigerte Expression anderer Selenoproteine im GPx2 KO	65
4.3	Physiologische Rolle von GPx2 und Selen im Darmepithel	67
4.3.1	GPx2 schützt vor Apoptosen und vor oxidativen Schäden im Selenmangel	67
4.3.2	Latente Entzündung in GPx2 KO-Mäusen und aktive Entzündung nach AOM-Behandlung	72
4.3.3	Aktivierung stress-responsiver Signalwege im GPx2 KO	76
4.3.4	Seleneffekte im WT	79
4.4	AOM-induzierte Colonkanzerogenese	80
4.4.1	Erhöhte Expression von GPx2 und β -Catenin in MDF	80
4.4.2	Förderung der AOM-induzierten Tumorigenese durch GPx2, aber größere Tumore im GPx2 KO +Se	82
4.4.3	Einfluss des Selenstatus im WT	89
4.5	Fazit	91
4.6	Ausblick	92
5	Zusammenfassung	94
6	Literaturverzeichnis	97
7	Danksagung	116
8	Erklärung	117

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1–1: Das Colonepithel	7
Abb. 1–2: Adenom-Karzinom-Sequenz der Colonkanzerogenese	11
Abb. 2–1: Aufbau der Tierversuche	18
Abb. 2–2: Verifizierung der Epithelzellfraktionierung	21
Abb. 2–3: Schematische Darstellung des gekoppelten optischen Tests zur Bestimmung der Gesamt-GPx-Aktivität.....	28
Abb. 3–1: Selenstatus-Biomarker	39
Abb. 3–2: Selenabhängigkeit der Sepw1 mRNA-Expression	40
Abb. 3–3: GPx2-Immunfärbung des Colons in Abhängigkeit vom Selenstatus.....	40
Abb. 3–4: GPx1-Immunfärbung des Colons in Abhängigkeit vom Selenstatus.....	41
Abb. 3–5: Sep15-Proteinexpression im Kryptengrund des Colons.....	42
Abb. 3–6: Suszeptibilität für HPODE.....	43
Abb. 3–7: Basale DNA-Schäden.....	43
Abb. 3–8: Caspase 3/7-Aktivität.....	44
Abb. 3–9: „ <i>Mouse Apoptosis</i> “ PCR-Array	44
Abb. 3–10: Tnfa mRNA-Expression in Epithelzellfraktionen.....	45
Abb. 3–11: Tnfa in Überständen aus der <i>ex vivo</i> -Kultur des Darms.....	46
Abb. 3–12: Immunhistochemische Detektion von Makrophagen im Colon	47
Abb. 3–13: mRNA-Expression von Gadd153 und Gadd34 in Epithelzellen	48
Abb. 3–14: ER-Stress-Marker im Duodenum	49
Abb. 3–15: Ser51-Phosphorylierung von eIF2 α im Colon	49
Abb. 3–16: Gewichtsverläufe im AOM-Modell	50
Abb. 3–17: Milzgewichte bei der Tötung im Langzeitversuch.....	51
Abb. 3–18: AOM-induzierte ACF, MDF und Tumore im Colonkanzerogenese-Model	52
Abb. 3–19: Tumordurchmesser.....	54
Abb. 3–20: Entzündliche Läsionen in selenarmen GPx2 KO-Mäusen	55
Abb. 3–21: Charakterisierung der GPx2- und β -Catenin-Expression in MDF	56
Abb. 3–22: Repräsentative Aufnahmen der PAS/AB-, β -Catenin-, GPx2- und Ki-67-Färbung ...	57
Abb. 3–23: Aufteilung in Kryptenviertel und Apoptosen im Colon	58
Abb. 3–24: AOM-induzierte Apoptosen im Colon 8 h nach AOM-Injektion	59
Abb. 3–25: Nukleäre Akkumulation von p53.....	60
Abb. 3–26: Mitoserate	61
Abb. 3–27: Länge der PCNA-positiven Zone und Gesamtkryptenlänge im Colon	62
Abb. 3–28: Tnfa und PGE ₂ -Metabolite im Plasma	63
Abb. 4–1: Redox-Homöostase	69
Abb. 4–2: Zelluläre Reaktionen in Abhängigkeit vom Redoxstatus	71
Abb. 4–3: UPR und ISR	77
Abb. 4–4: Einfluss von GPx2 auf Apoptose, Entzündung und ISR / UPR.....	91
Abb. 4–5: Rolle von GPx2 in verschiedenen Phasen der Colonkanzerogenese.....	92

Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1: Plasmaselengehalt und Inzidenz von colorektaler Kanzerogenese	14
Tab. 2-1: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.....	26
Tab. 2-2: Temperaturprogramm von PCRs	30
Tab. 2-3: Verwendete Oligonukleotide.....	31
Tab. 2-4: Dehydrierung von Proben zur Einbettung in Paraffin	33
Tab. 2-5: Deparaffinierung und Rehydrierung von Proben für Färbungen und Dehydrierung zur Einbettung	33
Tab. 2-6: Primär- und Sekundäntikörper für immunhistochemische Färbungen	34
Tab. 3-1: Verifizierung der im PCR-Array gefundenen Gene durch <i>real time</i> qPCR.....	45
Tab. 3-2: Tumore im Colon AOM-behandelter Tiere	53

Abkürzungsverzeichnis

3'UTR	3' untranslatierte Region
ACF	engl.: <i>aberrant crypt foci</i>
ANOVA	Varianzanalyse (engl.: <i>analysis of variance</i>)
AOM	Azoxymethan
AP-1	Aktivatorprotein-1
APC	engl.: <i>adenomatous polyposis coli</i>
Atf4/5/6	Aktivierender Transkriptionsfaktor 4/5/6
Bcl2	engl.: <i>B cell leukemia/lymphoma 2</i>
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i>)
cDNA	engl.: <i>complementary DNA</i>
CHOP/ Chop	engl.: <i>CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein</i>
COX2/ Cox2	Cyclooxygenase 2
DAN	2,3-Diaminonaphtalen
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHR	Dihydrorhodamin 123
DKO	<i>Doppelknockout</i>
DMH	Dimethylhydrazin
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF4a3	eukaryotischer Initiationsfaktor 4a3
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERO1	engl.: <i>ER oxidoreductin 1</i>
ERSE	ER-Stress responsives Element
Gadd 34 / 153	engl.: <i>growth arrest and DNA-damage-inducible 34/ 153</i>
GCN2	engl.: <i>general control non-repressed 2</i>
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GRP78 / Grp78	engl.: <i>glucose related protein 78</i>
Grx	Glutaredoxin
GSH / GSSG	Glutathion / Glutathiondisulfid
H/E	Hämatoxylin / Eosin
HBSS	engl.: <i>Hanks balanced salt solution</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hOGG1	8-Hydroxyguanin-DNA-Glycosylase
HPODE	13-Hydroperoxy-Linolsäure
HRI	engl.: <i>heme regulated inhibitor</i>
IRE1	engl.: <i>inositol-requiring enzyme</i>
ISR	engl.: <i>integrated stress response</i>
JNK	engl.: <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KD	engl.: <i>knockdown</i>
KO	engl.: <i>knockout</i>
LOH	engl.: <i>loss of heterozygosity</i>
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase
mcm ⁵ U(m)	Methylcarboxymethyl-5'-Uridin-(2'-O-Methylribose)
MDF	engl.: <i>mucin depleted foci</i>
mRNA	engl.: <i>messenger RNA</i>
MW	Mittelwert

NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF κ B	nukleärer Faktor κ B
NMD	engl.: <i>nonsense-mediated decay</i>
Nrf2	engl.: <i>NF-E2 related factor 2</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS / AB	Periodsäure-Schiff-Reaktion / Alcianblau
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PCNA	engl.: <i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PERK	engl.: <i>PKR like ER kinase</i>
PGE ₂	Prostaglandin E2
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKR	engl.: <i>protein kinase activated by dsRNA</i>
PTEN	engl.: <i>phosphatase and tensin homolog</i>
RIN	RNA-Integritätsindex
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RS	reaktive Spezies
RT	Raumtemperatur
SBP2	SECIS-bindendes Protein 2
SD	Standardabweichung (engl.: <i>standard deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodiumdodecylsulfate</i>)
SECIS	engl.: <i>selenocysteine insertion sequence</i>
SeCys	Selenocystein
SeMet	Selenomethionin
SOD	Superoxiddismutase
SPS2	Selenophosphatsynthetase 2
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNFR1/2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1/2
TNF α / Tnf α	Tumornekrosefaktor α
TRAF2	engl.: <i>TNFR associated factor 2</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxinreduktase
(T)TBS	engl.: <i>(Tween)-TRIS-buffered saline</i>
UPR(E)	engl.: <i>unfolded protein response (element)</i>
WHO	engl.: <i>World Health Organisation</i>
WT	Wildtyp
XBP1/ Xbp1	engl.: <i>X-box binding protein 1</i>
λ_{Em}	Emissionswellenlänge
λ_{Ex}	Exzitationswellenlänge

1 Einleitung

1.1 Selen als essenzieller Mikronährstoff

Selen ist ein Spurenelement aus der Gruppe der Chalkogene, dessen Essenzialität für Säuger im Jahr 1957 erstmals beschrieben wurde [1]. Im Erdboden liegt Selen in Form anorganischer Selenverbindungen vor, welche von Pflanzen aufgenommen und zur Synthese organischer Selenverbindungen verwendet werden. Der Selengehalt der Böden, welcher regional sehr unterschiedlich sein kann, bestimmt somit den Selengehalt der Nahrung [2].

Die Referenzwerte für die Selenaufnahme in der menschlichen Ernährung variieren, je nach Land und ausgebender Institution, stark. So wird in den DACH-Referenzwerten der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) ein Schätzwert für die tägliche Zufuhr von 30-70 µg/ Tag [3] und vom amerikanischen „*Food and Nutrition Board*“ von 55 µg/ Tag [4] angegeben, während die „*World Health Organisation*“ (WHO) eine deutlich geringere Aufnahme von 26 µg/ Tag (Frauen) bzw. 34 µg/ Tag (Männer) empfiehlt [5]. Diese Differenzen ergeben sich aus dem Mangel eines allgemeinen Konsenses zur Definition des optimalen Selenstatus [6]. Legt man zur Definition eines adäquaten Selenstatus die Plasmaselenkonzentration fest, welche eine optimale Plasma-Glutathionperoxidase-Aktivität gewährleistet, so scheint in Europa eine marginale Selen-defizienz vorzuliegen [6].

Akuter Selenmangel kommt in bestimmten Gegenden Chinas und Osteuropas vor und ist mit Krankheiten wie der Keshan-Krankheit, einer Kardiomyopathie und der Kashin-Beck-Krankheit, einer Osteoarthropathie, assoziiert [2]. Ein moderater Selenmangel ist in epidemiologischen Studien mit einer allgemein erhöhten Mortalitätsrate, einer Schwächung des Immunsystems sowie mit kognitiven Störungen assoziiert und könnte sich zudem negativ auf die Pathogenese bestimmter Virusinfektionen und Autoimmunerkrankungen sowie einiger Krebsarten auswirken [7]. Die Konzentrationsspanne zwischen Defizienz und Toxizität ist bei Selen relativ klein, als Expositionsobergrenze wird ein „*No observed adverse effect level*“ (NOAEL) von 400 µg/ Tag angegeben [2].

Die Essenzialität des Mikronährstoffes Selen beruht vor allem auf seiner Inkorporation in Selenoproteine in Form der Aminosäure Selenocystein [8]. Des Weiteren übt Selen als Cofaktor in Selen-bindenden Proteinen biologische Funktionen aus und kann unspezifisch in Form von Selenomethionin in Proteine eingebaut werden [8].

1.1.1 Biosynthese von Selenoproteinen

In der mRNA von Selenoproteinen codiert das normalerweise als Stoppcodon gelesene Basentriplett „UGA“ für die 21. proteinogene Aminosäure Selenocystein (SeCys) [9]. Der Einbau von SeCys, anstelle eines Translationsstopps am *UGA*-Codon der mRNA,

wird durch das Vorhandensein einer „*selenocysteine insertion sequence*“ (SECIS) genannten Struktur in der 3' *untranslatierten Region* (3'UTR) eukaryotischer Selenoprotein messenger RNA (mRNA) bestimmt, welche eine charakteristische Haarnadel-Sekundärstruktur bildet [9, 10]. Ausgangsstoff für die Synthese von SeCys ist Selenophosphat, das durch Selenophosphatsynthetase 2 (SPS2) aus Selenid synthetisiert wird. Die SeCys-Synthese erfolgt an der tRNA durch SeCys-Synthase, indem Selen von Selenophosphat unter Abspaltung von Pyrophosphat auf eine Phosphoseryl-tRNA^{Ser/Sec} übertragen wird [11].

Das SECIS-bindende Protein 2 (SBP2) bindet an das Ribosom sowie an das SECIS-Element [12] und rekrutiert den tRNA^{Ser/Sec}-spezifischen, eukaryotischen Elongationsfaktor eEF^{Sec} [13], welcher die tRNA^{Ser/Sec} auf die A-Position des Ribosoms transferiert [14]. Es wird vermutet, dass das ribosomale Protein L30, ein weiterer Bestandteil des Synthesekomplexes, eine Freisetzung von SBP2 von der SECIS bewirkt und hierdurch den SeCys-Transfer von der tRNA^{Ser/Sec} in die wachsende Polypeptidkette durch eEF^{SEC} ermöglicht [15]. Ein weiteres am Synthesemechanismus beteiligtes Protein ist SECp43, welches vermutlich eine Shuttlefunktion zwischen Nukleus und Cytoplasma ausübt und durch die Methylierung der tRNA^{Ser/Sec} regulatorische Funktionen wahrnimmt [16, 17].

1.1.2 Regulation der Selenoproteinbiosynthese

Wenn die Selenversorgung limitierend ist, werden bestimmte Selenoproteine sowie bestimmte Organe bevorzugt mit Selen versorgt [18, 19] (Übersicht bei [20]). Diese so genannte Hierarchie der Selenoproteinbiosynthese im Selenmangel wird durch verschiedene posttranskriptionale Mechanismen gesteuert. Eine besondere Rolle spielt hierbei die unterschiedliche Stabilität der Selenoprotein-mRNAs im Selenmangel. Erfolgt während der Translation im Selenmangel eine ineffiziente Inkorporation von SeCys am *UGA*-Codon, so werden Selenoprotein mRNAs durch den „*Nonsense-mediated decay*“ (NMD)-Mechanismus abgebaut [21]. Die Stabilität verschiedener Selenoprotein-mRNAs ist unterschiedlich und beruht auf ihrer 3'UTR. Sie wird neben dem NDM vermutlich auch durch andere Mechanismen reguliert [22, 23]. Ein weiterer Regulationsmechanismus beruht auf der Methylierung der tRNA^{Ser/Sec} an der Um34-Position des Anticodons. Durch diese Methylierung, an welcher der Faktor SECp43 beteiligt ist [16], entsteht aus der Methylcarboxymethyl-5'-Uridin-Isoform (mcm⁵U) die Methylcarboxymethyl-5'-Uridin-2'-O-Methylribose-Isoform (mcm⁵Um) der tRNA^{Ser/Sec} [24]. Im Selenmangel ist neben der Gesamtmenge der tRNA^{Ser/Sec} auch die Synthese der mcm⁵Um-Isoform vermindert [24]. Dies hat zur Folge, dass vor allem Selenoproteine, deren Synthese von der mcm⁵Um-Isoform abhängt, im Selenmangel vermindert synthetisiert werden. In Mäusen mit einem knockout des für die tRNA^{Ser/Sec} codierenden *Trsp*-Gens wurden die betroffenen Selenoproteine durch die Wiedereinführung

eines *Trsp*-Gens mit einer Mutation an der Um34-Position identifiziert [25, 26]. In den transgenen Tieren ohne die mcm^5 Um-Isoform wurde nur noch die Untergruppe der sogenannten „*housekeeping*“-Selenoproteine synthetisiert, nicht jedoch stress-assoziierte Selenoproteine, deren Expression stark abhängig von der Selenversorgung ist [25, 26]. Die Effizienz der Translation verschiedener Selenoproteine kann noch durch weitere Faktoren moduliert werden. So beeinflusst die präferentielle Bindung von SBP2 an die SECIS bestimmter Selenoprotein-mRNAs deren Sensitivität für den NMD-Abbaumechanismus [27]. Eine gesteigerte Expression des eukaryotischen Initiationsfaktors 4a3 (eIF4a3) im Selenmangel kann zu einem Translationsarrest bestimmter Selenoproteine wie GPx1 im Selenmangel führen, indem eIF4a3 an Typ 1 SECIS Elemente bindet und die SBP2-Anlagerung blockiert [28]. Eine positive Regulation der Translation wird hingegen durch eine Bindung von Nucleolin an die SECIS bestimmter, hoch in der Hierarchie stehender Selenoproteine vermittelt [29].

1.1.3 Selenoproteine

Das humane Genom enthält 25, das Nagergenom 24 Gene, welche Selenoproteine kodieren [30]. Auch Prokaryoten besitzen Selenoproteine, nicht jedoch Pilze, Hefen und höhere Pflanzen [31]. Das Selenoproteom von Säugern umfasst die Genfamilien der Glutathionperoxidasen (GPx), Thioredoxinreduktasen (TrxR) und Deiodinasen (DIO) sowie die Selenoproteine 15-kDa Selenoprotein (Sep15), SelH, SelL, SelK, SelM, SelN, SelO, SelP, SelR, SelS, SelT, SelV, SelW und SPS2 [30].

Der Einbau von SeCys anstelle von Cystein im katalytischen Zentrum von Enzymen verleiht diesen eine höhere Reaktivität in Redox-Reaktionen, da die Selenolgruppe mit einem pK_a -Wert von etwa 5, im Gegensatz zur Thiolgruppe, bei physiologischem pH-Wert ionisiert vorliegt [32]. Anhand ihrer Domänenstruktur können die meisten Selenoproteine in zwei Gruppen eingeordnet werden. Jene mit dem SeCys nahe am C-Terminus (SelK, S, O, I, R und TrxRs) und jene mit dem SeCys in der N-terminalen Region, wo es häufig Bestandteil eines CxxU-Redox Motivs ist, wie SelH, M, T, V, W, Sep15, SPS2, DIO1-3 und die Glutathionperoxidasen [20].

Vorwiegend durch den Einbau in Selenoproteine erklärt sich die Erfordernis von Selen für Prozesse wie Nukleinsäurebiosynthese, Schilddrüsenhormonmetabolismus und Spermienreifung. Des Weiteren spielen Selenoproteine eine wichtige Rolle in der Redox-Homöostase des Organismus, bei der Proteinfaltung und bei Selentransport und -verteilung sowie in der Synthese der Selenoproteine selbst [8].

Die Funktionen einiger Selenoproteine sind essenziell für den Säugerorganismus, was dadurch verdeutlicht wird, dass ein *knockout* des *Trsp*-Gens, der die Selenoproteinsynthese vollständig verhindert, im Mausmodell embryonal letal ist [33]. Eine embryonale

Letalität resultiert auch aus einem *knockout* der TrxR1 [34], TrxR2 [35] oder GPx4 [36] im Mausmodell.

1.1.4 Glutathionperoxidasen

Von den acht humanen Glutathionperoxidasen sind die GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 und GPx6 Selenoproteine, während GPx5, GPx7 und GPx8 Cystein im katalytischen Zentrum enthalten. Bei Nagern ist auch die GPx6 ein Nicht-Selenoprotein [30]. Alle Glutathionperoxidasen katalysieren die Reduktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und organischen Hydroperoxiden zu Wasser bzw. den entsprechenden Alkoholen, wofür sie reduziertes Glutathion (GSH) oder andere Elektronendonatoren verwenden. Deshalb wurde für die meisten Glutathionperoxidasen eine Rolle im antioxidativen System postuliert. Es wurden jedoch auch spezifische Funktionen einzelner Glutathionperoxidasen in der Redox-Regulation beschrieben [37].

Die auch als cytosolische GPx (c-GPx) bezeichnete Glutathionperoxidase 1 wird ubiquitär exprimiert und ist in Cytosol und Mitochondrien lokalisiert. Sie liegt als Tetramer vor und verwendet GSH als Elektronendonator [38, 39]. Studien mit *knockout* (KO)-Mäusen weisen darauf hin, dass der GPx1 eine wichtige Rolle in der Bekämpfung von akutem oxidativem Stress zukommt, welcher durch die Behandlung mit hohen Paraquat-Dosen ausgelöst wurde, während moderater oxidativer Stress, ausgelöst durch niedrige Paraquat-Dosen nicht durch den GPx1 KO beeinflusst wurde [40, 41]. Die ebenfalls tetramere GPx3 wird vorwiegend in der Niere synthetisiert und ins Plasma sezerniert [42, 43], kommt jedoch auch in anderen Organen vor [44]. Neben SeIP ist die auch als Plasma-GPx (p-GPx) bekannte GPx3 das Hauptselenoprotein im Plasma [45] und kann außer H_2O_2 und löslichen, organischen Hydroperoxiden in geringem Ausmaß auch Phospholipid-Hydroperoxide reduzieren [42]. Neben GSH kommen für die GPx3 auch Thioredoxin (Trx) und Glutaredoxin (Grx) als Elektronendonatoren in Betracht [46].

Die auch Phospholipid-Hydroperoxid-GPx (PH-GPx) genannte GPx4 nimmt eine Sonderstellung unter den selenabhängigen Glutathionperoxidasen ein. Als einzige SeCys-GPx liegt sie als Monomer vor und kann zusätzlich zu den schon genannten Substraten auch Phospholipid-Hydroperoxide umsetzen, wozu sie neben GSH auch andere Proteinthiole verwendet [47, 48]. Sie wird in diversen Geweben, vor allem in Testis und Gehirn [49], als cytosolische, mitochondriale und nukleäre Isoform [47, 50] exprimiert und hat vitale Funktionen, denn ihr *knockout* ist embryonal letal [36]. Somit erscheint auch ihre hohe Stellung in der Hierarchie der Selenoproteine plausibel. Ihre ursprünglich diskutierte Rolle beim Schutz von Biomembranen durch die Reduktion von Lipidhydroperoxiden ist in letzter Zeit hinter redox-regulatorische und antiapoptotische Funktionen zurückgetreten [51, 52] (diskutiert in [53, 54]). Zudem spielt GPx4 eine

wichtige Rolle als Strukturprotein in Spermien und somit in der männlichen Fertilität [55].

Wie schon für Selenoproteine im Allgemeinen beschrieben (Kap. 1.1.2), existiert auch bei den selenabhängigen Glutathionperoxidasen eine Hierarchie der Expression im Selenmangel, in welcher GPx2, gefolgt von GPx4, die höchste Position einnimmt, während GPx1 und GPx3 beide eine niedrige Position innehaben (GPx2 > GPx4 > GPx3 = GPx1) [53, 56]. Auch die Gewebeversorgung im Selenmangel ist unterschiedlich. So werden GPx1 und GPx4, wenn Selen limitierend ist, bevorzugt im Gehirn sowie in Fortpflanzungs- und endokrinen Organen exprimiert [53].

1.1.5 Glutathionperoxidase 2

Die Glutathionperoxidase 2 (GPx2) wurde zuerst 1993 von Chu und Kollegen beschrieben [57]. Sie weist eine starke Homologie mit der GPx1 auf (Sequenzhomologie der humanen Gene von 66%), katalysiert wie diese die Reduktion von H₂O₂ und löslichen, organischen Hydroperoxiden unter Verbrauch von GSH und liegt ebenfalls als Homotetramer vor [57]. Die genaue Substratspezifität der GPx2 ist nicht bekannt. Sie ähnelt der von GPx1, jedoch mit einer Präferenz für organische Hydroperoxide [56, 57]. Große Unterschiede bestehen in der Lokalisation und Regulation beider Isoformen sowie in ihrer Position in der Hierarchie der Selenoproteinexpression im Selenmangel (siehe Kap. 1.1.4). Die prominente Stellung der GPx2 in der Hierarchie der Selenoproteine könnte ein Hinweis darauf sein, dass sie wichtigere Funktionen als die GPx1 wahrnimmt [58].

Im Gegensatz zur ubiquitär vorkommenden GPx1, wird die GPx2 überwiegend in Epithelien, vor allem im gastrointestinalen Epithel und außerdem in der humanen Leber exprimiert [57, 59, 60], weshalb sie auch als gastrointestinale GPx (GI-GPx) bezeichnet wird. Ihr wird eine Barrierefunktion gegen die Absorption von Hydroperoxiden im Darm zugeschrieben [61].

Besonders hoch ist die GPx2-Expression im proliferativen Kryptengrund des Darmepithels [59, 62]. Dies ist übereinstimmend mit einer Regulation der GPx2 durch den Wnt-Signalweg [63, 64], welcher die Proliferation im intestinalen Kryptengrund fördert, und durch den Transkriptionsfaktor Δ Np63 γ [65], welcher ebenfalls spezifisch in basalen, proliferierenden Epithelzellen exprimiert wird [66]. Eine Differenzierung von embryonalen Stammzellen [67] und CaCo2-Darmkrebszellen [68] führt hingegen zu einer verminderten mRNA-Expression der GPx2. Diese spezifische Lokalisation und Regulation der GPx2 legt nahe, dass sie eine besondere Bedeutung in proliferierenden Zellen besitzt. Als weitere Hinweise hierauf werden die erhöhte GPx2-Expression in regenerierendem Darmepithel nach γ -Bestrahlung sowie die erhöhte GPx2-Expression in Wachstumsphasen im Darm junger Mäuse gewertet [69, 70].

Ein Hinweis auf protektive Funktionen der GPx2 ist ihre Regulation durch den Transkriptionsfaktor Nrf2 (engl.: *nuclear factor erythroid-derived 2-like 2*) [71], welcher eine zentrale Rolle in der Koordination der zellulären Abwehr von oxidativem Stress spielt.

In das Bild einer besonderen Bedeutung der GPx2 für proliferierende Zellen fügt sich auch ihre Hochregulation in Tumoren. Eine erhöhte GPx2-Expression im Vergleich zu normalem Gewebe wurde in colorektalen Adenomen [72], colorektalen Karzinomen [73] und in gut und mäßig differenzierten Colontumoren [62, 74] gefunden. Auch in extraintestinalen Tumoren epithelialen Ursprungs, wie Plattenepithelzellkarzinomen der Haut [75, 76], Adenokarzinomen der Lunge [77] und invasiven, duktalem Mammakarzinomen [78], wurde eine erhöhte GPx2-Expression festgestellt.

Die physiologische Funktion der GPx2 und ihre Rolle in der Kanzerogenese wurden in *knockout*-Mausmodellen sowie in Darmkrebszellen mit einem *knockdown* (KD) der GPx2 untersucht. Mäuse, in denen sowohl die GPx1, als auch die GPx2 genetisch deletiert wurden, waren durch eine erhöhte Anzahl von Apoptosen und Mitosen sowie eine massive Entzündung im Colon und Ileum gekennzeichnet, in deren Verlauf sie Colitis-assoziierte Colontumore entwickelten [69, 79]. Mäuse mit einem *knockout* der GPx2 allein (GPx2 KO), wurden im ungestressten Zustand zunächst als asymptomatisch beschrieben [70]. Sie zeichneten sich jedoch durch eine erhöhte Apoptoserate, vor allem im Kryptengrund des Darmepithels sowie durch eine erhöhte GPx1-Expression aus [80]. Ferner waren sie anfälliger für UV-induzierte Plattenepithelzellkarzinome der Haut [76] und Atemwegsentzündungen [81], was wiederum auf antiinflammatorische und auf antikanzerogene Funktionen der GPx2 hinweist. Die Anfälligkeit der GPx2 KO-Mäuse für Colitis und für die Colitis-assoziierte Colonkanzerogenese wurde im Azoxymethan (AOM) / Dextrannatriumsulfat (DSS)-Modell untersucht [82]. Im Vergleich zum WT hatten GPx2 KO-Mäuse eine schwerere DSS-induzierte Colitis eine Woche nach 7-tägiger DSS-Gabe und tendenziell mehr Tumore 12 Wochen nach AOM-Gabe. Diese Daten sind ein weiterer Beleg für eine antiinflammatorische Funktion der GPx2 und legen eine hieraus resultierende, antikanzerogene Rolle der GPx2 in der entzündungsassoziierten Colonkanzerogenese nahe. Allerdings hatten GPx2 KO-Mäuse in der selenarmen Gruppe kleinere Tumore als der WT. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die GPx2 möglicherweise auch das Tumorstadium fördern kann.

Humane HT29-Colonkarzinomzellen mit einem siRNA-vermittelten KD der GPx2 zeigten, dass die GPx2 sowohl anti- als auch prokanzerogene Funktionen haben könnte. So bildeten GPx2 KD-Zellen weniger Kolonien in Weichagar und kleinere Xenografts nach Injektion in Nacktmäuse, wiesen aber andererseits eine erhöhte Invasivität und Migrationsfähigkeit *in vitro* auf [83].

1.2 Das Darmepithel

1.2.1 Morphologie und Homöostase

Der Magen-Darm-Trakt gliedert sich in Speiseröhre, Magen, Dünndarm, Dickdarm und After. Der Dünndarm setzt sich von proximal nach distal aus dem Duodenum (Zwölffingerdarm), Jejunum und Ileum zusammen. Der Dickdarm kann in Colon und Rektum unterteilt werden [84]. Die Darmwand gliedert sich von außen nach innen in die *Tunica serosa*, *Tunica muscularis*, *Tela submucosa* und schließlich die Darm-schleimhaut *Tunica mucosa* (siehe Abb. 1–1). Die *Tunica mucosa* ist im Dünndarm durch in das Lumen vorstehende Zotten (Villi) und Einsenkungen (Krypten) charakterisiert, wohingegen im Dickdarm keine Villi existieren. Sie gliedert sich weiter auf in die *Lamina muscularis mucosae*, welche die Abgrenzung zur Submucosa bildet, die *Lamina propria mucosae*, eine Bindegewebsschicht, welche Blut- und Lymphgefäße sowie lymphatische Zellen enthält und schließlich auf der luminalen Seite die *Lamina epithelialis mucosae*, ein einschichtiges Epithel, welches somit die Grenze zu Nahrungs-brei und Mikrobiota im Darmlumen bildet [85]. Zudem enthält die Darmwand Komponenten des darmassoziierten Immunsystems, wie Peyer-Plaques im Dünndarm oder Lymphfollikel im Dickdarm und Immunzellen in der Mucosa [86].

Das Darmepithel wird alle 2-5 Tage erneuert [87]. Direkt an der Kryptenbasis, im Dünndarm zwischen den Panethzellen angeordnet, befinden sich säulenförmige Stammzellen (engl.: *crypt base columnar cells*), die durch die Expression des Stammzellmarkers Lgr5 charakterisiert sind [88]. Im Dünndarm befindet sich außerdem an Position +4 des Kryptengrunds eine Population nicht teilungsaktiver Stammzellen, welche den Marker Bmi1 exprimieren [89, 90].

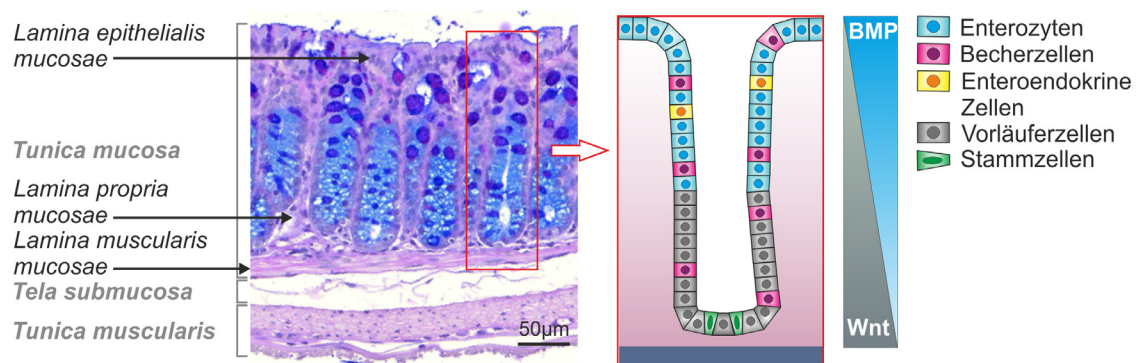


Abb. 1–1: Das Colonepithel

Abbildung modifiziert nach [91, 92]

Durch asymmetrische Teilung gehen aus den pluripotenten Stammzellen transit amplifizierende Vorläuferzellen hervor. Diese wandern die Krypte hinauf, wobei sie sich noch etwa sechs Mal teilen, schließlich in verschiedene Zelltypen der absorptiven und sekretorischen Zelllinien ausdifferenzieren und letztendlich ins Darmlumen abgestoßen

werden [93] (siehe Abb. 1–1). Einen Großteil der differenzierten Zellen stellen die Enterozyten, welche vor allem Resorptionsfunktionen wahrnehmen. Außerdem entstehen sekretorische Zelltypen, wie die mucinsezernierenden Becherzellen, hormonbildende, enteroendokrine Zellen und Bürstenzellen (engl.: *brush cells/ tuft cells*, [94]). All diese Zelltypen wandern weiter zur Krypten- bzw. Villusspitze, wo sie schließlich ins Darmlumen abgeschilfert werden [93]. Im Dünndarm existieren zudem Panethzellen, welche vor allem antimikrobielle Substanzen sezernieren und sich als einziger Zelltyp im Kryptengrund ansiedeln. Im Colon gibt es keine Panethzellen. Es wurde dort jedoch eine Unterpopulation von Becherzellen im Kryptengrund identifiziert, die eine Reihe von Panethzellmarkern exprimiert und somit einige Funktionen von Panethzellen wahrnehmen kann [95]. Beide Zelltypen spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Stammzellnische im Kryptengrund [96].

Die Stammzellnische, welche essenziell für die Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften ist, setzt sich aus einer Reihe von auto- und parakrinen Botenstoffen zusammen, die von den Epithelzellen und umgebenden Zelltypen sezerniert werden. Der wichtigste proliferationsstimulierende Faktor im Kryptengrund ist ein hoher Gehalt von Wnt-Liganden, die in einem in Richtung Kryptengrund zunehmenden Gradienten vorliegen. Die Bindung von Wnt-Liganden an *Frizzled*- und LRP-Rezeptoren bewirkt eine Freisetzung von cytosolischem β -Catenin aus dem Abbaukomplex, der aus Axin, APC (engl.: *adenomatous polyposis coli*) und GSK3 β (engl.: *glycogen synthase kinase 3 β*) besteht und führt in der Folge zu einer verstärkten Transkription von β -Catenin-Zielgenen. Ein entgegengesetzter Gradient von BMP-Proteinen (engl.: *bone morphogenic protein*) wirkt den Wnt-Signalen entgegen und fördert die Differenzierung (siehe Abb. 1–1). Eine ähnliche Rolle kommt Hedgehog-Proteinen zu, welche ihre Wirkung durch Kommunikation mit umgebenden, mesenchymalen Zellen ausüben. Notch-Signale fördern kooperativ mit dem Wnt-Signalweg die Proliferation und steuern die Ausdifferenzierung von Zellen in sekretorische oder absorptive Zelltypen [92].

Die Migration bzw. Lokalisation der einzelnen Zellen in der Krypten- bzw. Krypt-Villus-Achse wird durch Ephrin-Liganden, welche ebenfalls in Gradienten exprimiert werden, und durch verschiedene Ephrin-Rezeptoren der einzelnen Zelltypen bestimmt [97]. So legen beispielsweise die Rezeptoren EphB2 und EphB3, deren Expression in den einzelnen Zelltypen wiederum durch den Wnt-Signalweg reguliert wird, eine Lokalisation der Zellen im Kryptengrund fest [97, 98].

1.2.2 Apoptose

Für die epitheliale Homöostase ist neben einer strikten Kontrolle der Proliferations- und Differenzierungsprozesse eine kontrollierte Elimination von Zellen durch Apoptose von zentraler Bedeutung. Eine Dysregulation dieser Prozesse ist an der Pathogenese

verschiedener Erkrankungen beteiligt. Erhöhte Proliferation und verminderte Apoptose kennzeichnen die colorektale Kanzerogenese [99] (siehe Kap. 1.2.3), während ein exzessiver apoptotischer Zelltod an der Pathogenese entzündlicher Darmerkrankungen beteiligt ist [100-102].

Allgemein kann Apoptose in Darmepithelzellen durch zellintrinsische oder externe Mechanismen ausgelöst werden. Beide werden über eine Caspasen genannte Gruppe von Proteasen vermittelt, welche durch Spaltung von Procaspase-Vorstufen aktiviert werden. Initiator-Caspasen wie Caspase 8 und 9 können autokatalytisch aktiviert werden und aktivieren in der Folge weitere Caspasen durch Spaltung der Proenzyme. Am Ende der Caspasekaskade stehen Effektorcaspasen, wie Caspase 3 und 7, welche letztendlich die apoptotischen Veränderungen herbeiführen [103]. Morphologisch sind diese durch Verlust der Zellkontakte zu den Nachbarzellen, Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung, Zellschrumpfung und Abschnürung von Zellinhalt in Form sogenannter „*apoptotic bodies*“ gekennzeichnet [104].

Der intrinsische Signalweg kann durch diverse intrazelluläre Stresssignale ausgelöst werden und ist durch eine Cytochrom c-Ausschüttung aus den Mitochondrien charakterisiert, welche durch pro- und antiapoptotische Proteine der Bcl2 (engl.: *B cell leukemia/lymphoma 2*)-Familie reguliert wird [103]. Die Caspasekaskade wird in diesem Fall durch Caspase 9 ausgelöst. Der extrinsische Signalweg wird durch extrazelluläre Ligandenbindung, beispielsweise von Tumornekrosefaktor α (TNF α), an sogenannte „Todesrezeptoren“ (engl.: *death receptor*) in der Zellmembran ausgelöst, in deren Folge sich intrazellulär der Zelltod-induzierende Signalkomplex (engl.: *death-inducing signaling complex*, DISC) bildet, welcher die Caspasekaskade über Caspase 8 aktiviert [105]. Über den TNF-Rezeptor 2 und eine Aktivierung des nukleären Faktors κ B (NF κ B) können Liganden wie TNF α jedoch auch antiapoptotische, proliferationsfördernde Effekte haben [106, 107].

Im ungestressten Darm können zwei Arten von Apoptose beobachtet werden. Spontane Apoptosen, die im proliferativen Kompartiment auftreten können, sind sehr selten und dienen vermutlich der Eliminierung überschüssiger oder fehlerhafter Stammzellen [108, 109]. Da Mäuse mit einem knockout von p53, einem zentralen Regulator von Zellzyklus und Apoptose, keine Veränderungen der spontanen Apoptoserate im Darmepithel zeigen, ist dieser Prozess vermutlich p53-unabhängig [110]. Das antiapoptotische Protein Bcl2, welches im Darmepithel vor allem im Kryptengrund des Colons exprimiert wird, wirkt der spontanen Apoptose im Colon entgegen. Dies wurde durch die erhöhte spontane Apoptoserate im Colon-Kryptengrund von Bcl2 KO-Mäusen demonstriert, während im Dünndarm kein Einfluss auf die spontane Apoptose beobachtet wurde [110, 111]. Auch das physiologische Abschilfern von Zellen an der Villusspitze ist mit Apoptosemarkern assoziiert [112].

Welcher Mechanismus dem zugrunde liegt und ob die Apoptose der Zellabschilferung vorangeht, oder als Folge des Zellkontaktverlusts nach mechanischer Abschilferung der Zellen eintritt, ist zur Zeit noch strittig [102].

Stress-induzierte Apoptose im Darmepithel durch Strahlung oder genotoxische Chemikalien ist hingegen größtenteils p53-abhängig, wobei vermutlich parallel p53-unabhängige Mechanismen existieren [110]. Auch bei der Stress-induzierten Apoptose werden spezifisch die Kryptengrundzellen des Colons durch Bcl2 geschützt [108, 110, 111]. Dies wird als möglicher Grund dafür angeführt, dass Krebserkrankungen überwiegend hier und nicht im Dünndarm auftreten [111].

1.2.3 Colorektale Kanzerogenese

Darmkrebs ist die zweithäufigste Krebsart sowie auch die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache in Deutschland mit einer Neuerkrankungsrate von 30.000 (Frauen) bzw. 35.000 (Männer) im Jahr 2008. In knapp zwei Dritteln aller Fälle liegt die Tumorlokalisation im Colon, in einem Drittel im Rektum, weshalb zusammenfassend vom colorektalen Karzinom die Rede ist [113]. Etwa 20% aller colorektalen Karzinome sind hereditär bedingt, die bekanntesten Syndrome sind hier die familiäre adenomatöse Polypose (FAP) und das Lynch-Syndrom [114]. Bei einem Großteil der Erkrankungen, etwa 65 - 85%, handelt es sich um spontane colorektale Karzinome, während etwa 2% Colitis-assoziiert sind und als Folge chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen, wie *Morbus Crohn* und *Colitis Ulcerosa* auftreten [115].

Terminologisch wird die Kanzerogenese häufig in drei Stadien aufgeteilt. Während der Initiationsphase kommt es, z. B. durch genotoxische Chemikalien, zu Mutationen der DNA, die durch Zellteilung irreversibel fixiert werden. In der Promotionsphase ist die Proliferation der präneoplastischen Läsion reversibel und abhängig von extrazellulären Wachstumsfaktoren, bis es schließlich zur Progression zum malignen Tumor kommt, der sich durch autonomes, invasives Wachstum und karyotypische Instabilität auszeichnet [116, 117].

Die wichtigsten Kennzeichen, die Tumorzellen während dem mehrstufigen Kanzerogeneseprozess erwerben, sind replikative Immortalität, autonome Proliferation, Abschaltung proliferationshemmender Signalwege, Verhinderung von Zelltod, Angiogenese, Invasivität und Metastasivität. Als neue Kennzeichen der Kanzerogenese werden zudem metabolische Anpassung sowie die Umgehung einer Zerstörung durch das Immunsystem diskutiert [99].

Der Prozess, in welchem sich transformierte Darmepithelzellen durch Erwerb der oben genannten Merkmale zu malignen Tumoren entwickeln, wurde erstmals 1990 von Fearon und Vogelstein als Adenom-Karzinom-Sequenz beschrieben, welche durch den sequenziellen Verlust von Tumorsuppressorgenen durch Allelverlust und Genmutatio-

nen charakterisiert ist (Abb. 1–2) [118]. Ein zentrales frühes Ereignis ist hier eine Mutation, welche zu einer Aktivierung des Wnt-Signalweges führt und in den meisten Fällen das *APC*-Gen betrifft. Die genetische Deletion von *APC* im Mausmodell stoppte die Migration der betroffenen Zelle entlang der Kryptenachse, verhinderte ihren Verlust durch Abschilferung oder Apoptose und bewirkte eine Dysregulation von Proliferation und Differenzierung [119] (vgl. Kap. 1.2.1), so dass es in der Folge schnell zur Entstehung neoplastischer Läsionen kam [120]. Als erste sichtbare Läsionen entstehen in Folge der *APC*-Mutation dysplastische Krypten, wie dysplastische, aberrante Krypten Foci (engl.: *aberrant crypt foci*, ACF) oder mucindepletierte Foci (engl.: *mucin depleted foci*, MDF) [121]. Durch eine weitere Akkumulation von Mutationen und Heterozygotieverlusten (engl.: *loss of heterozygosity*, LOH) sowie epigenetische und andere Veränderungen der Genexpression, entwickeln sich frühes-, intermediäres- und spätes Adenom mit zunehmender Dysplastizität. Der Übergang vom späten Adenom zu einem durch invasives Wachstum gekennzeichneten Karzinom geht in der Regel mit einem Verlust des Tumorsuppressorgens *p53* einher [118]. Etwa 15 - 20% aller colorektalen Karzinome folgen nicht diesem Muster, sondern sind durch Mikrosatelliteninstabilität gekennzeichnet, welche eine Vielzahl von Mutationen hervorruft [122].

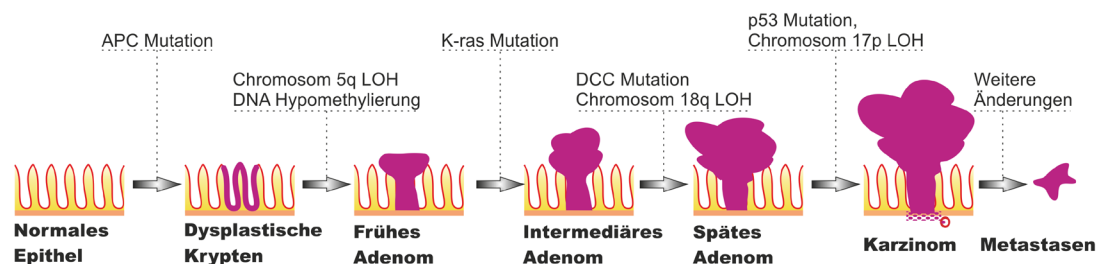


Abb. 1–2: Adenom-Karzinom-Sequenz der Colonkanzerogenese

Abbildung modifiziert nach [118, 122].

Im Mausmodell kann die sporadische Colonkanzerogenese durch mehrfache Applikation des Colonkanzerogens AOM nachgestellt werden, da sich die histopathologischen und molekularen Eigenschaften der präneoplastischen Läsionen und Tumore in beiden Prozessen stark ähneln. Allerdings sind AOM-induzierte Tumore selten invasiv und metastasieren kaum. Die Kombination von AOM mit DSS als inflammatorischem Stimulus wird häufig als Modellsystem für die colitisassoziierte Colonkanzerogenese verwendet [123].

1.3 Selen und Krebs

Während Selen bis Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts vorwiegend als prokanzerogen angesehen wurde, häuften sich in den 1970er Jahren Hinweise auf antikanzerogene Wirkungen [124-126]. Nach weiteren 40 Jahren der Forschung in diesem Feld ergibt

sich heute ein differenziertes Bild über den Einfluss von Selen auf die Krebsentstehung.

Neben einer antikanzerogenen Wirkung von Selen in Tierversuchen [124, 127-132], wurden in epidemiologischen Studien protektive Effekte von Selen auf die Entstehung von Krebs in Lunge, Blase, Colon, Rektum, Leber, Ösophagus, Schilddrüse und Prostata beobachtet [133-138] (Überblick in [7]). Da Folgestudien nicht immer konsistente Ergebnisse lieferten, wurde eine antikanzerogene Wirkung von Selen vom „*World Cancer Research Fund*“ (WCRF) für Prostatakrebs als wahrscheinlich, für Lungen-, Magen- und Colorektalen Krebs jedoch nur als begrenzt wahrscheinlich („*limited suggestive*“) bewertet [139]. Ein möglicher Grund für inkonsistente Ergebnisse der Studien sind unterschiedliche Ausgangsvoraussetzungen bezüglich Dosierung und chemischer Form des verwendeten Selen sowie bezüglich des Ausgangsselenstatus der Probanden. Dies wird klarer, wenn die generellen Prinzipien, die der antikanzerogenen Wirkung von Selen zugrunde liegen, genauer betrachtet werden.

Es werden zwei allgemeine Wirkmechanismen diskutiert, über die Selen das Krebsrisiko beeinflussen könnte: zum einen durch eine Optimierung der Selenoproteinexpression und zum anderen durch die protektive Wirkung niedrigmolekularer, methylierter Selenverbindungen, die eine deutlich höhere Selensupplementation erfordert. Eine Studie, die den Effekt verschiedener Selendosierungen und einer spezifischen Reduktion der Expression stressresponsiver Selenoproteine durch eine Mutation im *Trsp*-Gen (vgl. Kap. 1.1.1) auf die AOM-induzierte Colonkanzerogenese in Mäusen untersuchte, kam zu dem Schluss, dass sowohl Selenoproteine, als auch Selenverbindungen, protektiv wirken können [140].

C. Ip und Kollegen vertreten die These, dass die antikanzerogene Wirkung von Selen vorwiegend auf monomethylierten Selenverbindungen beruht [141, 142]. Der Schlüsselmetabolit für die antikanzerogene Wirkung ist Methylselenol, welches besonders effektiv aus organischen, methylierten Selenverbindungen wie Methylselenocystein gebildet werden kann. Die hauptsächlich in Tierversuchen und Zellkultur aufgeklärten Wirkmechanismen beruhen vor allem auf einer Inhibition der Proliferation sowie einer Förderung der Apoptose und erfordern hohe Selenkonzentrationen, *in vitro* im mikromolaren Bereich [141, 142]. Den in Zellkulturstudien beschriebenen, antiproliferativen Effekten anorganischer Selenverbindungen, wie Selenit in hoher Dosierung, liegt hingegen eine cytotoxische Wirkung zugrunde, welche auf einer ROS-Produktion bei der Verstoffwechslung beruht [142, 143].

Antiproliferative und proapoptotische Effekte sowie auch eine Induktion von Phase 2-Enzymen [144] durch Methylselenol können somit antikanzerogene Effekte bei hoher Selendosierung *in vivo* und *in vitro* erklären. Allerdings sind die Dosierungen, bei denen *in vitro* und im Tierversuch antikanzerogene Effekte beobachtet wurden, sehr

hoch, so dass eine Übertragbarkeit auf den Menschen aus toxikologischen Gründen fraglich erscheint [145]. Viele Experten raten inzwischen dazu, dass eine Selensupplementation über den Bedarf hinaus wegen möglicher adverser Effekte vermieden werden sollte [7, 145, 146].

M. Rayman vertritt in ihren Übersichtsartikeln die Ansicht, dass eine suboptimale Selenoproteinexpression die Krebsentstehung fördert, und dass somit antikanzerogene Effekte von Selen vor allem auf einer Optimierung der Selenoproteinexpression beruhen [7, 147, 148]. So zeigten sich die stärksten Effekte der Selensupplementation auf das Gesamt- und Prostatakrebsrisiko in der „*Nutritional Prevention of Cancer*“ (NPC)-Studie in dem Probandentertil mit dem geringsten Plasmaselenengehalt zum Studienbeginn, während ein hoher Selenstatus zu einer nicht-signifikant erhöhten Gesamt-Krebsinzidenz und einem signifikant erhöhten Hautkrebsrisiko führte [149, 150]. Unter diesem Gesichtspunkt erscheint es folgerichtig, dass Effekte nur in epidemiologischen Studien beobachtet werden können, in welchen Probanden mit suboptimalem Selenstatus supplementiert, bzw. mit solchen mit adäquatem Selenstatus verglichen werden [7]. Bei einer Definition durch die Optimierung der Plasma-GPx-Aktivität (GPx3) (Kap. 1.1.4) liegt ein adäquater Selenstatus bei Plasmaselenkonzentrationen von 90-100 µg/l vor [151, 152]. Die Optimierung der SelP-Expression tritt jedoch erst bei etwas höheren Konzentrationen ein [153]. Die SelP-Expression einer Studienpopulation mit einem Plasmaselenengehalt von 120 µg/l konnte durch Selensupplementation nicht weiter gesteigert werden, was zeigt, dass SelP hier bereits gesättigt war [154]. Dementsprechend hatte die Selensupplementation in der „*Selenium and Vitamin E Cancer Trial*“ (SELECT)-Studie [155] keine antikanzerogenen Effekte, da die Probanden bereits zu Studienanfang einen adäquaten Plasmaselenengehalt von 135 µg/l hatten [7]. Im Vergleich zur NPC-Studie wurde hier zudem Selenomethionin (SeMet) statt selenangereicherte Hefe als Selenquelle verwendet, wobei letztere eine Vielzahl verschiedener organischer Selenverbindungen enthält.

Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung von Selenoproteinen in der Kanzerogenese ist die Beeinflussung der Krebsinzidenz durch diverse einzelne Nukleotid-Polymorphismen (engl.: *single nucleotide polymorphisms*, SNP) in Selenoproteingenen (Übersicht bei [146, 148, 156]). Des Weiteren wurden in einer Reihe von Tier- und Zellkultur-Versuchen antikanzerogene Mechanismen einzelner Selenoproteine aufgeklärt. Hierbei ergaben sich jedoch auch Hinweise auf prokanzerogene Funktionen von Selenoproteinen. Mit dieser dualen Rolle von Selenoproteinen in der Kanzerogenese beschäftigen sich eine Reihe von Übersichtsartikeln [145, 146, 157-159].

In der NPC-Studie reduzierte die Selensupplementation das Risiko für colorektale Karzinome [133]. In Folgeuntersuchungen war dieser Effekt allerdings nicht mehr signifikant [149]. Fall-Kontroll- und Kohortenstudien zum Thema Selen und Darmkrebs

kamen zu inkonsistenten Ergebnissen, wobei auch hier, wie oben bereits erläutert, die Bandbreite der Plasmaselenpiegel der Teilnehmer eine große Rolle spielt. Tab. 1-1 gibt einen Überblick über epidemiologische Studien zum Zusammenhang von Selenstatus und colorektalen Adenomen und Karzinomen, zu denen Daten zum Plasmaselenstatus verfügbar sind.

Tab. 1-1: Plasmaselengehalt und Inzidenz von colorektaler Kanzerogenese

Modifiziert nach [156]

Diagnose	Plasmaselengehalt ($\mu\text{g/l}$)	Inverse Korrelation	Quelle
Karzinom	Quintile von $< 49 \mu\text{g/l}$ bis $\geq 78 \mu\text{g/l}$ MW $63 \mu\text{g/l}$ (Fälle) vs. $64 \mu\text{g/l}$ (Kontrollen)	nein	[160]
Karzinom	Quintile von $< 103 \mu\text{g/l}$ bis $\geq 133 \mu\text{g/l}$ Rektum/ Colon: MW $121/ 122 \mu\text{g/l}$ (Fälle) vs. $125/ 123 \mu\text{g/l}$ (Kontrollen)	nein	[161]
Karzinom	MW $42 \mu\text{g/l}$ (Fälle) vs. $65 \mu\text{g/l}$ (Kontrollen)	ja	[162]
Adenom	Quartile von $33 - 104 \mu\text{g/l}$ bis $144 - 376 \mu\text{g/l}$ MW $138 \mu\text{g/l}$ (Fälle) vs. $134 \mu\text{g/l}$ (Kontrollen)	nein	[163]
Adenom	MW $125 \mu\text{g/l}$ (Fälle) vs. $135 \mu\text{g/l}$ (Kontrollen)	ja	[164]
Adenom	Quartile von $40 - 90 \mu\text{g/l}$ bis $130 - 240 \mu\text{g/l}$ MW $107 \mu\text{g/l}$ (Fälle) vs. $120 \mu\text{g/l}$ (Kontrollen)	(ja) ($P=0,06$)	[165]
Adenom	MW $58 \mu\text{g/l}$ (Fälle) vs. $65 \mu\text{g/l}$ (Kontrollen)	ja (< 60 - Jährige)	[162]
Adenom	Quintile von $< 117 \mu\text{g/l}$ bis $\geq 153 \mu\text{g/l}$ MW $134 \mu\text{g/l}$ (Fälle) vs. $137 \mu\text{g/l}$ (Kontrollen)	ja	[166]
Adenom	Quintile von $\leq 116 \mu\text{g/l}$ bis $> 147 \mu\text{g/l}$ MW $132 \mu\text{g/l}$ (Fälle) vs. $130 \mu\text{g/l}$ (Kontrollen)	nein	[167]
Adenom	Quartile von MW $113 \mu\text{g/l}$ bis MW $150 \mu\text{g/l}$	ja	[168]

Nur eine von drei Studien zeigt eine signifikant reduzierte Inzidenz von Colonkarzinomen mit steigendem Plasmaselengehalt. Deutlichere Befunde gibt es für das Risiko für Adenome, dieses war in fünf von sieben Studien mit steigendem Plasmaselengehalt verringert. Anscheinend kann ein optimierter Selenstatus also der Entstehung präneoplastischer Läsionen entgegenwirken [156]. Einige wichtige Limitationen der aufgeführten Studien sind jedoch zu beachten. Zum einen ist ein Fall-Kontroll-Studiendesign nicht sehr aussagekräftig, da nicht unterschieden werden kann, ob ein schlechter Selenstatus Ursache oder Folge der Krebserkrankung ist [147], zum anderen handelt es sich teilweise um sehr kleine Studien mit unter 100 Teilnehmern. Die meisten Studienpopulationen stammen aus den USA, wo eine allgemein gute Selenversorgung vorherrscht [147]. Bei einer Untersuchung von Probanden mit einem basalen Plasmaselengehalt von $120 \mu\text{g/l}$ wurde sowohl für die Plasma-GPx-Aktivität, als auch für die Selenoprotein P-Expression ein Plateau erreicht [154]. Die meisten Studien fallen in diesen Dosisbereich, oder die untere Vergleichsgruppe enthält sowohl Probanden mit einem suboptimalen als auch mit einem adäquaten Selenstatus. Die Populationen von Knekt [160] und Fernandez [162] hingegen liegen alle in einem

suboptimalen Versorgungsbereich. Bei einer Beachtung der beschriebenen Konzentrationsbereiche könnten möglicherweise deutlichere Ergebnisse in derartigen Studien erzielt werden.

Die chemopräventive Wirkung von Selen wurde zudem in einer Reihe von Colonkanzerogenesemodellen in Nagern untersucht. Hohe Dosierungen von Selen verminderten hier das Auftreten von präneoplastischen Läsionen und Tumoren in Ratten [128, 130, 131] und Mäusen [132]. Neben der Dosis bestimmte auch die chemische Form des verabreichten Selens die chemopräventiven Eigenschaften. So konnte die durch aromatische Amine induzierte Entstehung präneoplastischer Läsionen bei Ratten durch Gabe von Selenit und Selenat, jedoch nicht durch Gabe von SeMet reduziert werden [131, 169].

Eine Reihe von Selenoproteinen könnte die Colonkanzerogenese beeinflussen. SNPs in *Sepp1*, *GPx4* und *SeIS* erhöhten das Risiko für colorektale Karzinome [170]. Ein reduziertes Risiko ausschließlich für rektale Karzinome wurde für 3 SNPs des *GPx3*-Gens sowie für einen SNP des *GPx2*-Gens gezeigt [171], der letztere Effekt war jedoch nach multiplem Testen nicht mehr signifikant.

Die erhöhte Anzahl präneoplastischer Läsionen bei Mäusen mit einer gestörten Synthese von stressresponsiven Selenoproteinen zeigt, dass einige dieser Proteine eine protektive Rolle in der Colonkanzerogenese haben können [140]. *GPx2* [82] und *GPx3* [172] verminderten im AOM/DSS-Modell der entzündungsassoziierten Colonkanzerogenese die Entzündung und damit einhergehende Tumore. *Sep15* hingegen förderte das Wachstum von Tumorzellen [173, 174] und die Entstehung von ACF im AOM-induzierten Colonkanzerogenesemodell in der Maus [175].

Es existiert also eine Reihe von Hinweisen auf eine antikanzerogene Wirkung von Selen in der Colonkanzerogenese. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch noch nicht hinreichend geklärt, insbesondere was die Rolle einzelner Selenoproteine angeht, welche anscheinend nicht ausschließlich protektive Effekte haben.

1.4 Ziele der Arbeit

Schon länger wird vermutet, dass die GPx2 eine besondere Funktion in der Aufrechterhaltung der Homöostase im Kryptengrund besitzt, welche über ausschließlich antioxidative Mechanismen hinausgeht. In vorausgehenden Arbeiten wurden eine erhöhte Apoptoserate im Kryptengrund des Colons von GPx2 KO-Mäusen sowie eine kompensatorisch erhöhte GPx1-Expression festgestellt [80]. Um Hinweise auf die physiologische Funktion der GPx2 zu bekommen, sollten in dieser Arbeit Apoptose und Suszeptibilität für oxidative Schädigungen in Kryptengrundepithelzellen von GPx2 KO-Mäusen näher untersucht werden. Um spezifische Effekte in Kryptengrundepithelzellen untersuchen zu können, sollte ein Protokoll zur fraktionierten Isolation von Darmepithelzellen etabliert werden. Durch den GPx2 KO aktivierte, stressresponsive Signalwege sollten mit Hilfe eines PCR-Arrays identifiziert und im Anschluss auf mRNA- und Proteinebene weiter untersucht werden.

Die Rolle von Selen in der Colonkanzerogenese scheint von dessen chemischer Form und Dosierung abzuhängen. Für verschiedene Selenoproteine wurden bisher sowohl pro- als auch antikanzerogene Eigenschaften gezeigt. Dies gilt auch für die GPx2, welche die Entzündung und entzündungsassoziierte Colonkanzerogenese im AOM/DSS-Modell hemmte [82], gleichzeitig jedoch das Wachstum von Tumoren und Tumorzellen förderte [82, 83]. Um eine mögliche pro- oder antikanzerogene Funktion der GPx2 von ihrer antiinflammatorischen Wirkung zu trennen, sollte in dieser Arbeit die nicht-entzündungsassoziierte, AOM-induzierte Colonkanzerogenese, welche ein Modell für die sporadische Colonkanzerogenese beim Menschen ist [123] in WT- und GPx2 KO-Mäusen untersucht werden. Durch Fütterung von Diäten mit unterschiedlichem Selengehalt sollten die Rolle des Selenstatus in der Kanzerogenese in WT-Mäusen und der Einfluss anderer Selenoproteine auf den Phänotyp des GPx2 KO beurteilt werden. Die Auswirkungen des GPx2 *knockouts* und des Selenstatus auf die Kanzerogenese sollten 16 Wochen nach der letzten AOM-Injektion durch die Analyse von ACF, MDF und Adenomen im Colon analysiert werden. Außerdem sollte in präneoplastischen Läsionen von WT-Tieren untersucht werden, ob die zuvor beschriebene Hochregulation von GPx2 in der Colonkanzerogenese auch in diesem Modell zu beobachten ist und ob sie mit einer erhöhten β -Catenin-Expression einhergeht, welche ein möglicher Faktor für die Induktion von GPx2 in der Kanzerogenese sein könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Tierversuche

Die Haltung der Mäuse erfolgte in IVC-Käfigen (engl.: *individually ventilated cages*) unter spezifisch-pathogen-freien Bedingungen (SPF) bei einem 12-stündigem Licht-Dunkel-Rhythmus und freiem Zugang zu Futter und Wasser. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden von der zuständigen Behörde unter der Nummer MLUV 32-2347/4+68 genehmigt.

GPx2 KO-Mäuse (*GPx2^{-/-}C57Bl/6Jx129SV/J*) wurden von Prof. Ph. D. Fong Fong Chu (Beckman Research Institute, City of Hope, Duarte, CA, US) zur Verfügung gestellt. Der KO basiert auf einem Ersatz von Exon1 des *GPx2*-Gens durch das *Neomycin*-Gen mit Hilfe des *pPNT*-Vektors [70]. Die verwendeten embryonalen Stammzellen stammten aus dem *129S3/SvImJ*-Mausstamm und wurden auf einen C57BL/6J-Hintergrund überführt. Vor Erhalt waren die Mäuse drei Mal auf den C57BL/6J-Hintergrund zurückgekreuzt worden. Vor Beginn der Experimente erfolgten zwei weitere Rückkreuzungen. Die Erhaltung der Mauslinie erfolgte durch heterozygote Verpaarungen. Zur Gewinnung von Versuchstieren wurden WT- und GPx2 KO-Tiere aus dieser Zucht sowohl hetero- als auch homozygot verpaart. Die Genotypisierung der Mäuse wird in Kap. 2.1.1 beschrieben. In den Versuchen wurden ausschließlich männliche Tiere eingesetzt.

Da die Variation des Selengehalts der Nahrung in humanen Populationen simuliert werden sollte, wurde Selenomethionin als Selenquelle verwendet, welches eine der vorherrschenden chemischen Formen von Selen in der Nahrung ist [6]. Ein selenadäquater Status sollte mit einem marginal selendefizienten Status verglichen werden, wie er in Europa häufig anzutreffen ist [147] sowie mit einem durch normale selenreiche Ernährung erreichbarem, hohen Selenstatus. Um einen definierten Selenstatus einzustellen, erhielten die Mäuse eine selenarme, *Torula*-Hefe-basierte Diät (Nr. C1045 mit 50 % Kohlenhydraten, 17 % Protein, 5 % Fett, 4 % Ballaststoffen und einer Mixtur aus Mikronährstoffen, Altromin, Lage, DE), welche durch Zusatz von L(+)-Selenomethionin (ACROS Organics, Geel, BE) auf einen Selengehalt von 0,15 mg Se/ kg Futter (selenadäquat/+Se) bzw. 0,60 mg Se/ kg Futter (selensupplementiert/++Se) gebracht wurde. Der Selengehalt des selenarmen Futters lag bei 0,086 mg Se/ kg (Charge 609.1) bzw. 0,054 mg Se/ kg (Charge 768) oder 0,064 mg Se/ kg (Charge 844) und war somit halb so hoch, wie die empfohlene Zufuhrmenge für Mäuse [176]. Innerhalb der einzelnen Experimente wurde die Futtercharge immer beibehalten.

2.1.1 Genotypisierung

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte anhand von Schwanzspitzenbiopsien, welche im Alter von ca. vier Wochen entnommen wurden. Zur Freisetzung genomischer DNA

wurden die Schwanzspitzen für 3-4 h bei 50°C in 50 µl Gitschierpuffer (67 mM Tris pH 8,8; 16,6 mM (NH₄)₂SO₄; 6,5 mM MgCl₂; 0,05% Triton X-100) mit 1 mg/ml Proteinase K (AppliChem, Darmstadt, DE) und 1% β-Mercaptoethanol mit 1000 Umdrehungen/min geschüttelt (Thermomixer 5436, Eppendorf, Wessling-Berzdorf, DE). Anschließend wurden die Proben 30 sec gevortext, zentrifugiert und 10 min bei 95°C hitzeinaktiviert. Nach nochmaliger Zentrifugation dienten je 2 µl der gewonnenen Überstände als Template für zwei verschiedene PCR-Reaktionen (siehe Kap. 2.4.4), von denen eine das Wildtyp (WT)-GPx2-Gen und die andere das Insert aus dem pNT-Vektor (siehe Kap. 2.1) detektierte. Nach Auftrennung der PCR-Ansätze in einem 1,5%igen Agarosegel und Anfärbung mit Ethidiumbromidlösung, wurden die PCR-Produkte unter UV-Licht visualisiert (GelDoc 2000, BioRad, Hercules, CA, USA). WT-Tiere wurden anhand eines ca. 450 bp großen Produkts in der PCR mit GPx2-spezifischen Primern identifiziert (siehe Kap. 2.4.4), GPx2 KO-Tiere anhand eines ca. 480 bp großen Produkts in der PCR mit Vektor-spezifischen Primern und heterozygote Tiere durch das Vorhandensein von beiden PCR-Produkten.

2.1.2 Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung

Nach dem Absetzen wurden drei bis vier Wochen alte Tiere zunächst durch vierwöchige Fütterung der jeweiligen Diäten auf einen bestimmten Selenstatus eingestellt (Abb. 2–1). Die Fütterung der Diäten wurde über den gesamten Versuchsverlauf beibehalten.

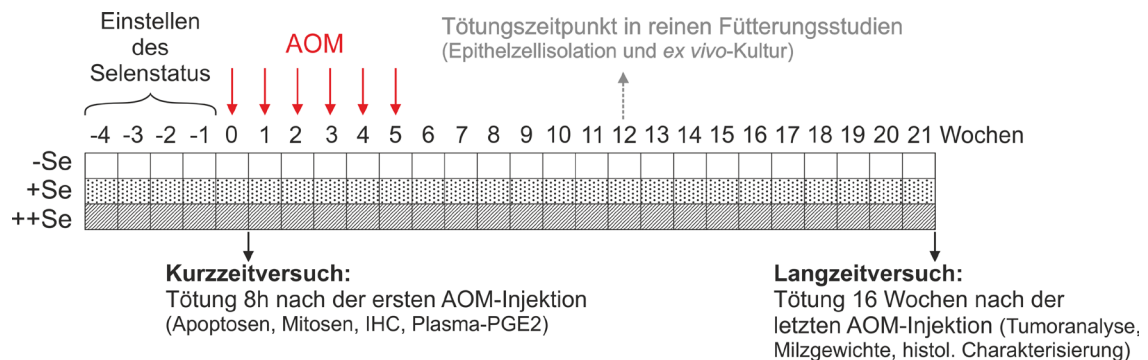


Abb. 2–1: Aufbau der Tierversuche

GPx2 KO-Mäuse (GPx2^{-/-}C57Bl/6Jx129SV/J) und die dazugehörigen Wildtypen wurden nach dem Absetzen vier Wochen mit selenarmer (-Se), selenadäquater (+Se) oder selensupplementierter (++) Diät vorgefüttert, um den Selenstatus einzustellen. Im Langzeitversuch zur AOM-induzierten Colonkancerogenese erfolgte anschließend für sechs Wochen wöchentlich eine AOM-Injektion. Die Tiere wurden 16 Wochen nach der letzten AOM-Injektion getötet. Im Kurzzeitversuch wurden die Tiere 8 h nach der ersten AOM-Injektion getötet. In Fütterungsstudien erfolgte die Tötung ohne vorhergehende Behandlung nach 16-wöchiger Fütterung der Selendiäten.

Im chemischen Colonkancerogenesemodell (Langzeitversuch) erfolgte die Tumorerinitiation durch sechsmalige intraperitoneale Injektion von 10 mg/ kg Körpergewicht des Colonkancerogens AOM (Sigma, Steinheim, DE) im Abstand von jeweils einer Woche. In den Kontrollgruppen wurde ein äquivalentes Volumen isotonomischer Kochsalzlösung (Saline, Sigma, Steinheim, DE) injiziert.

Die Tötung der Tiere erfolgte 16 Wochen nach der letzten AOM-Injektion. Bei der Tötung dieser Tiere wurden die Milzgewichte bestimmt. Das gesamte Colon wurde zur Tumoranalyse (Kap. 2.1.3 und 3.4.3 - 3.4.4) herangezogen. Von einer Untergruppe AOM-behandelter Tiere wurden Darmrollen für histologische Analysen angefertigt (Kap. 2.5 und 3.4.5 - 3.4.6). Zur Untersuchung der akuten Effekte von AOM im Kurzzeitversuch erfolgte die Tötung 8 h nach der ersten AOM- bzw. Saline-Injektion. Im Colon dieser Tiere wurden Apoptosen, Mitosen, PCNA-, GPx1-, GPx2- und p53-Immunfärbungen und die Kryptenlänge analysiert (Kap. 3.5) desweiteren wurde im Plasma dieser Tiere Prostaglandin E₂ (PGE₂) bestimmt. In reinen Fütterungsstudien wurden die Mäuse nach dem Absetzen im Alter von drei bis vier Wochen für 16 Wochen mit den entsprechenden Diäten gefüttert. Nach diesem Zeitschema wurden Proben zur Epithelzellisolation und *ex vivo*-Kultur von Darmabschnitten (Kap. 3.2 - 3.3) sowie Plasma zur Tnf α -Bestimmung gewonnen. Abweichend hiervon wurde die F4/80-Färbung in nur sieben Wochen gefütterten Tieren durchgeführt.

Die Tierzahlen beliefen sich im Langzeitversuch in den Kontrollgruppen auf zehn Tiere und in den AOM-behandelten Gruppen auf 20 Tiere für die Tumoranalyse sowie zusätzliche fünf Tiere für immunhistologische Untersuchungen an Darmrollen. Im AOM-Kurzzeitversuch wurden fünf Tiere pro Gruppe und in den Fütterungsstudien 4-8 Tiere pro Gruppe eingesetzt.

Zur Tötung wurden die Mäuse zunächst mit Isofluran narkotisiert, anschließend durch Herzpunktion entblutet und durch zervikale Dislokation getötet. Zur Gewinnung von Plasma wurde das Blut für 10 min bei 3.000 g und 4°C zentrifugiert. Für die Tnf α -Messung im Plasma wurde ein modifiziertes Protokoll, welches unter Kap. 2.2.2 beschrieben wird, verwendet. Organe für proteinbiochemische und andere Untersuchungen wurden mit einer Stickstoff-gekühlten Gefrierzange schockgefroren und bei -80°C gelagert. Darmabschnitte für die Epithelzellisolation und *ex vivo*-Kultur wurden sofort weiter verarbeitet, wie in Kap. 2.1.4 und 2.1.5 beschrieben. Die Probenaufarbeitung für Tumoranalyse und histologische Untersuchungen ist in Kap. 2.1.3 und 2.5.1 aufgeführt.

2.1.3 Tumoranalyse

Zur Tumoranalyse wurde das Colon in den proximalen, „transversen“ und distal-rektalen Abschnitt aufgeteilt. Diese wurden longitudinal aufgeschnitten, gesäubert, auf Filterpapier aufgespannt und in 4%iger, phosphatgepufferter Formaldehydlösung mit pH 7,0 (Roth, Karlsruhe, DE) flach zwischen Filterpapier fixiert. Alle Proben zur Tumoranalyse wurden verblindet.

ACF sind präneoplastische Läsionen, die zuerst im Colon AOM-behandelter Mäuse beschrieben wurden und sich durch eine abnormale Kryptenmorphologie auszeichnen [177]. Zur Identifikation von ACF wurden die fixierten Darmstücke zunächst 3 min in

phosphatgepufferter Salzlösung (engl.: *phosphate buffered saline*, PBS, 140 mM NaCl; 10 mM Na₂HPO₄·2H₂O; 2,99 mM KH₂PO₄; pH 7,4) und anschließend etwa 3 min in 0,1% Methylenblaulösung in PBS inkubiert. Nach dem Spülen der Därme in PBS erfolgte eine Analyse unter einem Stereomikroskop im Dunkelfeld- und Hellfeld-Modus mit 60-facher Vergrößerung (Olympus SZH10, Olympus Corporation, Tokyo, JP). ACF wurden anhand morphologischer Kriterien wie Kryptenvergrößerung, Verdickung der epithelialen Auskleidung und Vergrößerung sowie abnormaler Morphologie des Kryptenlumens identifiziert. Tumore wurden ebenfalls im Methylenblau-gefärbten Darm analysiert.

MDF sind präneoplastische Läsionen, die in der Aufsicht durch eine stark verminderte Anzahl oder das Fehlen von Becherzellen identifiziert werden können [178]. Zur Detektion von MDF wurden Sialo- und Sulfomucine durch eine kombinierte Färbung mit *High-Iron Diamine* (HID) und Alcianblau (AB) angefärbt. Nach dem Spülen der Därme in PBS wurden sie 7 min in HID Lösung inkubiert, 3x in Wasser gespült, anschließend 20 min in 1% Alcianblaulösung (in 3% Essigsäure, pH 2,5) inkubiert und in 80% Ethanol gewaschen. Nach 20 sec Gegenfärbung in 0,5% Neutralrotlösung (in H₂O) und Waschen in H₂O, wurden MDF analog zu ACF im Stereomikroskop identifiziert.

Der Durchmesser aller ACF, MDF und Tumore wurde mit Hilfe eines Objektmikrometers ermittelt. Zudem wurde jeweils die Lokalisation in Entfernung vom Anus sowie die Anzahl der Krypten in einem ACF oder MDF (Kryptenmultiplizität) bestimmt. Alle MDF mit einer Kryptenmultiplizität >2 wurden herausgeschnitten und histologisch in Hämatoxylin/Eosin (H/E)-gefärbten Schnitten verifiziert (vgl. Kap. 2.5.3). Kriterien hierbei waren ein dysplastisches Erscheinungsbild der Krypten und Becherzelldepletion. Alle Tumore wurden ebenfalls in H/E-Schnitten histologisch verifiziert. Die Verblindung der Schnitte wurde bis zum Abschluss der histologischen Bewertung beibehalten.

2.1.4 Fraktionierte Isolation von Darmepithelzellen

Die fraktionierte Isolation von Darmepithelzellen aus dem distalen Colon und aus dem Duodenum erfolgte nach einer Modifikation der Protokolle von Ferraris und Mariadason [179, 180]. Es basiert auf der Auflösung der Zellkontakte durch Ethylendiamintetraacetat (EDTA) und Dithiotreitol (DTT) in Kombination mit Schütteln. Hierbei lösen sich zunächst die Epithelzellen am Villus bzw. an der Kryptenspitze und dann sukzessive die tiefer liegenden Epithelzellen.

Es wurden 2 bis 2,5 cm lange Darmabschnitte entnommen, zuerst mit PBS (Kap. 2.1.3) und anschließend mit PBS und 1 mM DTT gespült, mit einer Pinzette von außen nach innen umgestülpt und auf eine Haltevorrichtung aus Draht aufgezogen. Diese Vorrichtung wurde in eine 12-Loch-Zellkulturplatte mit 2 ml PBS/ Loch gehängt und bis zur Weiterverarbeitung, jedoch nicht länger als 1,5 h, auf Eis aufbewahrt. Anschließend

wurden die Darmstücke für 15 min bei 37°C in Citrat-Puffer (96 mM NaCl; 1,5 mM KCl; 27 mM Natriumcitrat; 8 mM KH₂PO₄; 5,6 mM Na₂HPO₄; pH 7,3) schüttelnd (Vari-Shaker, Dynatech, Guernsey, GB) inkubiert.

Zur Isolation von Epithelzellen aus dem Duodenum wurde der Darm auf der Haltevorrichtung in eine neue 12-Loch-Platte mit 2 ml PBS mit 1,5 mM EDTA; 0,5 mM DTT und 1 mg/ml BSA (engl.: *bovine serum albumin*) je Loch überführt. Nach 10 min Schütteln bei 37°C wurde der Darm mit der Haltevorrichtung in eine neue Platte überführt und die Zellsuspension aus der Platte in ein Zentrifugenröhrchen transferiert. Diese Prozedur wurde mit Inkubationszeiten von 10/6/5/5/9/10/15/25 und 30 min wiederholt, so dass insgesamt zehn Fraktionen gewonnen wurden. Die Fraktionen 1 - 4 wurden als Zellen des Villus vereinigt, die Fraktionen 5 - 7 als Zellen der Kryptenmitte und die Fraktionen 8 - 10 als Zellen aus dem Kryptengrund.

Zur Zellisolation aus dem distalen Colon wurde die DTT-Konzentration im verwendeten Puffer schrittweise erhöht. Die erste und zweite Inkubation erfolgten in PBS mit 1,5 mM EDTA, 1 mg/ml BSA und 1 mM DTT für 15 min schüttelnd bei 37°C. Anschließend wurde 2x15 min mit 5 mM und 2x15 min mit 10 mM DTT inkubiert. Die Fraktionen 1 und 2 wurden hierbei als Kryptenspitzenzellen vereinigt, die Fraktionen 3 und 4 als mittlere- und die Fraktionen 5 und 6 als Kryptengrundfraktion. Alle Epithelzellfraktionen wurden vor der Weiterverarbeitung zwei bis drei Mal in PBS gewaschen.

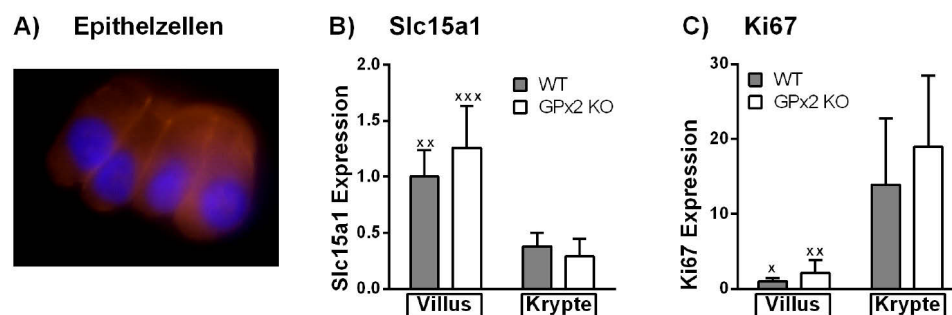


Abb. 2-2: Verifizierung der Epithelzellfraktionierung

(A) Aufnahme von Kryptengrundepithelzellen des Duodenums nach Antikörperfärbung des Epithelzellmarkers E-Cadherin (gelb) und der Zellkerne (blau) mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). (B,C) In Villus- und Kryptengrund-Epithelzellfraktionen des Duodenums selenadäquater WT- und GPx2 KO-Mäuse wurde die Slc15a1-Expression als Marker für differenzierte Zellen (B), und die Ki-67-Expression als Marker für proliferierende Zellen (C) bestimmt. Dargestellt sind auf β -Aktin normalisierte Daten, bezogen auf die Gruppe WT-Villus. MW + SD, n = 5. 2way ANOVA: x $p < 0,05$; xx $p < 0,01$; xxx $p < 0,001$ vs. Krypte.

Bei der Etablierung der Protokolle für Duodenum und Colon wurden die Fraktionen durch Messung der alkalischen Phosphataseaktivität als Marker für differenzierte Zellen aus Villus bzw. Kryptenspitze und die Proteinexpression des *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) als Marker für proliferierende Zellen im Kryptengrund charakterisiert. Abb. 2-2A zeigt Epithelzellen des Kryptengrunds nach einer Immunfärbung des Epithelzelladhäsionsmoleküls und -markers E-Cadherin. Gut zu erkennen sind hier typische Merkmale von Darmepithelzellen, wie die zylindrische Form, die

polare Ausrichtung und die enge, laterale Verbindung des Zellverbands durch Zellkontakte.

Die Verifizierung der Fraktionen erfolgte anhand einer Messung von alkalischer Phosphataseaktivität als Differenzierungsmarker, PCNA-Proteinexpression als Proliferationsmarker [64] und weiteren Markern auf mRNA-Ebene. Abb. 2–2B, C zeigt exemplarisch die mRNA-Expression von Krypten- und Villusmarkern im Duodenum. Der Villusmarker *Slc15a1* (engl.: *solute carrier 15 a1*) [181] war in Villusepithelzellen um etwa den Faktor drei signifikant höher exprimiert als im Kryptengrund (Abb. 2–2B). Der Proliferationsmarker *Ki-67* [182] war in Kryptengrundepithelzellen um fast das Zwanzigfache höher exprimiert als im Villus, wodurch die Identität der isolierten Zellen bestätigt wurde.

2.1.5 Ex vivo-Kultur von Darmabschnitten

Zur *ex vivo*-Kultur wurden ca. 2 cm lange Darmabschnitte mit PBS (siehe Kap. 2.1.3) mit 1 µl/ml Protease-Inhibitor-Cocktail-Set-III (Calbiochem, Bad Soden, DE) gespült, umgestülpt, auf eine Haltevorrichtung aufgezogen und in 12-Loch-Zellkulturplatten platziert, welche je Loch 2 ml RPMI 1640-Zellkulturmedium (Gibco/ Life Technologies, Paisley, GB) mit 0,25 µg/ml *Amphotericin B* (Sigma, Steinheim, DE) und jeweils 100 µg/ml Penicillin und Streptomycin (Gibco/ Life Technologies, Paisley, UK) enthielten. Die Platten wurden bei Raumtemperatur (RT) aufbewahrt und spätestens 1 h nach Entnahme der ersten Probe für 5 min mit Stufe 3-4 (Vari-Shaker, Dynatech, Guernsey, GB) geschüttelt. Anschließend wurden die Därme mit den Haltevorrichtungen in neue 12-Loch-Zellkulturplatten mit 1,5 ml RPMI 1640 und den oben beschriebenen Zusätzen überführt und im Brutschrank (Heraeus Instruments, Hanau, DE) bei 37°C, gesättigter Wasserdampf-atmosphäre und 5% CO₂-Partialdruck für 24 h inkubiert. Die Därme wurden danach verworfen und das Medium für 5 min bei 250 x g zentrifugiert. Die so erhaltenen Überstände wurden bei -80°C aufbewahrt und zur Tnfα-Bestimmung (Kap. 2.2.2) eingesetzt.

2.2 Assays

2.2.1 Caspase 3/7-Aktivität

Die Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 wurde mit Hilfe des *Caspase-Glo*[®] 3/7 Assays (Promega, Madison, WI, US) bestimmt. Dieser beruht auf Verwendung eines Substrats, welches durch aktive Caspase 3/7 zu Aminoluciferin umgesetzt wird. Die nach Luciferase-katalysierter Umsetzung des Aminoluciferins freigesetzte Chemolumineszenz ist proportional zur Caspase 3/7-Aktivität der Proben.

Der Assay wurde mit frisch isolierten Epithelzellen nach dem Herstellerprotokoll für Zellkultur-Zellen durchgeführt. Je Loch einer weißen 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden 15.000 Zellen in 50 µl farblosem, serumfreien RPMI und 50 µl Caspase-Glo® 3/7-Reagenz pipettiert und nach 30 min Inkubation im Dunkeln im Luminometer (*Luminoscan Ascent*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US) gemessen.

2.2.2 Tnf α -Bestimmung

Zur Gewinnung von Plasma wurde Blut nach der Entnahme durch Herzpunktion (Kap. 2.1.2) in heparinisierte Reaktionsgefäße überführt und 15 min bei 4°C und 1.200 x g zentrifugiert. Die erhaltenen Überstände wurde bei -80°C gelagert.

Die Tnf α -Bestimmung im Plasma und in Überständen aus der *ex vivo*-Kultur von Darmabschnitten (siehe Kap. 2.1.5) erfolgte mittels Enzym-Immunoassay (engl.: *enzyme linked immunosorbent assay*, ELISA). Hierfür wurde zunächst eine 96-Loch-Mikrotiterplatte mit einem Tnf α -spezifischen Primärantikörper beschichtet, welcher bei einer anschließenden Inkubation mit den Proben Tnf α binden konnte. Der danach eingesetzte, biotinylierte Detektionsantikörper war ebenfalls spezifisch für ein anderes Epitop des murinen Tnf α , so dass ein an die Platte gekoppeltes Antikörper-Antigen-Antikörper-Sandwich entstand. Die Detektion erfolgte mit Meerrettichperoxidase, welche durch Avidin-Kopplung an die Biotinmoleküle des Detektionsantikörpers binden konnte und das Substrat Tetramethylbenzidin zu einem farbigen Endprodukt umsetzte, welches photometrisch quantifiziert wurde.

Die Durchführung des ELISA („*Mouse TNF α ELISA MAX Deluxe Set*“, Biolegend, San Diego, CA, US) erfolgte nach Herstelleranweisung. Die Proben wurden unverdünnt als Duplikate gemessen und die Tnf α -Konzentration mit Hilfe einer linearen Standardreihe von 1,95 - 62,5 pg/ml Tnf α bestimmt. Die Absorption des Endprodukts des Farbnachweises bei 450 nm sowie bei der Referenzwellenlänge von 570 nm, wurde im Plattenphotometer (*Synergy 2 Microplate Reader*, BioTek, Bad Friedrichshall, DE) gemessen. Die Tnf α -Konzentrationen in den Überständen der *ex vivo*-Kultur wurden auf die Einwaage der verwendeten Darmstücke bezogen.

2.2.3 PGE₂-Metabolite

Der verwendete „*Prostaglandin E Metabolite EIA Kit*“ (Cayman, Ann Arbor, MI, USA) ermöglicht die Messung von PGE₂ und durch PGE₂-Abbau entstandenen Metaboliten. Hieraus resultiert eine höhere Sensitivität im Vergleich zu Assays, die nur das chemisch instabile PGE₂ selbst detektieren. Das Assayprinzip ist die Konkurrenz von Prostaglandin E-Metaboliten (PGEM) und Acetylcholinesterase-gekoppeltem PGEM-Tracer um Bindungsstellen eines PGEM-spezifischen Antikörpers aus Kaninchen, welcher von einem, auf einer 96-Loch-Platte immobilisierten, Maus-anti-Kaninchen-

Antikörper speziesspezifisch gebunden wird. Die Absorption des, durch die Acetylcholinesterase-katalysierte Umsetzung von Ellmans Reagenz entstehenden, Farbstoffes im Plattenphotometer ist umgekehrt proportional zur PGEM-Konzentration der Proben, welche mittels einer Standardreihe ermittelt werden kann.

Plasmaproben wurden zur Aufreinigung zunächst mit 4 Volumenteilen Aceton 30 min bei -20°C gefällt, 5 min mit $500 \times g$ zentrifugiert und die Überstände im Stickstoffstrom getrocknet. Anschließend wurden die Proben im Ursprungsvolumen EIA-Assaypuffer resuspendiert und nach Zugabe von $22,5 \mu\text{l}$ Assay-Carbonatpuffer je $100 \mu\text{l}$ Probe über Nacht bei 37°C derivatisiert. Am Folgetag erfolgte die Zugabe von $30 \mu\text{l}$ Assay-Phosphatpuffer und $22,5 \mu\text{l}$ EIA-Assaypuffer. Parallel wurde eine Standardlösung ebenso aufgearbeitet, aus der anschließend durch sukzessive Verdünnung eine Standardreihe von $1,56 - 50 \text{ pg/ml}$ PGEM hergestellt wurde. Die Mikrotiterplatten wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll inklusive der notwendigen Kontrollen und Leerwerte pipettiert. Plasmaproben wurden hierfür in einer 1:5 Verdünnung eingesetzt und einfach gemessen. Je Loch einer 96-Loch-Platte wurden $50 \mu\text{l}$ Probe bzw. Standard, $50 \mu\text{l}$ Tracer und $50 \mu\text{l}$ Antiserum pipettiert. Nach 18 h Inkubation bei RT im Dunklen wurde die Platte geleert, gewaschen und $200 \mu\text{l}$ Ellmans Reagenz hinzugegeben. Die Messung erfolgte nach 60 min Inkubation im Plattenphotometer (*Synergy 2 Microplate Reader*, BioTek, Bad Friedrichshall) bei 410 nm . Die PGEM-Konzentrationen im Plasma wurden mit Hilfe der Standardreihe berechnet.

2.2.4 DHR-Assay

Zur Bestimmung von oxidativem Stress wurde ein DHR-Assay [183] mit frisch isolierten Kryptengrundepithelzellen (siehe Kap. 2.1.4) durchgeführt. Dieser Assay beruht auf der Oxidation von Dihydrorhodamin 123 (DHR) durch reaktive Sauerstoff-, Stickstoff- und Chlorspezies [184] zu fluoreszierendem Rhodamin 123, welches bei einer Exzitationswellenlänge (λ_{Ex}) von 500 nm und einer Emissionswellenlänge (λ_{Em}) von 536 nm photometrisch quantifiziert werden kann.

Zellpellets mit 1 Mio Zellen wurden in *Hanks balanced salt solution* (HBSS; $5,4 \text{ mM}$ KCl; $0,3 \text{ mM}$ Na_2HPO_4 ; $0,4 \text{ mM}$ KH_2PO_4 ; $4,2 \text{ mM}$ NaHCO_3 ; $1,3 \text{ mM}$ CaCl_2 ; $0,5 \text{ mM}$ MgCl_2 ; $0,6 \text{ mM}$ MgSO_4 ; 137 mM NaCl; $5,6 \text{ mM}$ D-Glucose) gewaschen und anschließend mit $20 \mu\text{M}$ DHR in HBSS für 45 min mit 37°C , gesättigter Wasserdampf-atmosphäre und 5% CO_2 -Partialdruck inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in HBSS gewaschen und für 60 min mit 37°C , gesättigter Wasserdampf-atmosphäre und 5% CO_2 -Partialdruck in farblosem RPMI1640-Medium (Gibco/ Life Technologies, Paisley, GB) mit $50 \mu\text{M}$ 13-Hydroperoxy-Linolsäure (HPODE) (Duodenum) bzw. $100 \mu\text{M}$ HPODE (Colon) oder einem äquivalenten Volumen Ethanol als Lösungsmittelkontrolle inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in HBSS gewaschen und in $350 \mu\text{l}$

HBSS resuspendiert. Die verwendeten HPODE-Konzentrationen waren im Vorfeld mit Hilfe von Cytotoxizitätstests ermittelt worden. 100 µl dieser Zellsuspension je Loch wurden als Triplikate in eine 96-Loch-Zellkulturplatte pipettiert und im Plattenphotometer (*Synergy 2 Microplate Reader*, BioTek, Bad Friedrichshall) bei $\lambda_{\text{Ex}} = 485 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Em}} = 530 \text{ nm}$ gemessen. Die Daten wurden auf die eingesetzte Zellzahl normalisiert.

2.2.5 Comet-Assay

Zur Analyse der basalen DNA-Schädigung in Kryptengrundepithelzellen wurde der alkalische Comet-Assay mit einem Verdau durch 8-Hydroxyguanin-DNA-Glycosylase (hOGG1) kombiniert, um sowohl DNA-Strangbrüche, als auch oxidative DNA-Schädigungen erfassen zu können, indem oxidierte DNA-Stellen durch hOGG1 in Strangbrüche überführt werden.

Objektträger wurden mit 1%iger Agarose beschichtet und getrocknet. Anschließend wurden 60.000 frisch isolierte Zellen je Objektträger in 1% *low melting point*-Agarose aufgetragen und 10 min bei 4°C ausgehärtet. Nach 1 h Inkubation in Lysepuffer (2,5 M NaCl; 100 mM Na₂EDTA; 10 mM Tris; 1% Triton X-100; 10% DMSO; pH 10,0) bei 4°C wurden die Objektträger 10 min bei 37°C in Endonuklease-haltigem Puffer (80 mU hOGG1 (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA); 40 mM HEPES; 100 mM KCl; 0,5 mM EDTA; 0,2 mg/ml BSA; pH 8,0) inkubiert. Anschließend erfolgte eine 20-minütige Inkubation in alkalischem Elektrophoresepuffer (300 mM NaOH; 1 mM Na₂EDTA; pH 13,0) und 30 min Elektrophorese bei 25 V und 300 mA. Danach wurden die Objektträger mehrmals in Neutralisationspuffer (400 mM Tris; pH 7,5) und anschließend in Reinstwasser gewaschen, für 15 min bei 70°C getrocknet und mit Methanol fixiert. Vor dem Mikroskopieren wurde die DNA mit 2 µg/ml DAPI (in PBS) angefärbt. Im Fluoreszenzmikroskop (*Axio Observer*, Carl Zeiss, Göttingen, DE) wurden Aufnahmen mit $\lambda_{\text{Ex}} = 385 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Em}} = 461 \text{ nm}$ in 200-facher Vergrößerung bei einer Belichtungszeit von 60 ms angefertigt. An mindestens 75 Zellkernen je Objektträger wurde anschließend mit Hilfe der *Comet Score*TM-Software (V1.5, TriTek) der prozentuale Anteil DNA im Schweif als Maß für die DNA-Schädigung ermittelt.

2.3 Proteinanalytik

2.3.1 Herstellung von Organlysaten

Gewebeproben wurden nach Entnahme sofort mit Hilfe einer Flüssigstickstoffgekühlten Gefrierzange schockgefroren und bei -80°C gelagert. Das Gewebe wurde unter Stickstoffkühlung in einer Kugelmühle (*TissueLyser*, Qiagen, Hilden, DE) pulverisiert. Zur Herstellung von Lysaten für Western Blot und Enzymaktivitätsmessungen wurden 10 mg Organpulver in 250 µl Homogenisationspuffer (100 mM Tris-HCl;

300 mM KCl; 0,1% Triton X-100; pH 7,6) mit 2 µl Protease Inhibitor (Protease-Inhibitor-Cocktail-Set-III, Calbiochem, Bad Soden, DE) für 2 x 2 min bei 30 Hz in der Kugelmühle homogenisiert. Der nach 15 min Zentrifugation bei 4°C und 21.000 x g abgenommene Überstand wurde in der Proteinanalytik eingesetzt.

2.3.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford [185] bestimmt, welche auf der Bindung des Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie-Brillant-Blau G250 an aromatische und basische Seitenkettenreste von Proteinen und einer dadurch verursachten Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm basiert. Die Messung der verdünnten Proben erfolgte mit dem Bio-Rad *Protein Assay Kit II* (*Bio-Rad dye reagent concentrate*, Bio Rad, München, DE) entsprechend der Herstelleranweisung für Mikrotiterplatten. Anhand der im Plattenphotometer (*Synergy 2 Microplate Reader*, BioTek, Bad Friedrichshall, DE) bei 630 nm gemessenen Extinktion wurden die unbekannt Proteinkonzentrationen mit Hilfe einer Rinderserumalbumin-Standardreihe (*Lyophilized bovine serum albumin*, Bio-Rad, München, DE) berechnet.

2.3.3 SDS-PAGE und Western Blot

Vor dem immunochemischen Proteinnachweis mittels *Western Blot* erfolgte eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht durch denaturierende *Sodium-dodecylsulfat*-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Es wurde ein diskontinuierliches Elektrophoresesystem verwendet, mit einem Sammelgel zur Stapelbildung der Proteine durch Isotachophorese und einem Trenngel, in dem die Proteine durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamidgels aufgetrennt wurden (Tab. 2-1).

Tab. 2-1: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

	Trenngel			Sammelgel (5%)
	(10%)	(12,5%)	(15%)	
Reinstwasser	2,82 ml	2,44 ml	2,25 ml	3,06 ml
40% Acrylamid-Bisacrylamid 29:1 (Rotiphorese® Gel 40 (29:1))	1,5 ml	1,87 ml	2,07 ml	0,638 ml
1,5 M TRIS-HCl pH 8,8	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	-
0,5 M TRIS-HCl pH 6,8	-	-	-	1,25 ml
10% SDS	60 µl	60 µl	60 µl	50 µl
10% APS	60 µl	60 µl	60 µl	50 µl
10% TEMED	60 µl	60 µl	60 µl	50 µl

Die Elektrophorese in *Minigel-Twin*-Gelkammern (Biometra, Göttingen, DE) erfolgte in Elektrophoresepuffer (25 mM TRIS; 192 mM Glycin; 3,5 mM SDS) mit 20-25 mA je Gel. In SDS-Polyacrylamidgelen mit 20 Bahnen wurden je Spur 10 µg Protein in einem Gesamtvolumen von 14 µl bzw. 0,167 µl Plasma in einem Gesamtvolumen von 5 µl

aufgetragen. Für die Grp78 (engl.: *glucose-regulated protein 78 kDa*)-Detektion wurden davon abweichend 6 µg Protein in einem Gesamtvolumen von 30 µl in Gelen mit je 10 Bahnen aufgetragen. Die Ansätze enthielten einfach reduzierenden Lämmli-puffer (0,0625 M TRIS pH 6,8; 10% Glycerin; 2% SDS; 2,5% β-Mercaptoethanol; 0,00125% Bromphenolblau) und wurden vor dem Auftragen fünf Minuten lang im Heizblock bei 95°C denaturiert. Das Molekulargewicht der Proteine wurde durch gleichzeitige Auftrennung einer Mischung von Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht (*Page-Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US) ermittelt.

Im Anschluss wurden die Proteine mittels *Western Blot* nach dem *semi dry*-Verfahren aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Optitran BA-S 83 vliesverstärkte Nitrocellulose, Whatman®, Maidstone, GB) übertragen. In eine *SemiPhor™*-Blotkammer (Hoefer®, Amersham Biosciences, Amersham, GB) wurde die Nitrozellulosemembran zwischen je drei mit Blottpuffer (25 mM TRIS; 100 mM Glycin; 15% Methanol) getränkte Filterpapiere (*Chromatography Paper 3MM CHR*, Whatman® Maidstone, GB) gelegt. Der Transfer erfolgte 2 h mit einer Stromstärke von 1,2 mA je cm². Nach dem Proteintransfer wurden die im Gel verbliebenen Proteine mit Coomassie-Brillantblaulösung (0,1% w/v Coomassie Brilliantblau; 42,5% Ethanol; 5% Methanol; 10% Essigsäure) angefärbt und mit Entfärbe- und Fixierlösung (10% Methanol; 7% Essigsäure) fixiert.

Die Membran wurde zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen eine Stunde in TTBS (engl.: *TRIS-buffered saline* mit Tween 20; 50 mM TRIS; 150 mM NaCl; 0,1% Tween-20; pH 7,5) mit 5% Magermilchpulver schüttelnd inkubiert. Nach diesem und allen folgenden Inkubationsschritten wurde die Membran jeweils 3 x 10 min in TTBS gewaschen. Nach dem Blockieren erfolgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C. Verwendet wurde Kaninchen-anti-β-Aktin-Antikörper (ab8227, Abcam, Cambridge, GB) 1:10.000 verdünnt in TTBS, Kaninchen-anti-Sep15-Antikörper (ab124840, Abcam, Cambridge, GB) 1:1.500 verdünnt in TTBS, Kaninchen-anti-phospho-eIF2α (Ser51)-Antikörper (#3398, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, US) 1:1.000 verdünnt in TTBS und Kaninchen-anti-Grp78 Antikörper (ET21 G9043, Sigma, Steinheim, DE) 1:8.000 verdünnt in TTBS. Kaninchen-anti-SepP-Antiserum [186] wurde von Lutz Schomburg (Charité, Berlin, DE) bereitgestellt und 1:1.000 in TTBS verdünnt eingesetzt. Am Folgetag wurde die Membran für 1 h bei RT mit 1:50.000 in TTBS verdünntem, Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen-IgG (H+L)-HRP AP307P, Chemicon Int., Hofheim, DE) inkubiert. Dieser erkennt speziesspezifisch den Primärantikörper und ermöglicht eine Visualisierung der Antikörperbindung durch die Kopplung an Meerrettichperoxidase. Letztere setzt bei Umsetzung der *Super Signal® West Dura Extended Duration Substrate*-Lösung (ThermoScientific, Waltham, MA, US)

Chemolumineszenz frei, welche mit Hilfe der CCD-Kamera (*englisch: charge coupled device*) des *Luminescent Image Analyser LAS-3000 Systems* (Fujifilm, Tokyo, JP) detektiert wurde. Die Membran wurde anschließend mit *Fastgreen*-Lösung (0,033% w/v *Fastgreen FCF*, 3,3% Essigsäure, 10% Ethanol) gefärbt.

Zur Auswertung wurde die Farbintensität der Antikörperbanden und der *Fastgreen*-Färbung mit der *Aida Image Analyser*-Software (Version V.4.04, Raytest, Straubenhardt, DE) bestimmt. Die Farbintensität der Antikörperbanden wurde auf die Farbintensität der β -Aktin-Bande derselben Bahn oder auf die Intensität der *Fastgreen*-Färbung dieser Bahn normalisiert.

2.3.4 Gesamt-GPx-Aktivität

Die Gesamt-GPx-Aktivität wurde mit Hilfe eines gekoppelten optischen Tests, modifiziert für Mikrotiterplatten nach Brigelius [187], bestimmt. Die durch Glutathionperoxidasen (GPx) katalysierte Reduktion von H_2O_2 wird durch Kopplung an die Glutathionreduktase (GR)-katalysierte Reduktion des entstehenden GSSG gemessen, indem die Abnahme der Extinktion des hierbei verbrauchten Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADPH) bei 340 nm bestimmt wird (Abb. 2–3).

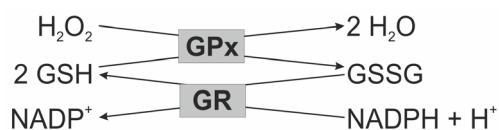


Abb. 2–3: Schematische Darstellung des gekoppelten optischen Tests zur Bestimmung der Gesamt-GPx-Aktivität

Für die Messung wurden 17,5 μl Probe, ggf. mit Homogenisationspuffer verdünnt, mit 222,5 μl Reaktionslösung (100 mM Tris/HCl pH 7,6; 5 mM EDTA; 1 mM NaN_3 ; 0,1% Triton X-100; 0,2 mM NADPH; 3,4 mM GSH; 674 mU/ml GR) in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte 10 min auf 37°C temperiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μl H_2O_2 -Lösung (finale Konzentration 50 μM) gestartet und die Extinktionsänderung bei 340 nm über 2 min im Plattenphotometer (*Synergy 2 Microplate Reader*, BioTek, Bad Friedrichshall, DE) gemessen. Die Enzymaktivität in mU/mg Protein wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz, basierend auf der ermittelten Extinktionsänderung $\Delta E/\text{min}$, berechnet ($\epsilon_{\text{NADPH}, 340 \text{ nm}} = 6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.4 Nukleinsäureanalytik

2.4.1 RNA-Isolation aus Darmepithelzellfraktionen

Für Arbeiten mit RNA wurden Diethylpyrocarbonat-behandeltes Wasser und RNase-freie Verbrauchsmaterialien verwendet. Frisch isolierte Epithelzellen (Kap. 2.1.4) wurden in 800 μl kaltem *TRIzol*[®] (Invitrogen, Karlsruhe, DE) lysiert. Nach 5 min Inkubation bei RT und 10 min Zentrifugation bei 12.000 $\times g$ und 4°C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 160 μl Chloroform versetzt,

kräftig geschüttelt und nach 3 min Inkubation bei RT 15 min bei 4°C und 15.000 x g zentrifugiert. Die RNA in der oberen wässrigen Phase wurde durch 10 min Inkubation mit 933 µl Isopropanol bei RT gefällt und durch 10 min Zentrifugation mit 12.000 x g und 4°C pelletiert. Anschließend wurde das Pellet mit 800 µl 75%-igen Ethanol gewaschen und 5 min mit 7.500 x g bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde es getrocknet und in 50 µl DEPC-Wasser gelöst. Zur Entfernung genomischer DNA erfolgte ein DNase-Verdau jeder Probe durch Zugabe von 10 U *RQ1-DNase* und 1x *RQ1-Reaktionspuffer* (Promega, Mannheim, DE) in einem Gesamtvolumen von 100 µl für 30 min bei 37°C. Zur Aufreinigung wurde anschließend jede Probe mit 100 µl *Roti[®]-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol* (25:24:1, Roth, Karlsruhe, DE) kurz gevortext und eine Minute lang mit 10.000 x g bei RT zentrifugiert. Die RNA in der wässrigen Phase wurde anschließend durch Zugabe von 220 µl eiskaltem, 100 %-igem Ethanol und 10 µl Natriumacetat für mindestens 20 min bei -20°C gefällt und 10 min mit 25.000 x g bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde zwei Mal in 600 µl 75 %-igem Ethanol gewaschen, 7 min bei 4°C mit 25.000 x g zentrifugiert, getrocknet und in 20 - 40 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

Eine Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte, basierend auf ihrer Extinktion bei 260 nm, am *NanoDrop 2000c*-Spektrophotometer (Peqlab, Erlangen, DE). Zusätzlich wurde die Reinheit der RNA-Lösung von Proteinen und Lösungsmitteln anhand der Extinktionskoeffizienten von 260/280 und 260/230 bewertet. Die Integrität der RNA wurde stichprobenartig mit Hilfe des *RNA 6000 Nano Kits* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) nach Herstelleranweisung überprüft. Dieses Kit ermöglicht die Berechnung eines, auf der Integrität der ribosomalen RNA basierenden, RNA-Integritätsindex (RIN). Alle im PCR-Array verwendeten Proben wurden ebenfalls mit diesem Kit überprüft.

2.4.2 Reverse Transkription (RT-PCR)

Für die Untersuchung der mRNA-Transkriptmengen wurde diese zunächst durch reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) in cDNA umgeschrieben. Zum Umschreiben wurden 3 µg RNA (Duodenum) bzw. 2 µg RNA (Colon) zunächst mit 0,15 pmol *Oligo(dT)₁₅-Primer* (Promega, Mannheim, DE) in einem Gesamtvolumen von 21 µl zum Aufschmelzen der Sekundärstrukturen für 4 min auf 72°C erhitzt, um eine Primeranlagerung zu ermöglichen. Anschließend wurden 24 µl Reaktionsmischung hinzugegeben, um Endkonzentrationen im Gesamtansatz von 1x *M-MLV-RT-Puffer* (Promega, Mannheim, D), 700 µM dNTP-Mischung (Bioline, Luckenwalde, DE), 0,1 mg/ml BSA (New England Biolabs, Frankfurt, DE), 4 U/µl *M-MLV Reverse Transkriptase* (Promega, Mannheim, DE) und 0,7 U/µl *RNasin[®]* Ribonuclease-Inhibitor (Promega, Mannheim, DE) zu erhalten. Die Mischung wurde für 2 h auf 37°C erhitzt, um eine

cDNA-Synthese durch die Reverse Transkriptase zu ermöglichen. Anschließend wurde der Ansatz zur Enzyminaktivierung 10 min auf 94°C erhitzt.

2.4.3 PCR-Array

Zum Screening von Unterschieden in der Expression apoptose-assoziiierter Gene wurde ein Maus-Apoptose PCR-Array (PAMM012, SABiosciences, Hilden, DE) mit gepoolten cDNA-Proben aus Kryptengrundepithelzellen (Kap. 2.1.4) durchgeführt. Je 1 µg in Nuclease freiem Wasser gelöste RNA (RIN > 8, siehe Kap. 2.4.1) wurde mit Hilfe des *RT² First Strand Kits* (SABiosciences, Hilden, DE) nach Herstelleranweisung umgeschrieben. Pro Gruppe wurden cDNA Proben von sechs Tieren vereinigt und als Template in der folgenden qPCR, welche unter Verwendung von *RT² SYBR® Green/ROXTM qPCR Master Mix* (SABiosciences, Hilden, DE) nach Herstelleranweisung durchgeführt wurde, eingesetzt. Die Daten wurden im vom Anbieter bereitgestellten *RT² Profiler PCR-Array Data Analysis* Onlineportal (Version 3.5) nach der ΔC_T -Methode ausgewertet und die Genexpressionen auf das Referenzgen β -Aktin bezogen.

2.4.4 PCR und quantitative *real time* PCR (qPCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur Genotypisierung der Versuchstiere und zur Etablierung von qPCR-Primern sowie modifiziert als quantitative *real time* PCR (qPCR) durchgeführt. Für Genotypisierungs- und Standard-PCR wurde ein *T3000 Thermocycler* der Firma Biometra (Göttingen, D) verwendet.

Tab. 2-2: Temperaturprogramm von PCRs

Schritt	Genotypisierungs-PCR			Standard-PCR		
	Temperatur	Dauer	Zyklen	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	-	95°C	5 min	-
Denaturierung	95°C	30 sec	} 40x	95°C	30 sec	} 40x
Primer-Hybridisierung	62°C	30 sec		60°C	30 sec	
Elongation	72°C	45 sec		72°C	30 sec	
Finale Elongation	72°C	10 min	-	72°C	10 min	-

Für die Genotypisierungs-PCR (siehe Kap. 2.1.1) wurden 0,5 µM Mpxin09-Primer (5'-3': TCCATGCCAACGTAGTGATT) in Kombination mit 0,5 µM GPx2-Vorwärtsprimer (5'-3': GTGCTGATTGAGAATGTGGC) für die WT-spezifische Reaktion bzw. mit 0,5 µM pNTPgK1-Primer (5'-3': CAGTTTCATAGCCTGAAGAA) für die GPx2 KO-spezifische Reaktion verwendet. Des Weiteren enthielt der Reaktionsmix 25 mU/µl *Dream Taq Green DNA-Polymerase* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US), 1x *Dream Taq Green Puffer* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US), 200 µM dNTP-Mischung (Bioline, Luckenwalde, DE) und 500 µM MgCl₂ (Promega, Mannheim, D) in einem Gesamtvolumen von 25 µl, in dem 2 µl Template (siehe Kap. 2.1.1) enthalten waren. Die Dauer der einzelnen Schritte des Temperaturprogramms zeigt Tab. 2-2.

Primer für die Quantifizierung von Transkripten durch qPCR wurden mit Hilfe des Programs PerlPrimer (V1.1.18) [188] gestaltet, wobei mindestens eine der Primersequenzen über eine Intron/ Exon-Grenze gelegt wurde, um die Amplifikation genomischer DNA zu verhindern. Die Oligonukleotidsequenzen der Primer sind in Tab. 2-3 aufgeführt.

Tab. 2-3: Verwendete Oligonukleotide

Gen	Acc. Nummer	Sequenz 5' → 3'
Atf5	NM_030693.2	fwd: TGGGCTGGCTCGTAGACTATGG rev: ACCCGCTCAGTCATCCAATCAG
β-Aktin	NM_007393.3	fwd: CACTGCCGCATCCTCTTCCT rev: GATTCCATACCCAAGAAGGAAGGC
Cidea	NM_007702.2	fwd: CGGGAATAGCCAGAGTCACCT rev: AGCAGATTCCTTAACACGGCCT
FasL	NM_010177.3	fwd: AACTCCGTGAGTTCACCAACCA rev: GGTTCCCTGTAAATGGGCCAC
Gadd34	NM_008654.1	fwd: AATCACCTTGGGCTGCACCT rev: CTCAGCGAAGTGTACCTTCCGA
Gadd153	NM_007837.3	fwd: GGAGCTGGAAGCCTGGTATGAG rev: TCTGTCAGCCAAGCTAGGGA
Grp78	NM_022310.3	fwd: ACCTATTCCTGCGTCCGGTGTG rev: TTGGACGTGAGTTGGTTCTTGG
Mki-67	NM_001081117.2	fwd: TGGCGTGAAACAAACACAAACGA rev: TTGCTTGTGGGTTTCTTTGGAGTG
Nme5	NM_080637.3	fwd: TCCAGCCGTGATTATTGAACCC rev: ATCAGCCAATCAGCGAGCCA
Pak7	NM_172858	fwd: TCCAAAGAGGTGCCAAAGAGGA rev: CAGATGTCCACCTCTGTCCCA
SepW1	NM_009156.2	fwd: ATGCCTGGACATTTGTGGCGA rev: GCAGCTTTGATGGCGGTCAC
Slc15a1	NM_053079.2	fwd: GCTCTCCACGATCATCACTCCC rev: CCAAGGACAAACACAATTAGGGCA
Tnfa	NM_013693	fwd: CCACGTCGTAGCAAACCACC rev: TACAACCCATCGGCTGGCAC
Tnfsf12	NM_011614	fwd: TTGGAACAAGTAGTCCGGCCTC rev: CCATCCACACCTGCTTGTGCT
Xbp1	NM_013842.2	fwd: GAGCAGCAAGTGGTGGATTTGG rev: ACCTCGTCAGGATCCAGCGT

Der Ansatz für die Standard-PCR und für die quantitative PCR enthielt je 0,25 µM Vorwärts (*fwd*)- und Rückwärts (*rev*)-primer, 25 mU/µl *TrueStart™ Taq Polymerase*, 1x *TrueStart* Puffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US), 200 µM dNTP-Mischung (Bioline, Luckenwalde, DE) und 1,5 mM MgCl₂ (Promega, Mannheim, DE) in einem Gesamtvolumen von 25 µl, in dem 1 µl cDNA-Template enthalten war. Zusätzlich enthielt der Ansatz für die qPCR 0,1x *SYBR Green®* (Molecular Probes, Eugene, US). Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA, was die

Messung der Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{Ex}} = 497 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Em}} = 520 \text{ nm}$ am Ende jedes Elongationsschritts als Maß für die Kopienanzahl des untersuchten Transkripts ermöglicht.

Die qPCR-Primer wurden zunächst durch Standard-PCR (Temperaturschema siehe Tab. 2-2) und anschließendes Auftrennen der PCR-Produkte in einem 1,5%igem Agarosegel überprüft. Die mit Hilfe des *Innuprep Doublepure Kits* (Analytik Jena, Jena, DE) nach Herstelleranweisung aufgereinigten PCR-Produkte wurden zur Herstellung einer Standardreihe innerhalb eines Konzentrationsbereichs von 10^3 bis 10^9 Molekülen/ μl für die qPCR verwendet.

Zur Quantifizierung von Transkripten mittels qPCR kamen 96-Loch-Platten, das *MxPro 3005* qPCR-System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US) und die dazugehörige Software (*MxPro-Mx3005P*, V4.10) zum Einsatz. Das Temperaturprogramm entsprach dem in Tab. 2-2 für die Standard-PCR beschriebenen, nur dass anstelle des finalen Elongationsschrittes eine Schmelzkurvenanalyse (30 sec bei 95°C , 30 sec bei 62°C und 30 sec bei 95°C) durchgeführt wurde, um Produktgröße bzw. Spezifität der PCR-Reaktion zu überprüfen. Mit Hilfe der oben beschriebenen Standardreihe konnte anschließend die Kopienanzahl in der Probe bestimmt werden. In der qPCR wurde cDNA 1:5 verdünnt eingesetzt. Alle Messungen wurden als Duplikate oder Triplikate durchgeführt. Die Daten wurden auf die Expression des β -Aktin-Gens normalisiert.

Die Xbp1 (engl.: *X-box binding protein 1*) mRNA wird durch IRE1 (engl.: *inositol-requiring enzyme-1*) im Rahmen der ER-Stress-Antwort gespleißt. Die Menge der gespleißten Xbp1_s-mRNA ist deshalb ein Marker für die IRE1-Aktivität und somit für ER-Stress [189]. Zur Bestimmung der Xbp1_s-Transkriptmenge wurde eine qPCR, wie oben beschrieben, mit einer abweichenden *Annealing*temperatur von 59°C , unter Verwendung der Primer für die Xbp1_s-Isoform nach [189] (fwd: GAGTCCGCAGCAGGTG, rev: GTGTCAGAGTCCATGGGA) durchgeführt.

2.5 Histochemie und Immunhistochemie

2.5.1 Probenaufarbeitung

Gewebeproben für immunhistochemische Analysen wurden direkt nach Entnahme in Einbettkassetten gelegt, für 24 h bei RT in 4%iger Formaldehydlösung (Roth, Karlsruhe, DE) fixiert und anschließend 24 h in fließendem Leitungswasser gewässert. Dann erfolgte eine Entwässerung der Proben im Shandon Hypercenter XP (GMI, Ramsey, MN, US) nach dem in Tab. 2-4 aufgeführten Protokoll, in einer aufsteigenden Ethanolreihe, gefolgt von Toluol und Paraffin. Im Anschluss wurden die Proben am Shandon Histocentre 2 (GMI, Ramsey, MN, US) in Paraffin (Schmelzpunkt 56°C - 58°C , Engelbrecht, Edermünde, DE) eingebettet.

Tab. 2-4: Dehydrierung von Proben zur Einbettung in Paraffin

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

Mit einem Rotationsmikrotom (HM 355 S Microm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US) wurden ca. 2 µm dicke Schnitte von den Paraffinblöcken angefertigt, welche bei 38°C im Wasserbad gestreckt, anschließend auf Objektträger aufgezogen und bei 38°C im Wärmeschrank getrocknet wurden. Das Entparaffinieren der Schnitte erfolgte über Toluol und eine absteigende Ethanolreihe (Tab. 2-5) und wurde, wie auch die Färbungen, im *Multistainer Bath Array* (ST5020, Leica, Wetzlar, DE) durchgeführt.

Tab. 2-5: Deparaffinierung und Rehydrierung von Proben für Färbungen und Dehydrierung zur Einbettung

<u>Deparaffinierung/ Rehydrierung</u>		<u>Dehydrierung</u>	
Substanz	Inkubationszeit	Substanz	Inkubationszeit
Toluol	2 min	Ethanol 70%	20 sec
Toluol	3 min	Ethanol 96%	1 min
Ethanol 100%	2 min	Ethanol 100%	2 min
Ethanol 100%	3 min	Ethanol 100%	3 min
Ethanol 96%	1 min	Toluol	3 min
Ethanol 70%	1 min	Toluol	3 min
Wasser (dest.)	1 h :30 min		

Die entparaffinierten Schnitte wurden anschließend den im Folgenden beschriebenen histochemischen bzw. immunhistochemischen Färbeprotokollen unterzogen. Die gefärbten Schnitte wurden wiederum im *Multistainer Bath Array ST5020* über eine aufsteigende Ethanolreihe und Toluol entwässert (Tab. 2-5) und anschließend im Einbettgerät CV5030 (Leica, Wetzlar, DE) in Histofluid (Engelbrecht, Edermünde, DE) eingebettet.

2.5.2 Immunhistochemische Färbungen

Die entparaffinierten Objektträger wurden in Kunststoffküvetten mit Citratpuffer (*DAKO Real™ Target Retrieval solution*, pH 6,0, DAKO, Glostrup, DK) gestellt und zum Antigenaufschluss in der Mikrowelle 2 x 5 min mit zwischenzeitlichem, 5 minütigem Abkühlen hitzebehandelt. Nach anschließendem zweimaligem Spülen in destilliertem Wasser wurde die endogene Peroxidaseaktivität der Proben durch 10 min Inkubation in

3% H₂O₂ bei RT blockiert. Nach 2 x 2 min Waschen in destilliertem Wasser und 5 min Waschen in TTBS (50 mM TRIS; 150 mM NaCl; 0,1% Tween-20; pH 7,6) erfolgte das Aufbringen des Primärantikörpers. Hierzu wurden die Proben mit einem wasserbarrierebildendem Stift (*DAKO Pen*, DAKO, Glostrup, DK) umrandet und ggf. durch 10 minütige Inkubation mit Antikörperverdünnungsmedium (*Antibody Diluent with background reducing components*, DAKO, Glostrup, DK) zur Blockierung unspezifischer Bindungen inkubiert. Die Inkubation mit Primärantikörperverdünnung (Tab. 2-6) erfolgte in wasserdampf-gesättigten Kammern bei 4°C über Nacht. Am Folgetag wurden die Objektträger 2 x 5 min in TTBS gewaschen und 1 x in TBS gespült. Anschließend wurde Sekundärantikörperlösung (Tab. 2-6) auf die Schnitte getropft und 30 min bei RT in einer wasserdampf-gesättigten Kammer inkubiert. Nach Abschütteln der Antikörperlösung und zweimaligem Waschen in TTBS sowie einmaligem Waschen in TBS wurde die Antikörperbindung durch Zugabe von 3,3'-Diaminobenzidin-Farblösung (*Liquid DAB+ Substrate Chromogen System*, DAKO, Glostrup, DK) visualisiert. Nach 1 min Inkubation bei RT wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gespült und anschließend, wie unter Kap. 2.5.1 beschrieben, entwässert und eingebettet.

Tab. 2-6: Primär- und Sekundärantikörper für immunhistochemische Färbungen

Primärantikörper	Produkt Nr./ Hersteller	Verdünnung	Blockieren	Sekundärantikörper (Nichirei, Tokyo, JP)
Maus-anti-β-Catenin	#614 153 BD Transduction Laboratories™, Lexington, KY, US	1:8.000	Blockier- schritte im Kit	N-Histofine® Mousestain Kit
Ratte-anti-Ki-67	M7249, Dako, Glostrup, DK	1:60	Nein	N-Histofine® Simple Stain Mouse MAX PO for mouse tissues, anti-rat
Kaninchen-anti-PCNA	#2714-1 Epitomics, Burlingame, CA, US	1:20.000	10 min	N-Histofine® Simple Stain Mouse MAX PO for mouse tissues, anti-rabbit
Kaninchen-anti-p53	NCL-p53-CM5p, Novocastra, Newcastle, UK	1:1.600	10 min	N-Histofine® Simple Stain Mouse MAX PO for mouse tissues, anti-rabbit
Kaninchen-anti-GPx2	GBF, Braunschweig; [190]	1:12.000	Nein	N-Histofine® Simple Stain Mouse MAX PO for mouse tissues, anti-rabbit
Kaninchen-anti-GPx1	ab22064, Abcam, Cambridge, UK	1:6.500	Nein	N-Histofine® Simple Stain Mouse MAX PO for mouse tissues, anti-rabbit
Ratte-anti-F4/80	MCA497, AbD Serotec, Oxford, UK	1:8.000	Nein	N-Histofine® Simple Stain Mouse MAX PO for mouse tissues, anti-rat

2.5.3 Hämatoxylin- und Eosinfärbung

Der positiv geladene Farbstoff Hämalaun ermöglicht eine Anfärbung basophiler Zellstrukturen wie DNA. Die hier verwendete Hämalaunfärbung nach Mayer (1920) liefert eine selektive, starke blaue Kernfärbung und wurde zur Zählung von Apoptosen und Mitosen in Darmschnitten sowie optional als Gegenfärbung nach immunhistoche-

mischen Färbungen verwendet. Alle hier beschriebenen Färbungen wurden im Multistainer Bath Array ST5020 (Leica, Wetzlar, DE) durchgeführt.

Die entparaffinierten Schnitte wurden für 5 min in Mayers Hämalaulösung aus Hämatoxylin (3,3 mM Hämatoxylin; 1 mM NaIO₃; 105 mM Kalialaun; 302 mM C₂H₃Cl₃O₂; 5,2 mM Zitronensäure) gestellt und anschließend 10 min in H₂O gebläut. Für leichte Gegenfärbungen nach Immunfärbungen erfolgte nur eine 50 sec-Inkubation in der Farblösung. Im Anschluss an die PAS/AB-Färbung (siehe Kap. 2.5.4) wurden die Schnitte 2 min in der Farblösung inkubiert und 5 min gewässert. Für Hämatoxylin/Eosin (H/E)-Färbungen erfolgte nach 1 minütiger Inkubation in Hämalaulösung und 5 minütigem Waschen in H₂O 50 s Inkubation in 1% wässriger Eosinlösung mit anschließendem 30 minütigem Waschen in H₂O. Eosin ermöglicht eine Färbung des Cytoplasmas. Im Anschluss an die Färbungen wurden die Präparate, wie unter Kap. 2.5.1 beschrieben, entwässert und eingebettet.

2.5.4 Färbung von Mucinen

In einer kombinierten Färbung wurden neutrale Mucine mittels Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) magenta und saure Mucine mit Alcianblau (AB) blau gefärbt. Die entwässerten Schnitte wurden zunächst in 3% Essigsäure 3 min inkubiert, anschließend 30 min in 1% Alcianblaulösung (in 3% Essigsäure, pH 2,5) inkubiert und dann mit 3% Essigsäure gespült. Nach 5 min Waschen in H₂O wurden die Proben 10 min in 1%iger wässriger Periodsäurelösung oxidiert, anschließend 3 x 2 min in H₂O gespült und 15 min in Schiffchem Reagenz (Merck, Darmstadt, DE) inkubiert. Nach 3 x 2 min Spülen mit Sulfitwasser (0,5% Na₂S₂O₅; 45 mM HCl) wurden die Proben 15 min unter fließendem Leitungswasser gespült und anschließend, wie unter Kap. 2.5.3 beschrieben, mit Hämatoxylin gefärbt und, wie unter Kap. 2.5.1 aufgeführt, entwässert und eingebettet.

2.5.5 Auswertung immunhistochemischer Färbungen und Zählung von Apoptosen und Mitosen

Alle histologischen Präparate wurden vor der Analyse verblindet. Die Quantifizierung von Apoptosen und Mitosen erfolgte an Hämatoxylin-gefärbten Schnitten des distalen Colons anhand morphologischer Kriterien. Apoptosen wurden anhand von Merkmalen, wie Chromatinkondensation, Schrumpfung und Blasenbildung/ Vakuolisierung, identifiziert [80]. Mitosen wurden ebenfalls, anhand von Chromatinkondensation und den für die einzelnen Mitosestadien charakteristischen Erscheinungsformen morphologisch identifiziert. Apoptosen und Mitosen wurden ausschließlich in Epithelzellen gezählt, wenn die entsprechende Krypte vollständig longitudinal angeschnitten war. Hierzu wurden die Krypten gedanklich der Länge nach in vier Abschnitte aufgeteilt, wobei das 4.

Kryptenviertel dem Kryptengrund entspricht. Es wurden je Tier 200 Krypten ausgewertet.

Die Auswertung der Immunfärbungen von GPx1, GPx2 und p53 erfolgte anhand eines Punktesystems von 0 (keine Färbung) bis 3 bzw. 4 (starke bzw. sehr starke Färbung). Für p53 wurden nukleäre und cytosolische Färbung getrennt betrachtet. Die Länge der PCNA-positiven Zone wurde in vollständig longitudinal angeschnittenen Krypten des distalen Colons mit Hilfe der *Mirax Viewer* Software (V1.12.22.0, Zeiss, Jena, DE) in 100 Krypten je Tier ausgemessen. F4/80-positive Zellen in der an eine Krypte grenzenden *Lamina propria* wurden im distalen und transversen Colon gezählt. Es wurden je Tier zehn longitudinal vollständig angeschnittene Krypten ausgewertet, welche nicht an Lymphfollikel grenzten.

MDF in Darmrollen des distalen Colons wurden anhand der, in der PAS/AB-Färbung sichtbaren, Becherzelledepletion identifiziert. Die H/E-Färbung wurde zur weiteren Charakterisierung der MDF bezüglich Dysplasie, Lage und Umgebung herangezogen. Zur Beurteilung der Expression von GPx2 und β -Catenin in den identifizierten Läsionen wurde ein Punktesystem verwendet, in welchem nach luminaler und basaler Kryptenhälfte sowie bei β -Catenin nach membranständiger oder kernständig/ cytosolischer Expression unterschieden wurde, um Unterschiede in der basalen Expression dieser Proteine berücksichtigen zu können. Hierauf beruhend, wurde die GPx2-Expression in die Kategorien a) niedrigere Expression, b) normale Expression und c) erhöhte Expression eingeteilt. Die β -Catenin-Expression wurde weiter differenziert in a') normale Expression, b') leicht erhöhte Expression, c') stark erhöhte Expression und d') sowohl membranständig, als auch im Kern/Cytosol sehr stark erhöhte Expression.

2.6 Selenmessung

Die Selenmessung in organischen Materialien wurde fluorimetrisch nach [191, 192] durchgeführt. Es wurden 20-30 mg Gewebe bzw. in Abhängigkeit vom erwarteten Selengehalt 30/60/80 mg Futter (-Se/+Se/++Se) eingewogen und mit 100 μ l Wasser (bidestilliert) aufgefüllt. Zum Probenaufschluss wurden 500 μ l Säuremischung (70% HClO₄ und 65% HNO₃ im Verhältnis 1:4) hinzugegeben und in vier Zyklen 30 min bei 100°C, 30 min bei 120°C, 20 min bei 140°C und 20 min bei 160°C im Heizblock (Thermomixer 5436, Eppendorf, Wessling-Berzdorf, DE) erhitzt. Zwischen den Erhitzungsperioden wurden die Probenröhrchen abgekühlt und zur Druckentlastung kurz geöffnet. Im Anschluss wurden die Proben 2 h bei 190°C erhitzt und über Nacht abgekühlt. Alle in den Proben enthaltenen Selenverbindungen wurden hierbei durch die Säuren zu fünfwertigem Selen oxidiert. Am Folgetag wurden 500 μ l 37%ige HCl zu den Proben gegeben und offen zunächst für 15 min bei 90°C und dann 45 min bei 150°C erhitzt. Hierbei wurde fünfwertiges zu vierwertigem Selen reduziert. Letzteres

ermöglicht den fluorimetrischen Nachweis, indem durch Komplexierung mit 2,3-Diaminonaphtalen (DAN) ein fluoreszierendes Piazselenol entsteht [191]. Hierfür wurden 2 ml 2,5 mM EDTA (pH 8,0) und 600 µl DAN-Lösung (1 mg/ml in 1 M HCl) zu den Proben gegeben, 30 min bei 55°C im Wasserbad inkubiert, auf RT abgekühlt und mit 3 ml Cyclohexan extrahiert. Nach einer, über Nacht erfolgten, Phasentrennung wurde die organische Phase in einem Lumineszenzspektrometer (*SLM Aminco® Bowman Series 2*, Thermo Electron Scientific, Madison, WI, US) bei $\lambda_{\text{Ex}} = 364$ nm und $\lambda_{\text{Em}} = 520$ nm gemessen. Der Selengehalt wurde anhand einer Selen-Standardreihe mit einem Selengehalt von 0 bis 450 µg/l (Sigma, Steinheim, DE) bestimmt und auf die ursprüngliche Organ- bzw. Futtereinwaage bezogen.

2.7 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Versuchsdaten wurden die Programme *Microsoft® Office Excel 2003* und *GraphPad PRISM®* (Version 5.0) verwendet. Auswertung und graphische Darstellung erfolgten durch Berechnung des arithmetischen Mittelwerts und der Standardabweichung.

Die Bewertung von Unterschieden zwischen zwei Behandlungsgruppen erfolgte durch den zweiseitigen Student's T-Test. Die statistische Signifikanz von Unterschieden zwischen mehr als zwei voneinander unabhängigen Gruppen wurde durch zweifache Varianzanalyse (engl.: *two way analysis of variance*, 2way ANOVA) mit Bonferronis Post-Test ermittelt.

Die statistische Auswertung des Einflusses von GPx2 und Selen auf die Tumorzinzidenz erfolgte an Hand von Kreuztabellen (SPSS, Version 16, IBM) mittels *Fisher-exact-Test*. Um die Tumorzinzidenz einzubeziehen wurden Kreuztabellen erstellt, in welchen die Tumorzinzidenz mit der Tumorzinzidenz gewichtet wurde. Die Durchführung der SPSS-Analysen wurde unterstützt von Dr. Martin Osterhoff (Charité-Universitätsmedizin Berlin und Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Nuthetal).

3 Ergebnisse

3.1 Selenstatus und Selenoproteinexpression

GPx2 KO- und WT-Mäuse wurden für diese Arbeit in einem Langzeitversuch zur AOM-induzierten Colonkanzerogenese, einem Kurzzeitversuch zur Erforschung der akuten Effekte von AOM sowie in Fütterungsstudien mit verschiedenen Selendiäten untersucht. Abhängig vom Versuchsaufbau wurden die Mäuse vom Absetzen bis zur Tötung entweder vier (Kurzzeit-AOM-Versuch), 16 (Fütterungsstudien) oder 26 Wochen (Langzeit-AOM-Versuch) mit drei verschiedenen Selendiäten gefüttert (Kap. 2.1.2). Die als -Se bezeichnete Diät enthielt 0,086 mg Selen/ kg Futter oder weniger, was etwa der Hälfte der empfohlenen Zufuhr für Mäuse von 0,15 mg Selen/ kg Futter entspricht [176] und eine marginale Selendefizienz bewirken sollte. Im Vergleich hierzu wurde eine selenadäquate Diät (+Se) mit 0,15 mg Selen/ kg, welche den Selenbedarf der Tiere exakt decken sollte sowie eine selensupplementierte Diät (++Se), welche mit 0,6 mg Selen/ kg das Vierfache der selenadäquaten Diät enthielt, und somit eine über die Nahrung erreichbare, hohe Selenaufnahme darstellt, gefüttert.

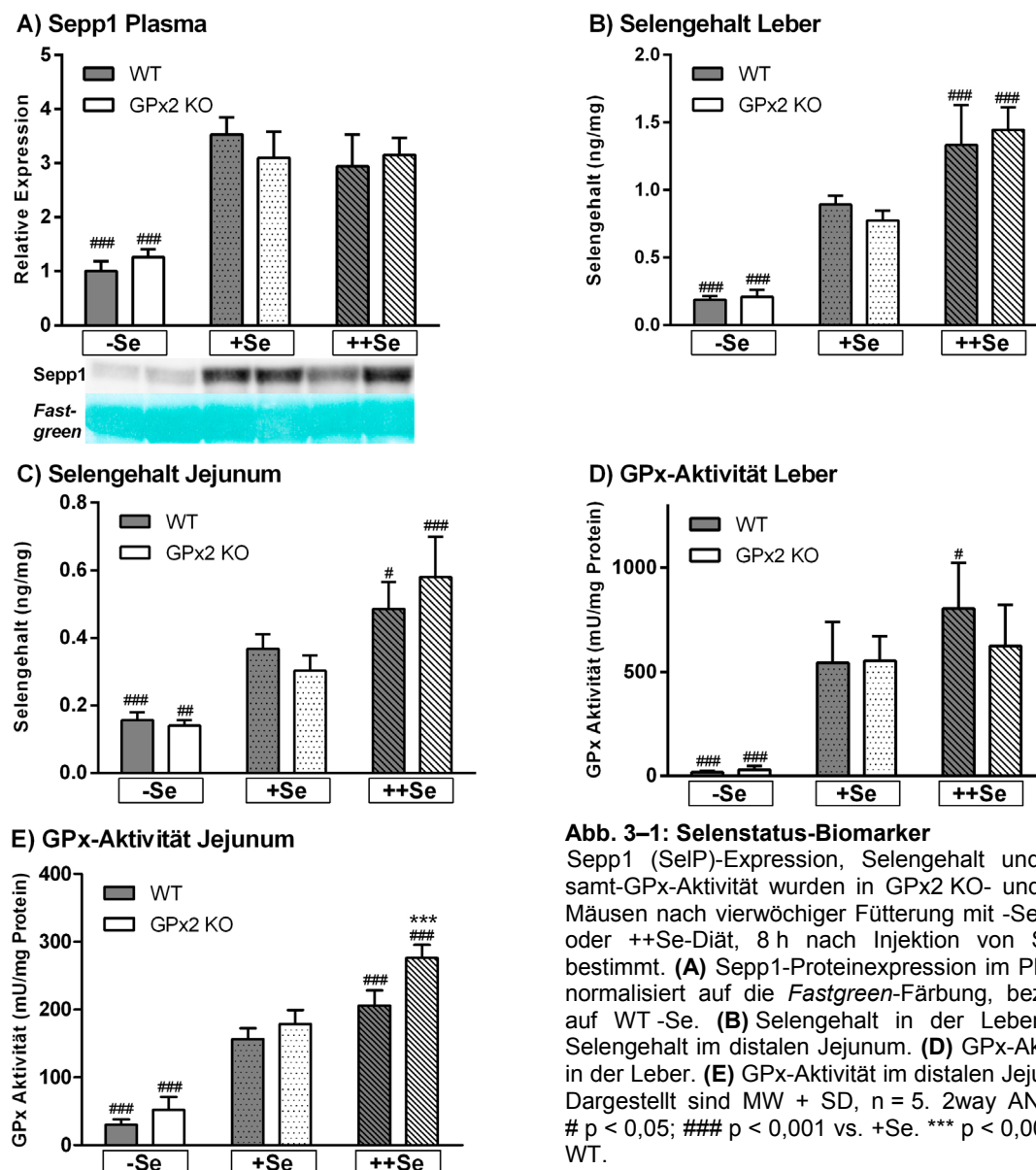
Zur Verifizierung des Selenstatus der Mäuse wurden routinemäßig mindestens die Gesamt-GPx-Aktivität und der Selengehalt der Leber überprüft. Im Folgenden sind Daten für die Kontrollgruppen im Kurzzeit-AOM-Versuch dargestellt, da in diesem auf Grund der nur vierwöchigen Fütterungsperiode die Einstellung des Selenstatus am kritischsten zu beurteilen ist. Die +Se-Gruppe wurde hier als Bezug gewählt.

3.1.1 Biomarker für den Selenstatus

Zur Beurteilung der systemischen Selenversorgung erfolgte die Messung der SelP (Sepp1)-Expression im Plasma und des Selengehalts sowie der Gesamt-GPx-Aktivität der Leber. Des Weiteren wurden zur Charakterisierung des Selenstatus im Darm GPx-Aktivität und Selengehalt im distalen Jejunum gemessen. Die Bestimmung dieser Parameter im Colon war nicht möglich, da dieses für die Tumoranalyse bzw. histologische Analysen benötigt wurde. Während die SelP-Expression im Plasma in -Se-Tieren im Vergleich zu +Se signifikant um die Hälfte geringer war, wurde von +Se zu ++Se keine weitere Steigerung beobachtet (Abb. 3–1A). Der Selengehalt in Leber und Jejunum (Abb. 3–1B, C) wurde durch die Selenfütterung sowohl von -Se zu +Se, als auch von +Se zu ++Se, deutlich gesteigert. Die GPx-Aktivität in der Leber reagierte am stärksten auf Selenmangel. Im Vergleich zu den selenadäquaten Gruppen wurde sie in den selendefizienten Gruppen auf etwa 5% abgesenkt (Abb. 3–1D). Von +Se zu ++Se war hingegen nur im WT eine schwache Steigerung zu beobachten.

Im Jejunum war die Gesamt-GPx-Aktivität im -Se-Zustand auf ca. 20% der +Se-Gruppen reduziert, während es durch Fütterung der ++Se-Diät zu einer Steigerung auf

130% (WT) bzw. 150% (GPx2 KO) der +Se-Gruppen kam (Abb. 3–1E). Bei Fütterung der ++Se-Diät war die Gesamt-GPx-Aktivität des Jejunums im GPx2 KO signifikant höher als im WT. In den Versuchen mit 16 oder 26 Wochen Fütterungsdauer wurden ähnliche Effekte des Selengehalts auf die GPx-Aktivität in Leber und Jejunum ermittelt (Daten nicht gezeigt). Die schwache Steigerung der Leber-GPx-Aktivität im WT von +Se zu ++Se blieb jedoch in einigen untersuchten Gruppen aus.



Die mRNA-Expression von Selenoprotein W (SelW) (Sepw1) im Darm reagiert besonders sensitiv auf die Selenversorgung [193] und wurde deshalb für eine Beurteilung des Selenstatus in Epithelzellfraktionen aus dem Kryptengrund des Colons herangezogen, welche immer nach einer 16-wöchigen Fütterungsperiode gewonnen wurden. Unabhängig vom Genotyp waren die Sepw1-mRNA-Gehalte im -Se-Zustand signifikant niedriger und im ++Se-Zustand signifikant höher als im +Se-Zustand (Abb. 3–2).

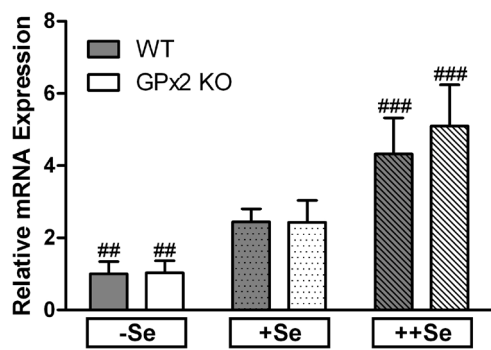


Abb. 3–2: Selenabhängigkeit der Sepw1 mRNA-Expression

Der Sepw1 mRNA-Gehalt wurde in Epithelzellen der Kryptengrund-Fraktion des distalen Colons von GPx2 KO- und WT-Mäusen nach 16-wöchiger Fütterung mit -Se, +Se oder ++Se-Diät bestimmt. Dargestellt sind auf β -Aktin normalisierte Daten, bezogen auf die Gruppe WT -Se. MW + SD, n = 5. 2way ANOVA: ## p < 0,01; ### p < 0,001 vs. +Se.

3.1.2 Gradient der GPx2-Expression in der Colonkrypte und Abhängigkeit vom Selenstatus

Die GPx2-Expression wies im distalen Colon einen deutlichen Gradienten entlang der Kryptenachse auf. Während GPx2 im Bereich der Kryptenspitze kaum exprimiert war, stieg die Expression über die Kryptenmitte zum Kryptengrund hin stark an (Abb. 3–3).

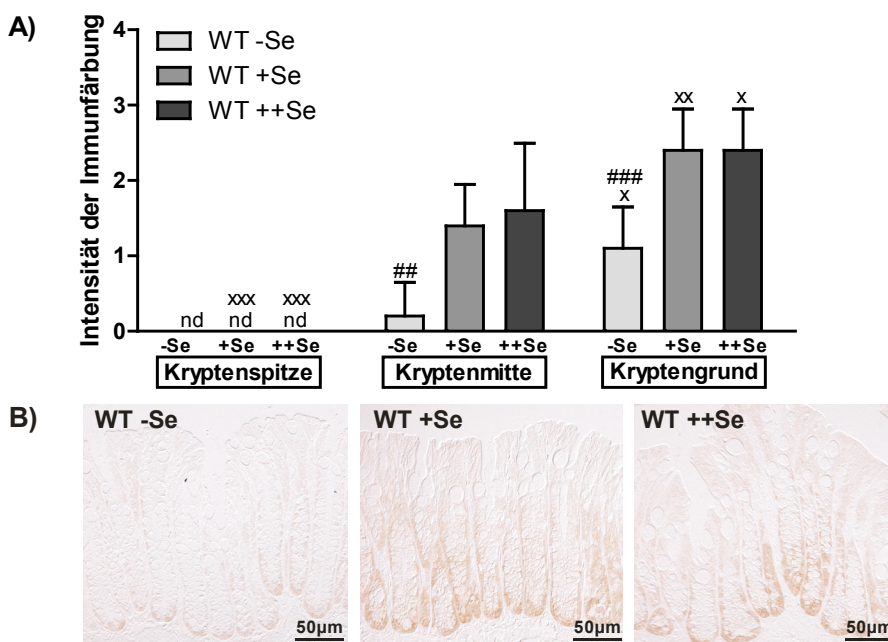


Abb. 3–3: GPx2-Immunfärbung des Colons in Abhängigkeit vom Selenstatus

Die Intensität der GPx2-Immunfärbung des distalen Colons von WT-Mäusen nach vierwöchiger Fütterung mit -Se, +Se oder ++Se-Diät, 8 h nach Injektion von Saline wurde mit Hilfe eines Punktesystems bewertet. **(A)** Intensität der GPx2-Immunfärbung. Dargestellt sind MW + SD, n = 5. 2way ANOVA: ## p < 0,01; ### p < 0,001 vs. die entsprechende +Se-Gruppe. x p < 0,05; xx p < 0,01 und xxx p < 0,001 vs. Kryptenmitte. **(B)** Repräsentative Aufnahmen der GPx2-Immunfärbung im distalen Colon des WT.

Des Weiteren war in Kryptenmitte und Kryptengrund eine signifikant geringere Farbintensität bei -Se im Vergleich zu +Se zu beobachten. Zwischen +Se und ++Se wurden hingegen keine Unterschiede festgestellt. Dargestellt sind Daten der Saline-behandelten Kontrollgruppen im AOM-Kurzzeitversuch. Durch AOM wurde die GPx2-Expression nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

3.1.3 Erhöhte Proteinexpression von GPx1 und Sep15 im GPx2 KO

Der Verlauf der GPx1-Expression in der Darmkrypte war gegenläufig zu dem der GPx2. Im WT (+Se und ++Se) war die GPx1-Expression in der Kryptenspitze und -mitte signifikant höher als im Kryptengrund (Abb. 3–4). Im WT konnte im –Se-Zustand keine GPx1-Färbung in Epithelzellen detektiert werden, bei +Se war sie deutlich erhöht, während zwischen +Se und ++Se kein Unterschied bestand. Durch AOM-Gabe wurde GPx1 nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

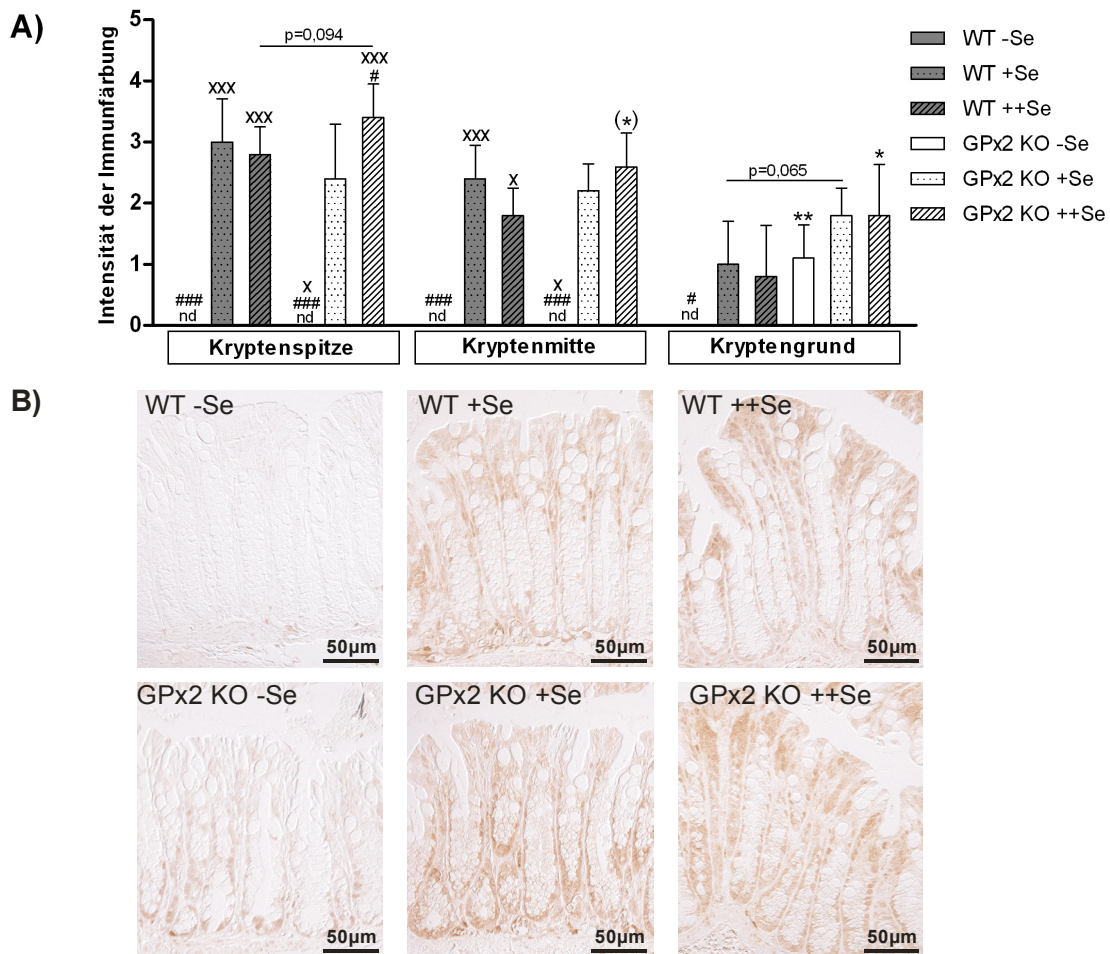


Abb. 3–4: GPx1-Immunfärbung des Colons in Abhängigkeit vom Selenstatus

Die Intensität der GPx1-Immunfärbung des distalen Colons von GPx2 KO- und WT-Mäusen nach vierwöchiger Fütterung mit -Se, +Se oder ++Se-Diät 8 h nach Injektion von Saline wurde mit Hilfe eines Punktesystems bewertet. **(A)** Intensität der GPx1 Immunfärbung. Dargestellt sind MW + SD, n = 5. 2way ANOVA: # p < 0,05; ### p < 0,001 vs. die entsprechende +Se-Gruppe. * p < 0,05; ** p < 0,01 vs. WT. x p < 0,05; xx p < 0,001 vs. Kryptengrund. Zweiseitiger Student's T-Test: (*) p < 0,05 vs. WT und p-Werte wie angegeben. **(B)** Repräsentative Photos der GPx1-Immunfärbung im distalen Colon von WT- und GPx2 KO-Mäusen.

In GPx2 KO-Tieren war die GPx1-Expression vor allem am Kryptengrund signifikant höher als im WT. Dieser Effekt war auch im –Se-Zustand zu beobachten, wo im WT keine GPx1 exprimiert wurde. Des Weiteren wurde die GPx1-Expression in GPx2 KO-Mäusen nicht nur von -Se zu +Se, sondern in der Kryptenspitze auch von +Se zu ++Se signifikant gesteigert.

Um zu überprüfen, ob neben GPx1 auch andere selenmangelsensitive Selenoproteine durch den GPx2 KO beeinflusst werden, wurde Sep15 in Epithelzellfraktionen des Kryptengrunds aus dem distalen Colon untersucht. In beiden Genotypen war der Sep15-Proteingehalt im –Se-Zustand signifikant niedriger als im +Se-Zustand. Es konnte aber keine weitere Steigerung mit ++Se festgestellt werden. Der Sep15-Gehalt im GPx2 KO im Vergleich zum WT war bei +Se und ++Se signifikant, im –Se-Zustand tendenziell erhöht. Auf mRNA-Ebene wurde die Sep15-Expression im Kryptengrund des Colons weder durch den Genotyp noch durch den Selenstatus beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

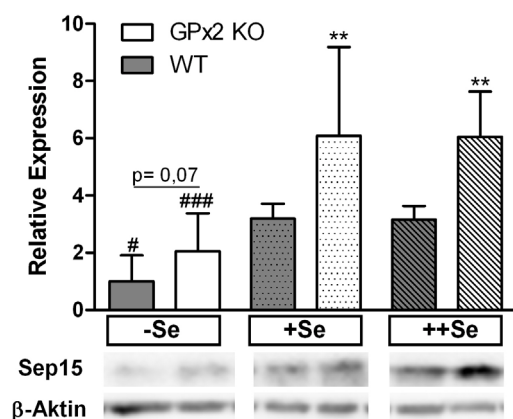


Abb. 3–5: Sep15-Proteinexpression im Kryptengrund des Colons

Die Sep15-Expression wurde in Kryptengrund-Epithelzellfraktionen des distalen Colons von GPx2 KO- und WT-Mäusen nach 16-wöchiger Fütterung mit –Se-, +Se- oder ++Se-Diät mittels *Western Blot* bestimmt. Dargestellt sind auf die β -Aktin-Expression normalisierte Daten, bezogen auf WT –Se als MW + SD, n = 6-9. 2way ANOVA: # p < 0,05; ### p < 0,001 vs. die entsprechende +Se-Gruppe. ** p < 0,01 vs. WT. p-Wert aus zweiseitigem Student's T-Test wie angegeben.

Zusammenfassend war die Einstellung des Selenstatus durch Fütterung der Selen-diäten erfolgreich. Nicht alle untersuchten Selenoproteine waren bei Fütterung der +Se-Diät bereits gesättigt. Im GPx2 KO konnte die bereits zuvor beschriebene [62] erhöhte GPx1-Expression im Vergleich zum WT bestätigt werden. Zudem wurde auch eine erhöhte Sep15-Expression im Kryptengrund festgestellt.

3.2 Erhöhte Apoptose und Sensitivität gegenüber oxidativem Stress im Darmepithel von GPx2 KO-Tieren

Die Untersuchung von Apoptose und oxidativem Stress erfolgte in isolierten Darmepithelzellen aus dem Kryptengrund, dem Kompartiment mit der höchsten GPx2-Expression im WT.

3.2.1 Oxidativer Stress und DNA-Schädigung

Da die GPx2 Hydroperoxide reduziert, wurde überprüft, ob ihr Fehlen *in vivo* oxidativen Stress hervorruft. Dazu erfolgte eine Bestimmung reaktiver Spezies (RS) mittels DHR-Assay in frisch isolierten Kryptengrundepithelzellen (Abb. 3–6). Weder im Colon noch im Duodenum zeigte sich eine signifikante Beeinflussung der basalen Rhodaminfluoreszenz durch Genotyp oder Selenstatus. Die Behandlung mit dem Hydroperoxid 13-Hydroperoxy-Linolsäure (HPODE) bewirkte im Colon nur in –Se-Zellen eine signifikante Steigerung der Fluoreszenzintensität (Abb. 3–6A), die im GPx2 KO

signifikant höher war als im WT. Im Duodenum führte HPODE nur im GPx2 KO bei -Se zu einem Anstieg der Rhodaminfluoreszenz (Abb. 3–6B).

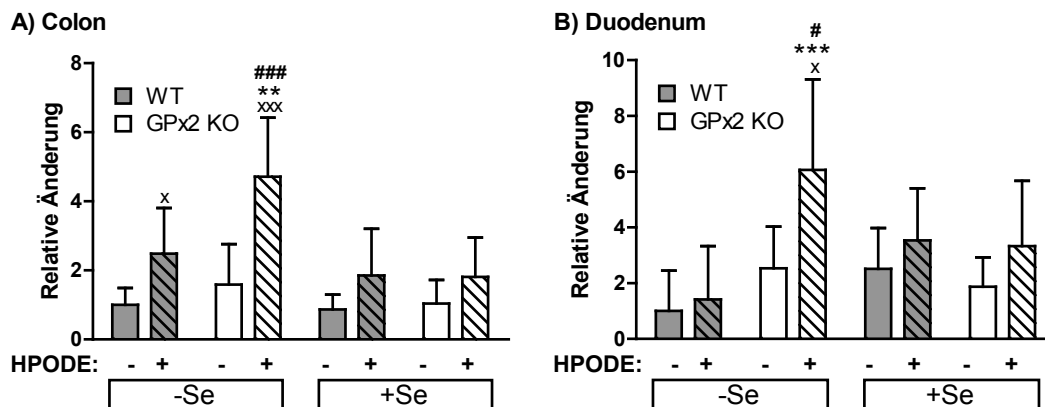


Abb. 3–6: Suszeptibilität für HPODE

Die Bestimmung reaktiver Spezies mittels DHR-Assay wurde in Epithelzellen der Kryptengrundfraktion des distalen Colons (A) und des Duodenums (B) von GPx2 KO- und WT-Mäusen nach 16-wöchiger Fütterung mit -Se oder +Se-Diät durchgeführt. Die Zellen waren entweder unbehandelt oder stimuliert mit 100µM HPODE (Colon) bzw. 50µM HPODE (Duodenum). Dargestellt sind MW + SD der Fluoreszenzintensitäten, normalisiert auf die eingesetzte Zellzahl und bezogen auf die Gruppe WT -Se -HPODE, n = 6-8. 2way ANOVA: # p < 0,05; ### p < 0,001 vs. +Se. ** p < 0,01; *** p < 0,001 vs. WT. x p < 0,05; xxx p < 0,001 vs. -HPODE.

Um DNA-Schäden in Epithelzellen aus dem Kryptengrund des Colons zu analysieren, wurde ein *Comet*-Assay durchgeführt, mit dem durch Verwendung von hOGG1 gleichzeitig oxidative DNA-Schäden detektiert wurden (siehe Kap. 2.2.5). Hierbei fanden sich in der selenarmen Gruppe mehr DNA-Schäden in GPx2 KO-Zellen als im WT (Abb. 3–7).

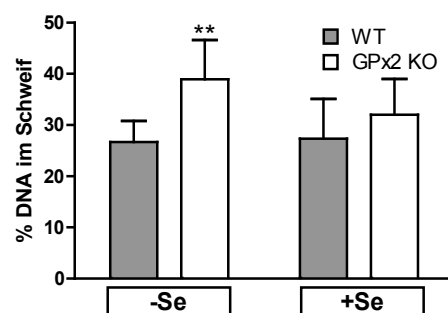


Abb. 3–7: Basale DNA-Schäden

Der Grad der DNA-Schädigung in Kryptengrundepithelzellen des distalen Colons nach 16-wöchiger Fütterung mit -Se oder +Se-Diät wurde mittels hOGG1-modifiziertem Comet-Assay bestimmt. Dargestellt wird % DNA im Schweif als MW + SD, n = 6-8. 2way ANOVA: ** p < 0,01 vs. WT.

3.2.2 Caspase-abhängige Apoptose

Da in histologischen Untersuchungen eine erhöhte Anzahl von Apoptosen im Kryptengrund des Colons von GPx2 KO-Mäusen festgestellt worden war [80], wurde die Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 als Maß für Caspase-abhängige Apoptose in Kryptengrundepithelzellen bestimmt. Im Colon war in der -Se-Gruppe die Caspase 3/7-Aktivität im GPx2 KO signifikant höher als im WT (Abb. 3–8A). Im Duodenum wurden keine Unterschiede zwischen den Genotypen beobachtet (Abb. 3–8B). Insgesamt war die Caspase 3/7-Aktivität im Duodenum, unabhängig vom Genotyp, deutlich höher als im Colon und im -Se-Zustand signifikant höher als mit +Se.

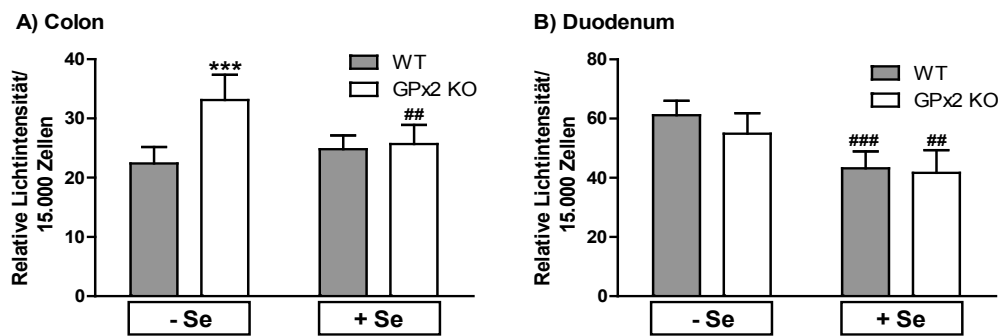


Abb. 3–8: Caspase 3/7-Aktivität

Die Caspase 3/7-Aktivität in Epithelzellen der Kryptengrund-Fraktion des distalen Colons (A) und des Duodenums (B) von GPx2 KO- und WT-Mäusen nach 16-wöchiger Fütterung mit -Se oder +Se-Diät. Dargestellt sind MW + SD, n = 6-8. 2way ANOVA: ## p < 0,01; ### p < 0,001 vs. +Se. *** p < 0,001 vs. WT.

Zusammenfassend war die Kapazität von GPx2 KO-Zellen zum HPODE-Abbau im -Se-Zustand vermindert. Des Weiteren traten in dieser Gruppe bereits im basalen Zustand DNA-Schäden und eine erhöhte Caspase 3/7-Aktivität auf.

3.3 Aktivierung stress-responsiver Signalwege im Darmepithel von GPx2 KO-Mäusen

3.3.1 Beeinflusste Signalwege im PCR-Array

Zur Identifikation von in WT und GPx2 KO unterschiedlich exprimierten Apoptose-relevanten Genen, wurde ein PCR-Array durchgeführt. Untersucht wurden gepoolte Proben von WT und GPx2 KO im selenarmen Zustand. Die am stärksten regulierten Gene zeigt Abb. 3–9.

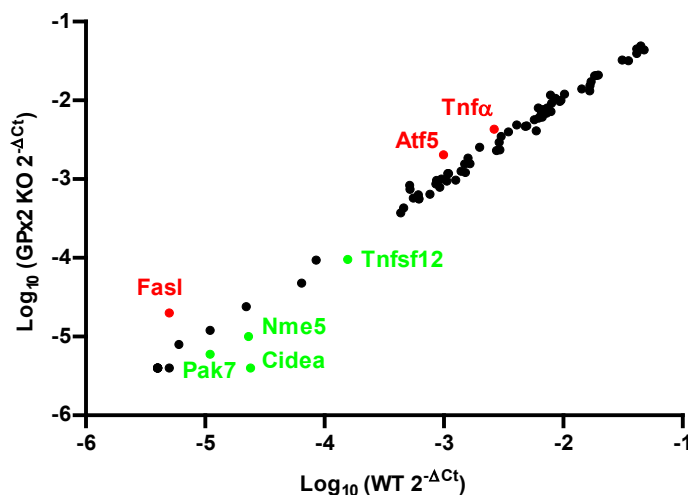


Abb. 3–9: „Mouse Apoptosis“ PCR-Array

Der PCR-Array wurde mit cDNA aus Kryptengrundepithelzellen des distalen Colons von WT- und GPx2 KO-Mäusen nach 16-wöchiger Fütterung der -Se-Diät, durchgeführt. Es wurden jeweils 6 Tiere pro Gruppe gepoolt. Im Scatter Plot-Diagram sind die Ct-Werte nach Normalisierung auf β-Aktin mit dem GPx2 KO auf der y-Achse und dem WT auf der x-Achse dargestellt. Gene, die sich zwischen den Genotypen um mindestens einen Faktor von 1,5 unterscheiden, sind farbig dargestellt.

Die im PCR-Array identifizierten Gene wurden mittels *qPCR* verifiziert (Tab. 3-1). Eine signifikant erhöhte Tumornekrosefaktor α (Tnfa)- und aktivierender Transkriptionsfaktor 5 (Atf5)-Expression im -Se GPx2 KO im Vergleich zum WT konnte ebenso wie eine verminderte Expression von Nme5 (engl.: *NME/NM23 family member 5*) und Cidea (engl.: *cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A*) bestätigt werden. Die Expressionsänderungen der Gene Fas-Ligand (Fasl), Pak7 (engl.: *p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 7*) und Tnfsf12 (engl.: *tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12*) lagen am Detektionslimit oder darunter und ließen sich nicht verifizieren.

Tab. 3-1: Verifizierung der im PCR-Array gefundenen Gene durch *real time qPCR*

Die Spalte „qPCR“ zeigt den MW für die Genexpression, normalisiert auf Aktin, bezogen auf den WT, n = 8. Signifikanzen GPx2 KO vs. WT mittels Student's T-Test: * p < 0,05; ** p < 0,01. nd= nicht detektierbar

Gen	Änderung GPx2 KO/WT		Signifikanz qPCR
	PCR-Array	qPCR	
Atf5 (<i>activating transcription factor 5</i>)	2,07	2,68	*
Fasl (<i>Fas ligand</i>)	3,71	0,91	
Tnfa (<i>tumor necrosis factor α</i>)	1,64	1,78	**
Cidea (<i>cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A</i>)	0,19	0,57	*
Nme5 (<i>NME/NM23 family member 5</i>)	0,41	0,55	*
Pak7 (<i>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 7</i>)	0,56	nd	
Tnfsf12 (<i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12</i>)	0,62	0,91	

3.3.2 Gesteigerte Tnfa-Expression im Darm von GPx2 KO-Mäusen

Die Tnfa mRNA-Expression war sowohl im distalen Colon als auch im Duodenum im Kryptengrund größtenteils höher als in der Kryptenspitze bzw. im Villus (Abb. 3–10).

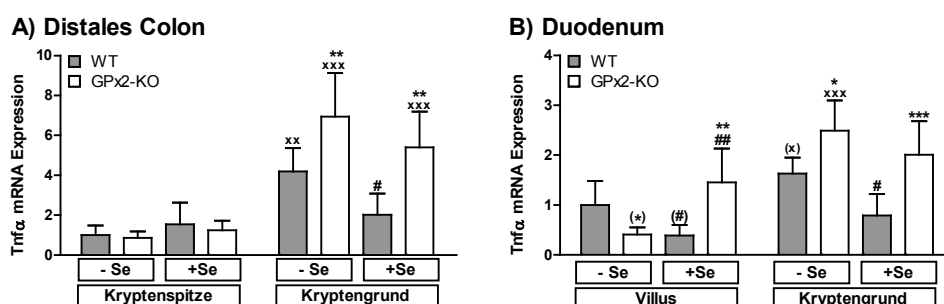


Abb. 3–10: Tnfa mRNA-Expression in Epithelzellfraktionen

Tnfa mRNA-Gehalte wurden in Epithelzellen des Kryptengrunds und der Kryptenspitze des distalen Colons (**A**) bzw. dem Kryptengrund und Villus des Duodenums (**B**) von GPx2 KO- und WT-Mäusen nach 16-wöchiger Fütterung mit -Se oder +Se-Diät bestimmt. Dargestellt sind auf β -Aktin normalisierte Daten, bezogen auf die Gruppe WT -Se Villus bzw. Kryptenspitze. MW + SD, n = 5. 2way ANOVA: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 vs. WT; # p < 0,05; ## p < 0,01 vs. +Se. x p < 0,05; xxx p < 0,001 vs. Villus- bzw. Kryptenspitze. Student's T-Test: (*) p < 0,05 vs. WT; (#) p < 0,05 vs. +Se.

Im Kryptengrund des GPx2 KO lag in beiden Darmabschnitten bei –Se- und +Se signifikant mehr Tnf α -mRNA vor, als im WT. Im Kryptengrund des WT war sie bei -Se im Vergleich zu +Se signifikant erhöht. In den ++Se-Gruppen traten keine Unterschiede zwischen den Genotypen auf (Daten nicht gezeigt).

Um zu Überprüfen, ob sich die Effekte auf mRNA-Ebene auch im Proteingehalt widerspiegeln, wurde sezernierter Tnf α im Medium nach 24-stündiger *ex vivo*-Kultur von Colon und Jejunum mittels ELISA bestimmt. Im Duodenum war diese Analyse wegen autolytischer Vorgänge während der Kultur nicht möglich.

Im Colon, und tendenziell auch im Jejunum, wurde in -Se GPx2 KO-Tieren im Vergleich zum WT eine erhöhte Tnf α -Sekretion festgestellt (Abb. 3–11). Unter der +Se- und ++Se-Diät glich sich die Tnf α -Ausschüttung des GPx2 KOs wieder an den WT an. Im –Se-Zustand spiegelten sich demnach die erhöhten Tnf α mRNA-Gehalte auch auf Proteinebene wider.

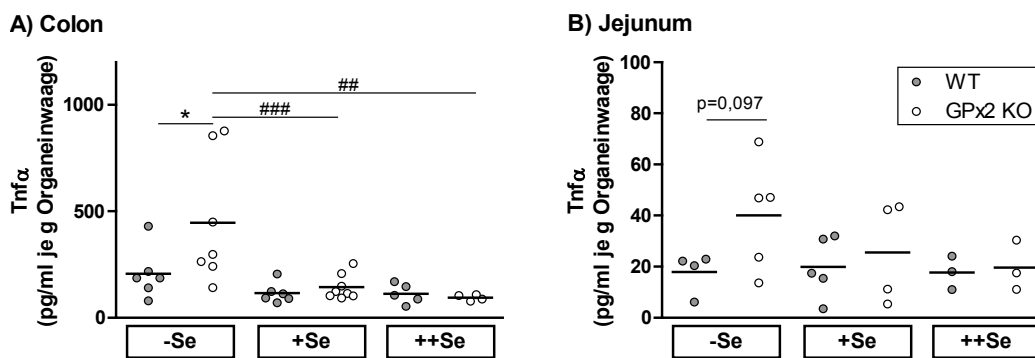


Abb. 3–11: Tnf α in Überständen aus der *ex vivo*-Kultur des Darms

Nach 24 h Kulturdauer wurde Tnf α in Kulturüberständen des distalen Colons (**A**) und des distalen Jejunums (**B**) von GPx2 KO- und WT-Mäusen nach 16-wöchiger Fütterung mit –Se-, +Se- oder ++Se-Diät bestimmt. Dargestellt sind auf die Darreinwaage normalisierte Daten als MW + SD, n = 4-7. 2way ANOVA: * p < 0,05 vs. WT; ### p < 0,01; #### p < 0,001 vs. -Se. p-Wert aus zweiseitigem Student's T-Test wie angegeben.

Da Immunzellen, insbesondere Makrophagen, als Hauptquelle für TNF α gelten [194], erfolgte eine Immunfärbung des distalen Colons mit dem Makrophagenmarker F4/80, um mögliche Unterschiede in der Anzahl von Makrophagen in der *Lamina propria* des Colons zu untersuchen.

Sowohl im distalen, als auch im transversen Colon, war die Makrophagenanzahl in der *Lamina propria* des Colons von GPx2 KO-Tieren der –Se-Gruppe im Vergleich zum WT signifikant erhöht (Abb. 3–12). Im transversen Colon zeigte sich dieser Effekt auch in der +Se-Gruppe. In beiden Darmabschnitten konnte die erhöhte Makrophagendichte durch Fütterung der ++Se-Diät auf das Niveau des WT abgesenkt werden. Die erhöhte Tnf α -Sekretion des distalen Colons des GPx2 KO –Se korrelierte also mit einer erhöhten Makrophagendichte.

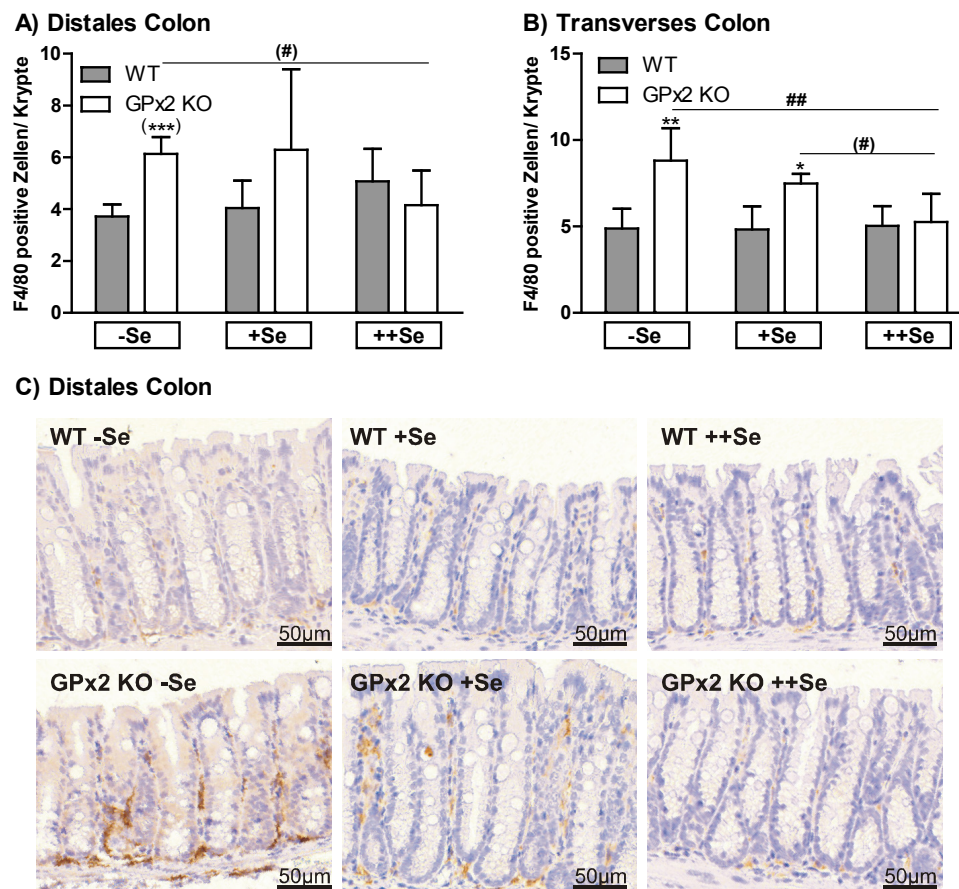


Abb. 3–12: Immunohistochemische Detektion von Makrophagen im Colon

Die Antikörperfärbung des Makrophagenmarkers F4/80 im distalen Colon (A) und transversen Colon (B) von GPx2 KO- und WT-Mäusen nach 7-wöchiger Fütterung mit -Se-, +Se- oder ++Se-Diät wurde ausgewertet, indem alle F4/80 positiven Zellen in der Lamina propria, welche an jeweils eine Krypte angrenzten, gezählt wurden. Dargestellt sind MW + SD, n = 4. 2way ANOVA: ## p < 0,01 für Seleneffekte. * p < 0,05 und ** p < 0,01 vs. WT. Student's T-Test: (#) p < 0,05 für Seleneffekte. (***) p < 0,001 vs. WT. (C) Repräsentative F4/80- und Hämatoxylin-Färbungen des distalen Colons.

3.3.3 Hinweise auf ER-Stress in Kryptengrundepithelzellen von GPx2 KO-Mäusen

Intestinale Entzündung [195] und erhöhte Tnfa-Expression [196, 197] sind häufig mit endoplasmatischem Retikulum (ER)-Stress assoziiert. Deshalb wurden wichtige Mediatoren der ER-Stress-induzierten Apoptose, Gadd153 (engl.: *growth arrest and DNA damage-inducible protein 153*), welches auch als CHOP (engl.: *CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein*) bezeichnet wird, und Gadd34 [198], auf mRNA-Ebene untersucht. Mit Ausnahme des WT +Se im Colon, war der Gadd153 und Gadd34 mRNA-Gehalt in der Kryptengrundfraktion höher als in der Kryptenspitze bzw. im Villus (Abb. 3–13).

Im Kryptengrund des WT-Colons waren der Gadd153 und Gadd34 mRNA-Gehalt bei -Se signifikant höher als bei +Se (Abb. 3–13A, C). Im GPx2 KO waren derartige Unter-

schiede nicht zu beobachten. Im Kryptengrund des Colons war die Gadd34-Expression im GPx2 KO bei +Se signifikant höher als im entsprechenden WT (Abb. 3–13C).

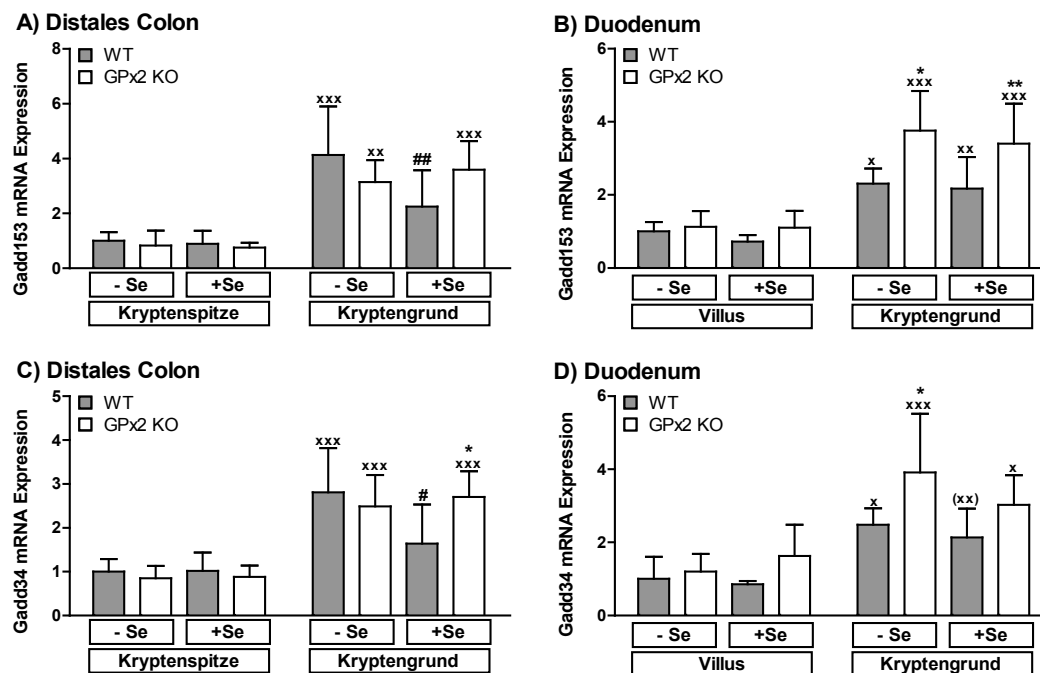


Abb. 3–13: mRNA-Expression von Gadd153 und Gadd34 in Epithelzellen

Die mRNA-Expression von Gadd153 (Chop) und Gadd34 wurden in Epithelzellfraktionen des distalen Colons und des Duodenums von GPx2 KO- und WT-Mäusen nach 16-wöchiger Fütterung mit -Se oder +Se-Diät bestimmt. Dargestellt sind auf β -Aktin normalisierte Daten, bezogen auf die Gruppe WT -Se Villus. **(A)** Gadd153-Expression im distalen Colon, **(B)** Gadd153-Expression im Duodenum **(C)** Gadd34 Expression im distalen Colon und **(D)** Gadd34-Expression im Duodenum. MW + SD, n = 5. 2way ANOVA: * p < 0,05; * p < 0,05; ** p < 0,01 vs. WT.; # p < 0,05; ## p < 0,01 vs. +Se. x p < 0,05; xx p < 0,01; xxx p < 0,001 vs. Villus-Fraktion. Student's T-Test: (xx) p < 0,01 vs. Villus-Fraktion.

Im Kryptengrund des Duodenums war der Gadd153 mRNA-Gehalt im GPx2 KO in der -Se- und +Se-Gruppe signifikant höher als im WT (Abb. 3–13B). Gadd34 war nur im Kryptengrund des selenarmen GPx2 KO im Vergleich zum WT erhöht (Abb. 3–13D). In beiden Darmabschnitten war die Gadd153- und Gadd34-Expression in den ++Se-Gruppen nicht durch den Genotyp beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

Zudem wurden Marker für ER-Stress in den Epithelzellfraktionen untersucht. Ein verlässlicher Marker ist ein Anstieg der Xbp1_s mRNA. Diese entsteht mittels Spleißing der Xbp1_u mRNA durch das bei ER-Stress-aktivierte Enzym IRE1 (engl.: *inositol-requiring transmembrane kinase/ endonuclease*). Zusätzlich wurde die Proteinexpression von Grp78, einem weiteren Marker für ER-Stress, analysiert [189].

Im Kryptengrund des Duodenums bei -Se war die Gesamt-Xbp1-mRNA-Expression im GPx2 KO höher als in der entsprechenden WT-Gruppe (Abb. 3–14 A). Das Verhältnis von gespleißtem Xbp1_s zu Gesamt-Xbp1 sowie die Grp78-Proteinexpression wurden jedoch nicht vom Genotyp beeinflusst (Abb. 3–14 B, C). Somit lagen keine eindeutigen Hinweise auf erhöhten ER-Stress im GPx2 KO vor. Es zeigte sich jedoch eine erhöhte

Xbp1-Expression sowie ein erhöhtes Xbp1_s/Xbp1-Verhältnis im Kryptengrund im Vergleich zum Villus. Im Colon lag keine Beeinflussung von Xbp1, Xbp1_s/Xbp1 oder Grp78 durch den Genotyp oder den Selenstatus vor (Daten nicht gezeigt).

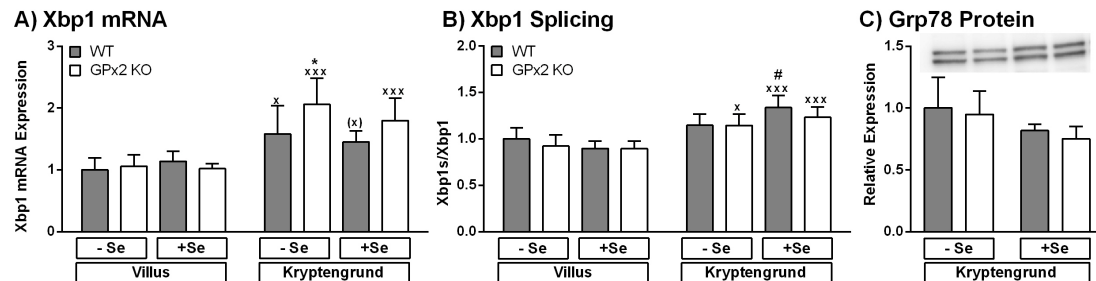


Abb. 3–14: ER-Stress-Marker im Duodenum

ER-Stress-Marker in Epithelzellfraktionen nach 16-wöchiger Fütterung mit -Se oder +Se-Diät (A) Xbp1 mRNA-Expression im Duodenum, normalisiert auf β -Aktin und bezogen auf WT -Se Villus und (B) Quotient von Xbp1_s und Gesamt-Xbp1-mRNA-Expression in Villus- und Kryptengrundfraktionen. (C) Grp78-Proteinexpression in Kryptengrundfraktionen (obere Bande mit 78 kDa), normalisiert auf *Fastgreen* und bezogen auf WT -Se. MW + SD, n = 5. 2way ANOVA: * p < 0,05 vs. WT. x p < 0,05 vs. Villus-Fraktion. xxx p < 0,001 vs. Villus-Fraktion. # p < 0,05 vs. -Se. Student's T-Test: (x) p < 0,05 vs. Villus-Fraktion.

Eine Phosphorylierung des eukaryotischen Initiationsfaktors 2 α (eIF2 α) an Ser51 kann über den aktivierenden Transkriptionsfaktor 4 (Atf4) zu einer Gadd153-Induktion führen (siehe Abb. 4–3). Deshalb wurde die Ser51-Phosphorylierung von eIF2 α in Kryptengrundfraktionen des distalen Colons und des Duodenums untersucht. Während im Duodenum keine Beeinflussung der eIF2 α -Phosphorylierung vorlag (Daten nicht gezeigt), war im Colon in der -Se und +Se-Gruppe eine signifikant erhöhte eIF2 α -Phosphorylierung im GPx2 KO im Vergleich zum WT zu erkennen (Abb. 3–15). Die basale Expression des unphosphorylierten eIF2 α war in allen Gruppen gleich (Daten nicht gezeigt).

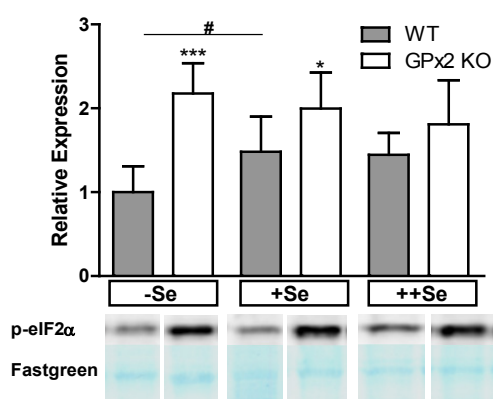


Abb. 3–15: Ser51-Phosphorylierung von eIF2 α im Colon

Die Ser51-Phosphorylierung von eIF2 α wurde in Kryptengrundepithelzellen des distalen Colons von GPx2 KO- und WT-Mäusen nach 16-wöchiger Fütterung mit -Se, +Se oder ++Se-Diät mittels Western Blot bestimmt. Dargestellt sind auf die *Fastgreen*-Färbung normalisierte Daten, bezogen auf WT -Se, MW + SD, n = 6-9. 2way ANOVA: * p < 0,05; *** p < 0,001 vs. WT; # p < 0,05 vs. die entsprechende +Se-Gruppe.

Zusammenfassend findet sich eine Beeinflussung des eIF2 α -Signalwegs im Colon auf Ebene der eIF2 α -Phosphorylierung und im Duodenum auf Ebene der Zielgene aus der Gadd-Familie. Die untersuchten Marker geben jedoch keine eindeutigen Hinweise auf das tatsächliche Vorliegen von ER-Stress.

3.4 Rolle von Selen und GPx2 in der AOM-induzierten Colonkanzerogenese

Der Einfluss von Selen und GPx2 auf die Kanzerogenese im Colon wurden in GPx2 KO- und WT-Mäusen 16 Wochen nach sechsmaliger Injektion des Colonkancerogens AOM untersucht (vgl. Kap. 2.1.2). Das verwendete Modell der chemisch-induzierten Colonkanzerogenese ist vergleichbar mit der sporadischen Colonkanzerogenese beim Menschen [123].

3.4.1 Gewichtsverläufe

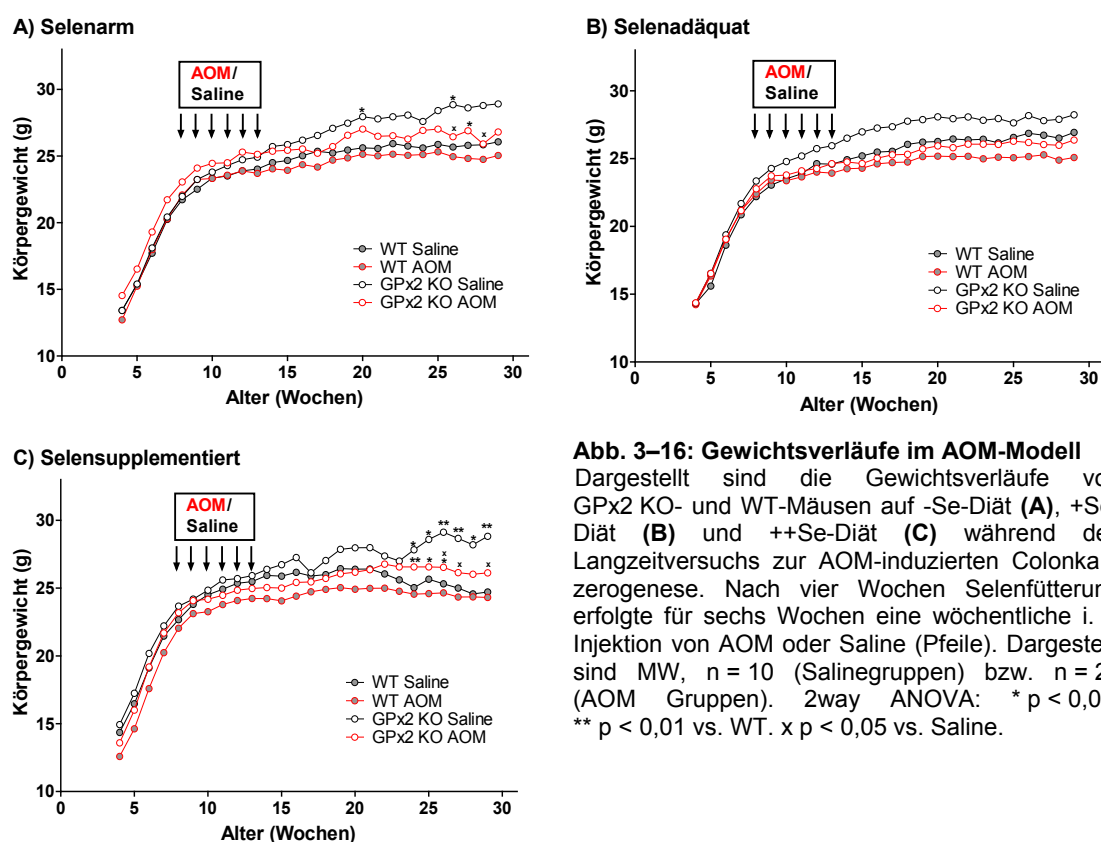


Abb. 3–16 zeigt die Gewichtsverläufe der Mäuse während und nach AOM-Gabe. Ab etwa 12 Wochen nach der ersten AOM-Gabe wogen GPx2 KO-Mäuse tendenziell mehr als die entsprechenden WT-Tiere. Dieser Effekt war in den -Se und +Se-Diäten zu einigen Zeitpunkten signifikant. Während die AOM-Gabe keinen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung im WT hatte, war in den letzten Versuchswochen das Körpergewicht der AOM-behandelten GPx2 KO-Tiere der -Se und ++Se-Gruppen zu einigen Zeitpunkten signifikant niedriger, als in den entsprechenden Saline-behandelten Gruppen. Der Selengehalt der Diät hatte keinen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung der Tiere.

3.4.2 Tendenziell höhere Milzgewichte nach AOM-Behandlung und im GPx2 KO

Da es Hinweise auf entzündliche Prozesse im Darm unbehandelter GPx2 KO-Mäuse gab (siehe Kap. 3.3.2), wurde im Langzeitversuch zur AOM induzierten Colonkancerogenese das Milzgewicht der Tiere bei der Tötung als Entzündungsmarker bestimmt, um zu überprüfen, ob auch systemisch Anzeichen für eine Entzündung vorliegen.

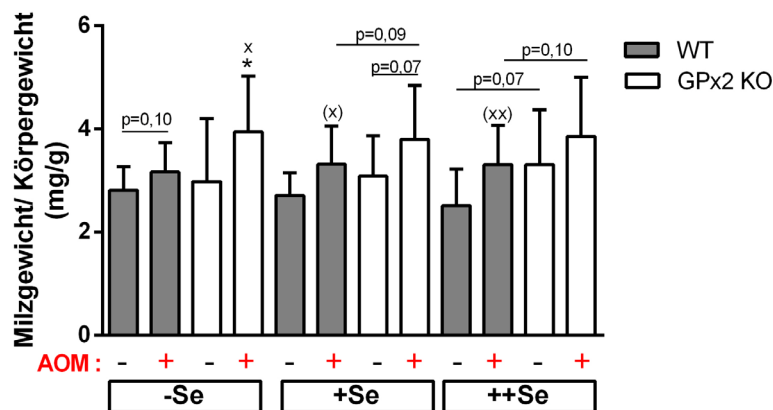


Abb. 3–17: Milzgewichte bei der Tötung im Langzeitversuch

Die Milzgewichte wurden bei der Tötung AOM- und Saline-behandelter GPx2 KO- und WT-Mäuse auf -Se, +Se oder ++Se-Diät 16 Wochen nach der letzten AOM bzw. Saline-Injektion bestimmt. Die auf das Körpergewicht bezogenen Milzgewichte (mg/g) werden als MW + SD dargestellt. n = 10 (Kontrollen) bzw. n = 20 (AOM-behandelte Tiere). 2way ANOVA: * p < 0,05 vs. WT; x p < 0,05 vs. Saline. Student's T-Test: (x) p < 0,05; (xx) p < 0,01 vs. Saline und p-Werte wie angegeben.

In fast allen Gruppen war das Milzgewicht in Folge der AOM-Behandlung im Vergleich zu der entsprechenden Saline-behandelten Gruppe erhöht. In den Gruppen GPx2 KO -Se, WT +Se und WT ++Se war dieser Effekt signifikant, in den Gruppen WT -Se und GPx2 KO +Se bestand ein Trend (p = 0,10 bzw. p = 0,07).

In allen AOM-behandelten Gruppe sowie in den Saline Gruppen ++Se, hatten GPx2 KO-Mäuse ein höheres Milzgewicht als der entsprechende WT. Bei AOM -Se war dieser Effekt signifikant. In den Gruppen Saline ++Se, AOM +Se und AOM ++Se bestand er als Trend (p = 0,07/ p = 0,09/ p = 0,10).

3.4.3 Einfluss von GPx2 und Selen auf die Entstehung von ACF, MDF und Adenomen

ACF, MDF und Tumore waren hauptsächlich im transversen und distalen Colon der AOM-behandelten Tiere lokalisiert. In den Saline-behandelten Tieren wurden keine Tumore, ACF oder MDF festgestellt, weshalb sie in den folgenden Abbildungen nicht dargestellt sind.

ACF sind frühe präneoplastische Läsionen, welche als Konsequenz der AOM-Gabe entstehen [177]. Da es sich um eine sehr heterogene Gruppe von Läsionen handelt, wird ihre allgemeine Bedeutung als Marker für die Tumorentstehung in Frage gestellt

[121, 199], weil wahrscheinlich nur dysplastische ACF, welche durch APC-Mutationen charakterisiert sind, Tumorstufen darstellen [200, 201]. Ein ACF kann aus einer oder mehreren Krypten je Focus bestehen, man spricht hier von der Kryptenmultiplizität. So zeigt das Methylenblau-gefärbte Präparat in Abb. 3–18A einen aus drei Krypten bestehenden ACF bzw. einen ACF mit einer Kryptenmultiplizität von drei.

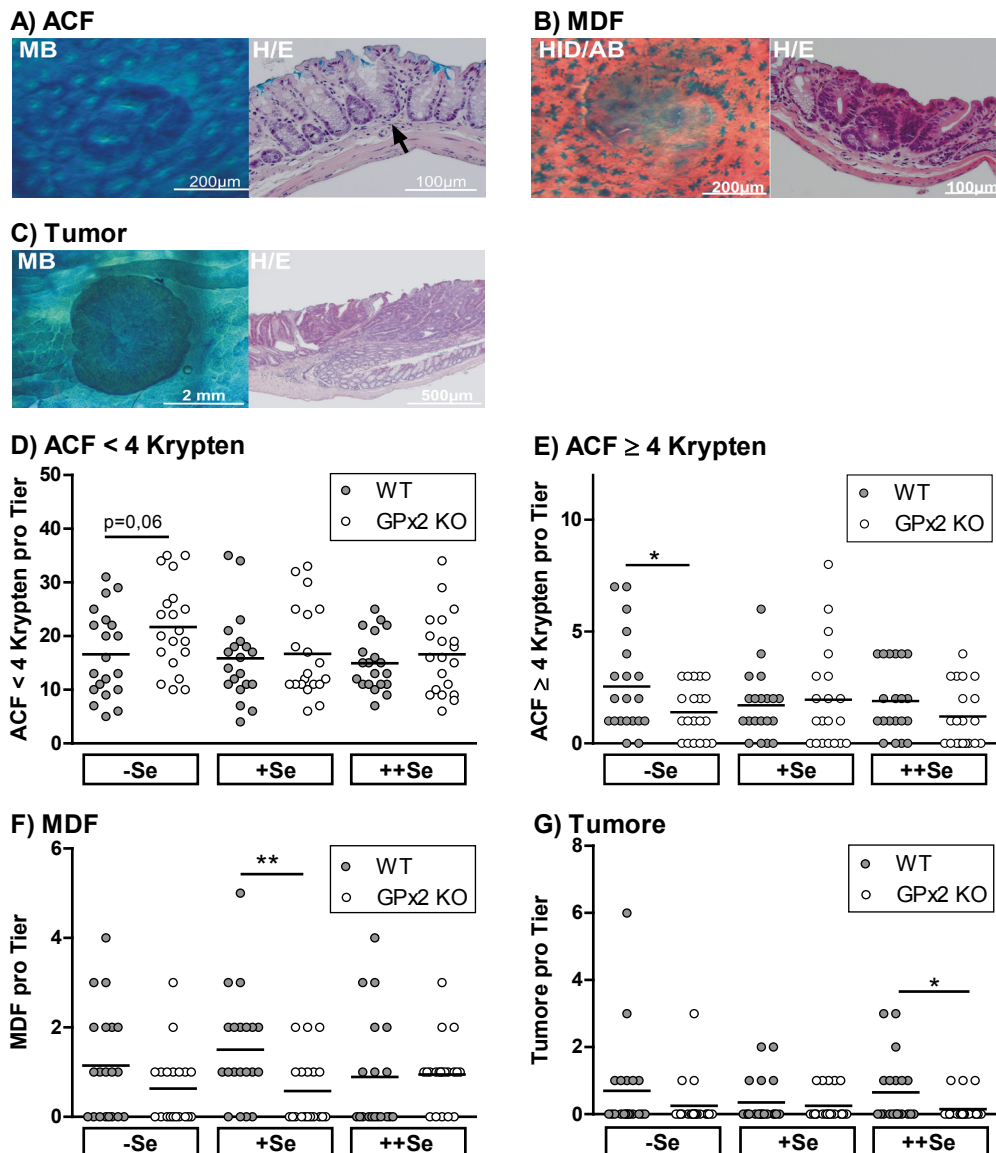


Abb. 3–18: AOM-induzierte ACF, MDF und Tumore im Colonkanzerogenese-Model

(A) ACF in der Aufsicht nach Methylenblau (MB)-Färbung und als Längsschnitt nach H/E-Färbung. (B) MDF in der Aufsicht nach HID/AB-Färbung und als Längsschnitt nach H/E-Färbung. (C) Tumor in der Aufsicht nach Methylenblau (MB)-Färbung und als Längsschnitt nach H/E-Färbung. (D–G) Dargestellt ist die Anzahl von ACF < 4 Krypten (D), ACF ≥ 4 Krypten (E), MDF (F) und Tumoren (G) je Tier im Colon von GPx2 KO- und WT-Mäusen auf -Se, +Se oder ++Se-Diät 16 Wochen nach der letzten AOM Injektion. Die Darstellung erfolgt als *Scatter dot plot* mit MWn, n = 19–20. Student's T-Test: * p < 0,05; ** p < 0,01 vs. WT und p-Werte wie angegeben. In den Saline-behandelten Kontrollgruppen (n = 10) traten keine ACF, MDF oder Tumore auf.

Um die Aussagekraft von ACF als Marker für die Tumorentwicklung zu erhöhen, wird häufig eine differenzierte Betrachtung von ACF mit hoher und niedriger Kryptenmultiplizität vorgenommen [202–204]. Da ACF mit vier oder mehr Krypten sich mit größerer

Wahrscheinlichkeit zu Tumoren entwickeln und somit ein besserer Biomarker für die Tumorentstehung im Darm sind [121, 199], wurden in dieser Arbeit $ACF < 4$ Krypten und $ACF \geq 4$ Krypten getrennt betrachtet (Abb. 3–18D, E). Während sich die gesamt-ACF-Anzahl zwischen den Gruppen nicht unterschied, hatten in der -Se-Gruppe GPx2 KO-Tiere tendenziell mehr ACF mit geringer Kryptenmultiplizität, aber signifikant weniger ACF mit hoher Kryptenmultiplizität als der WT.

Im Gegensatz zu ACF, sind MDF (Abb. 3–18B) dysplastische Läsionen, welche auf molekularer und morphologischer Ebene bereits Gemeinsamkeiten mit Tumoren haben und als verlässliche Tumormarker gelten [121, 178, 205, 206]. In der +Se-Gruppe hatten GPx2 KO-Tiere signifikant weniger MDF, als die entsprechenden WT-Tiere (Abb. 3–18F).

Die Tumorzinzidenz war insgesamt relativ gering. Abhängig von der Behandlungsgruppe entwickelten nur 15-40% aller AOM-behandelten Tiere Tumore. Alle Tumore erwiesen sich bei histologischer Betrachtung als Adenome.

In der ++Se-Gruppe hatten GPx2 KO-Tiere eine signifikant geringere Tumoran- zahl pro Tier im Vergleich zum WT (Abb. 3–18G). GPx2 KO-Tiere hatten in den -Se und ++Se- Diätgruppen auch eine geringere Tumorzinzidenz als die Wildtypen (3 und 3 Tiere vs. 7 und 8 Tiere), diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Tab. 3-2).

Tab. 3-2: Tumore im Colon AOM-behandelter Tiere

Statistische Auswertung mittels Kreuztabellen und *Fisher-exakt-Test*: WT vs. GPx2 KO: * $p < 0,05$ und p -Werte wie angegeben. Zur Analyse der Tumoran- zahl je Gruppe wurde die Tumorzinzidenz mit der Anzahl der Tumore gewichtet. Unterschiede durch den Selenstatus waren nicht signifikant.

Diät	Genotyp	% Tiere mit Tumoren	Tumorzinzidenz	Signifikanz WT vs. GPx2 KO	Tumoran- zahl/ Gruppe	Signifikanz WT vs. GPx2 KO
-Se	WT	35	7 / 20	P = 0,273	14	*
	GPx2 KO	15	3 / 20		5	
+Se	WT	25	5 / 20	P = 1,000	7	P = 0,738
	GPx2 KO	25	5 / 20		5	
++Se	WT	40	8 / 20	P = 0,155	13	*
	GPx2 KO	15	3 / 20		3	

Bei einer gemeinsamen Bewertung von Tumoran- zahl und -inzidenz durch Betrachtung der Tumoran- zahl je Gruppe (Tab. 3-2) war die verminderte Tumoran- zahl in den GPx2 KO-Gruppen im Vergleich zum WT im –Se-Zustand (5 Tumore im GPx2 KO vs. 14 im WT) und im ++Se-Zustand (3 Tumore im GPx2 KO vs. 13 im WT) signifikant. Im +Se-Zustand gab es keine Unterschiede in der Tumorzinzidenz oder der Tumoran- zahl zwischen den Genotypen. Zusammenfassend entwickelten die GPx2 KO-Tiere weniger Tumore und präneoplastische Läsionen als WT-Tiere.

Während die Tumoranzahl in den GPx2 KO-Gruppen vom Selenstatus unbeeinflusst war (5/ 5/ 3 Tumore je Gruppe in -Se/ +Se/ ++Se), gab es im WT eine Tendenz zu mehr Tumoren im -Se und im ++Se-Zustand (14 bzw. 13 Tumore je Gruppe in -Se bzw. ++Se vs. 7 Tumore in +Se; Tab. 3-2). Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

3.4.4 Größere Tumore in GPx2 KO-Mäusen der +Se-Gruppe

Zur Bestimmung der Tumorgöße wurde der Tumordurchmesser an der breitesten Stelle bestimmt. Im +Se-Zustand waren Tumore der GPx2 KO-Tiere größer als die Tumore in der entsprechenden WT-Gruppe (Abb. 3–19).

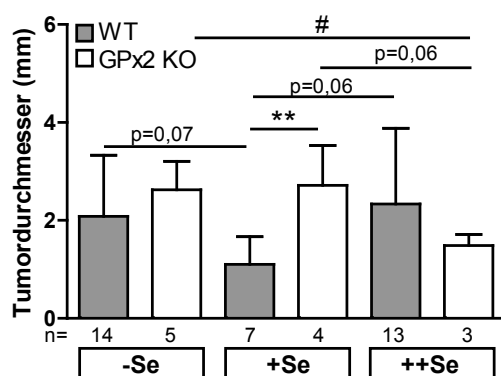


Abb. 3–19: Tumordurchmesser

Dargestellt sind MW + SD des Tumordurchmessers an der breitesten Stelle der Colontumore von GPx2 KO- und WT-Mäusen auf -Se-, +Se- oder ++Se-Diät 16 Wochen nach der letzten AOM Injektion. Zweiseitiger Student's T-Test: # p < 0,05 für Seleneffekte; ** p < 0,01 vs. WT und p-Werte wie angegeben.

Im GPx2 KO konnte die Tumorgöße durch Fütterung der ++Se-Diät vermindert werden. Im Vergleich zur -Se-Gruppe war dieser Effekt signifikant, im Vergleich zur +Se-Gruppe bestand ein Trend mit p = 0,06. Im WT hingegen zeigte sich, wie schon bei der Tumoranzahl, ein U-förmiger Effekt: Im +Se-Zustand waren die Tumore des WT am kleinsten, während sowohl aus der Fütterung der -Se-Diät, als auch aus der Fütterung der ++Se-Diät tendenziell größere Tumore resultierten (p = 0,07 bzw. p = 0,06; Abb. 3–19).

3.4.5 Aktive Entzündung im Colon von selenarmen GPx2 KO-Tieren nach AOM-Behandlung

Von jeweils vier (-Se-Gruppen) bzw. fünf (+Se- und ++Se-Gruppen) AOM-behandelten WT- und GPx2 KO-Tieren wurden Darmrollen des Colons histologisch charakterisiert. Hierbei wurden ausschließlich in allen vier untersuchten GPx2 KO-Mäusen der -Se-Gruppe entzündliche Läsionen unterschiedlichen Schweregrads im proximalen, transversen und distalen Colon festgestellt. Die Entzündungsherde waren durch eine vermehrte Bindegewebeinlagerung und Verdickung der *Lamina propria*, eine massive Einwanderung von Immunzellen sowie häufig durch eine Degeneration der Krypten gekennzeichnet. Oft waren auch vergrößerte Blutgefäße zu erkennen. Abb. 3–20A zeigt exemplarisch eine leichte Entzündung im distalen Colon einer GPx2 KO-Maus mit einer vermehrten Einlagerung von Bindegewebe und Immunzellen und einer

Ausreifungsstörung der Krypten. Abb. 3–20B zeigt exemplarisch eine floride Entzündung im transversen Colon, in der ein Großteil der Krypten durch entzündliches Infiltrat ersetzt wurde. Die entzündlichen Areale hatten eine hohe Dichte F4/80-positiver Makrophagen (Abb. 3–20 rechts). Auch im Gesamtbild wiesen die Därme dieser Tiere im Vergleich zum WT einen erhöhten Makrophagenanteil auf. Zwei Adenome im Schleimhautniveau, die in einer der untersuchten GPx2 KO-Mäuse (-Se) gefunden wurden, wiesen ebenfalls einen hohen Anteil von Immunzellen auf.

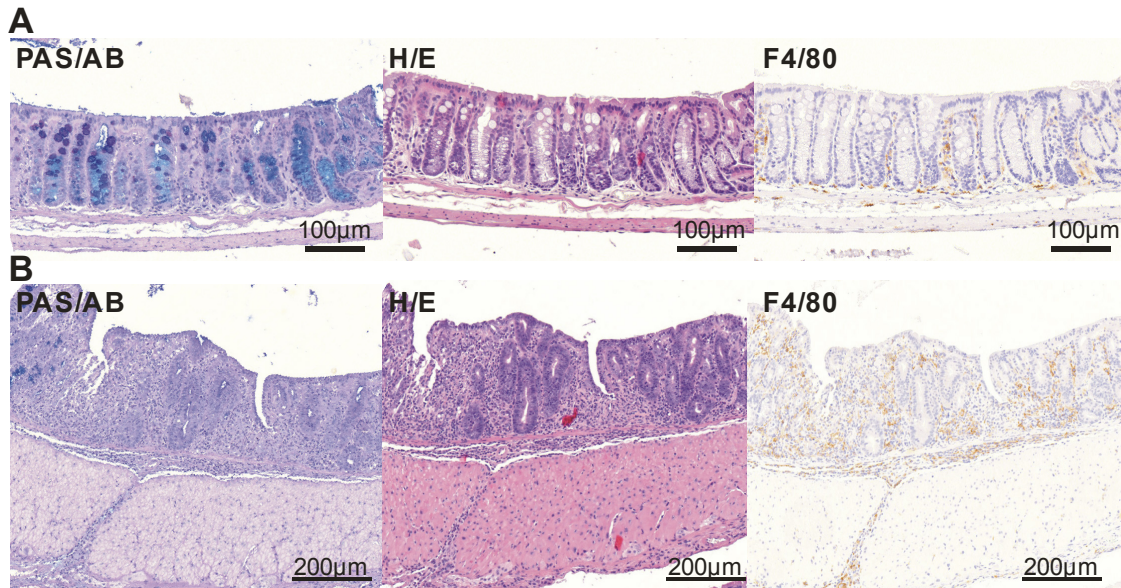


Abb. 3–20: Entzündliche Läsionen in selenarmen GPx2 KO-Mäusen

Entzündliche Läsionen in selenarmen GPx2 KO-Mäusen 16 Wochen nach der letzten AOM-Injektion im Langzeitversuch zur AOM-induzierten Colonkanzerogenese. Abgebildet sind serielle PAS/AB- und H/E-Färbungen sowie eine Immunfärbung des Makrophagenmarkers F4/80 mit H-Färbung. **(A)** Leichte Entzündung im distalen Colon. **(B)** Floride Entzündung im transversen Colon.

In allen Gruppen traten zudem Läsionen mit erhöhtem Bindegewebs- und Immunzellanteil in der Lamina propria auf, deren Schweregrad jedoch nicht mit dem der selenarmen GPx2 KO-Tiere vergleichbar war. Diese Läsionen waren meistens nicht durch eine erhöhte Makrophagendichte gekennzeichnet.

3.4.6 Erhöhte Expression von GPx2 und β -Catenin in MDF

MDF wurden in Darmrollen des Colons von fünf WT-Tieren der +Se-Gruppe anhand morphologischer Kriterien in der PAS/AB- und H/E-Färbung im transversen und distalen Colon und Rektum identifiziert. Anschließend wurden die insgesamt 67 so gefundenen MDF anhand von in Serie geschnittenen Immunfärbungen für β -Catenin, GPx2 und Ki-67 charakterisiert. Im Vergleich zum umliegenden normalen Epithel wurde die GPx2-Expression unter Berücksichtigung der Lage der angefärbten Strukturen und der Position des sichtbaren Anschnitts in der Kryptenachse als vermindert, normal oder erhöht eingestuft (ohne Muster, gepunktet bzw. schraffiert in Abb. 3–21). Eine erhöhte GPx2-Immunreaktivität resultierte entweder aus einer

stärkeren maximalen Intensität der Immunfärbung oder daraus, dass ein größerer Bereich der einzelnen Zellen oder der Krypte angefärbt war oder aus beidem. Bezüglich der β -Catenin-Expression wurde eine Einteilung in vier Kategorien mit zunehmend starker β -Catenin-Expression (zunehmende orange-Färbung in Abb. 3–21) vorgenommen. Hierbei wurde sowohl die Lage der angefärbten Strukturen als auch eine membranständige oder cytosolisch/ kernständige Lokalisation berücksichtigt.

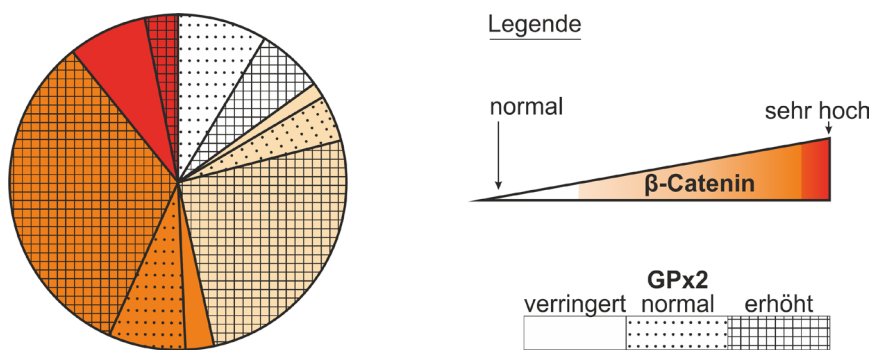


Abb. 3–21: Charakterisierung der GPx2- und β -Catenin-Expression in MDF

Die GPx2- und β -Catenin-Expression wurde in insgesamt 67 MDF von 5 WT-Mäusen auf +Se-Diät 16 Wochen nach der letzten AOM-Injektion bewertet. Mit Hilfe eines Punktesystems wurde die GPx2-Expression als verringert (ohne Muster), normal (Punkte) oder erhöht (schraffiert) im Vergleich zum umgebenden normalen Gewebe eingeteilt, wobei auch die Lage in der Krypte (basal oder luminal) berücksichtigt wurde. Die β -Catenin-Expression im Vergleich zum umgebenden normalen Gewebe wurde ebenfalls mit Hilfe eines Punktesystems bewertet, wobei sowohl eine luminale oder basale Lage im Kryptenanschnitt, als auch die zelluläre Lokalisation berücksichtigt wurden. Eine zunehmende Intensität und cytosolisch / kernständige Lokalisation der β -Catenin-Expression ist durch eine zunehmende Intensität der orangenen Farbe dargestellt.

Von den insgesamt 67 untersuchten MDF wiesen 85% (57/67) eine erhöhte β -Catenin-Färbung auf. In 67% der MDF (45/67) war die Expression von GPx2 erhöht. Eine Überlappung von erhöhter β -Catenin und GPx2-Färbung lag in 61% der MDF (41/67) vor.

Eine Untergruppe von MDF wies nur eine geringe Dysplasie auf, wie das Beispiel in Abb. 3–22A illustriert. Morphologisch waren sie durch eine nahezu normale Kryptengröße und Form und eine normale Dicke der Epithelzelllage gekennzeichnet. Bei diesen MDF war die β -Catenin-Färbung vor allem membranständig stärker. Dies erstreckte sich häufig auf die gesamte Krypte, teilweise aber auch vorwiegend auf den luminalen Bereich wie in Abb. 3–22A (blauer Pfeil). Von 14 Fällen im Colon und Rektum, die eindeutig dieser Kategorie zugeordnet werden konnten, war GPx2 in einem nicht beeinflusst, in dreien kaum erhöht und in den restlichen 10 leicht erhöht. Dies drückte sich durch eine verstärkte Immunfärbung am Kryptengrund sowie durch eine Verschiebung der GPx2-positiven Zone nach weiter luminal aus (Abb. 3–22A schwarzer Pfeil), wobei jedoch nie eine stärkere Färbung an der Kryptenspitze beobachtet wurde.

Fortgeschrittene Stadien der Dysplasie wie in Abb. 3–22B zeichneten sich durch verdickte Krypten mit unregelmäßiger Form, eine verdickte Epithelzelllage und die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 aus. Hier war eine starke Hochregulation

von membranständigem und kernständigem / cytosolischem β -Catenin, sowie eine erhöhte GPx2-Expression in 17 Fällen, die eindeutig dieser Kategorie zuzuordnen waren, zu beobachten. Ein ähnliches Muster mit verstärkter β -Catenin und GPx2-Expression zeigten stark dysplastische MDF am Anus.

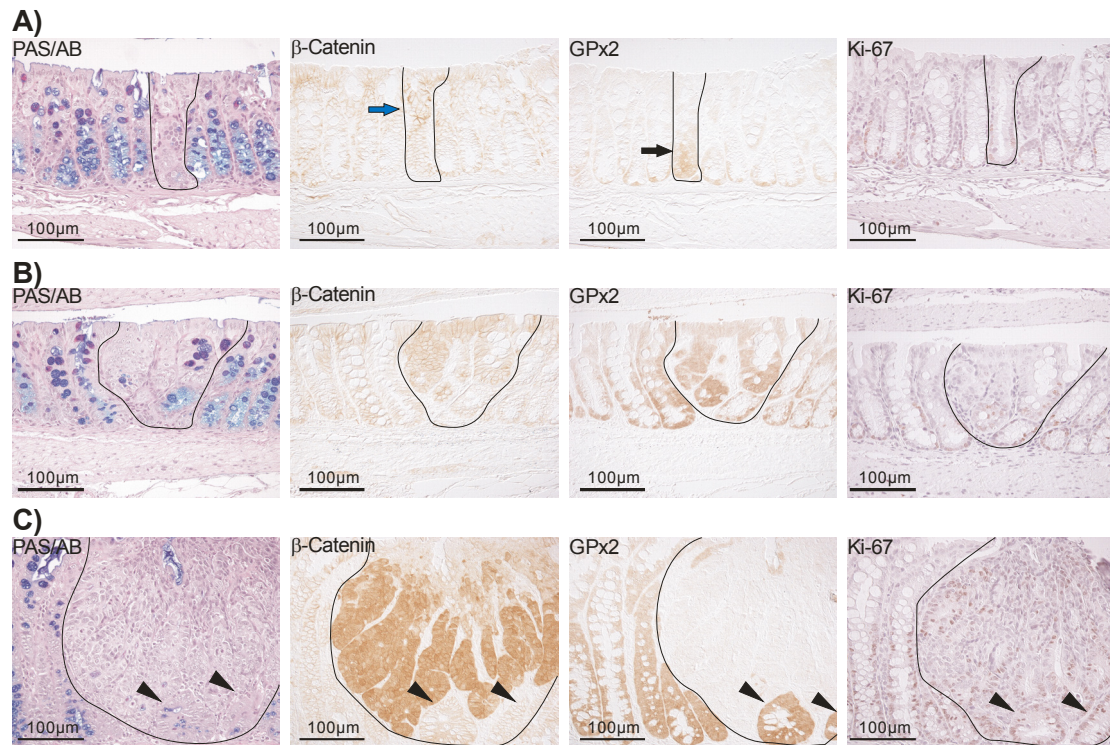


Abb. 3–22: Repräsentative Aufnahmen der PAS/AB-, β -Catenin-, GPx2- und Ki-67-Färbung

Beispiele für die GPx2-, β -Catenin-, PAS/AB- und Ki67/Hämatoxylin-Färbung von MDF der Gruppe WT +Se, 16 Wochen nach der letzten AOM-Injektion in seriellen Schnitten. **(A)** MDF mit geringer Dysplasie, stärkerer β -Catenin-Färbung vor allem membranständig im apikalen Teil der Krypte (blauer Pfeil) und stärkerer GPx2-Färbung im basalen Bereich der Krypte (schwarzer Pfeil). **(B)** MDF mit erhöhter β -Catenin-Färbung sowohl cytosolisch als auch membranständig sowie erhöhter GPx2-Färbung. **(C)** Stark dysplastisches Mikroadenom mit sehr starker β -Catenin-Färbung, sowohl cytosolisch als auch membranständig, und mit fehlender GPx2-Expression im Kernbereich.

In Abb. 3–22C ist ein stark entdifferenziertes Mikroadenom zu sehen, welches sich durch das Fehlen von Becherzellen und eine Auflösung der Kryptenstruktur auszeichnet. In den ebenfalls dysplastischen Krypten, die diese Struktur einrahmen, sowie in zwei Kryptenanschnitten unterhalb dieser Struktur (Pfeile), sind noch Restbecherzellen vorhanden. Während das Mikroadenom selbst eine sehr starke β -Catenin-Expression aufweist, haben diese Krypten nur wenig mehr β -Catenin als das normale Gewebe. Im Mikroadenom wird GPx2 nicht exprimiert. In den weniger stark entdifferenzierten Krypten am Rand ist GPx2 jedoch stark hochreguliert (Pfeile). Weitere Mikroadenome wurden nicht gefunden.

In WT der anderen Diätgruppen zeigte sich ein ähnliches Regulationsmuster von GPx2 und β -Catenin in präneoplastischen Läsionen. Es wurde kein Einfluss des Genotyps auf die β -Catenin Expression in den +Se und ++Se Diätgruppen beobachtet. Da die

GPx2 KO-Mäuse -Se die unter Kap. 3.4.5 beschriebenen entzündlichen Läsionen aufwiesen, konnte hier kein direkter Vergleich erfolgen.

Zusammenfassend lag in den untersuchten MDF häufig eine stärkere GPx2- und β -Catenin-Immunfärbung als im normalen Gewebe vor. Es gab jedoch keine deutlichen Hinweise für eine Colokalisation.

3.5 Kurzzeitversuch zur Untersuchung der akuten AOM-Effekte

Zusätzlich zu der Untersuchung der Colonkanzerogenese im Langzeitversuch wurden im Kurzzeitversuch Tiere acht Stunden nach einer einmaligen AOM- oder Saline-Injektion getötet, um den Einfluss von Selen und GPx2 auf die akuten Effekte von AOM und somit in der Tumorinitiationsphase zu untersuchen (siehe Kap. 2.1.2).

3.5.1 Mehr AOM-induzierte Apoptosen in der Kryptenmitte und basale Apoptosen im Kryptengrund des distalen Colons im GPx2 KO

AOM bewirkt DNA-Alkylierungen und in deren Folge Mutationen in proliferierenden Zellen. Geschädigte Zellen im proliferierenden Kryptengrund-Kompartiment werden als direkte Folge der AOM-Applikation durch Apoptose eliminiert [207]. Eine effiziente Elimination von Zellen mit DNA-Schäden in der Tumorinitiationsphase entscheidet darüber, ob sich diese zu Tumoren weiterentwickeln können (vgl Kap..1.2.3).

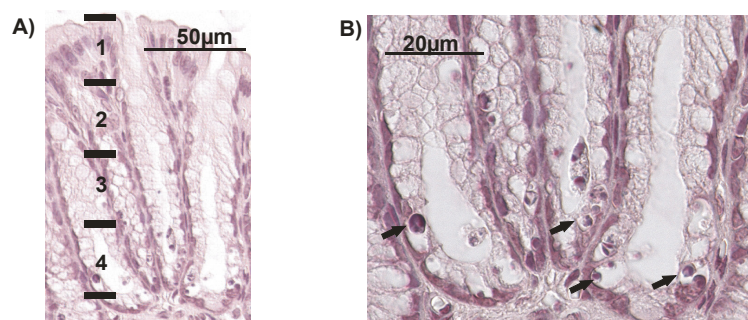


Abb. 3–23: Aufteilung in Kryptenviertel und Apoptosen im Colon

Zur Zählung apoptotischer Epithelzellen an Hämatoxylin-gefärbten Schnitten wurde die Krypte längs in vier Viertel eingeteilt, wie in (A) gezeigt. Apoptotische Zellen wurden anhand ihrer Morphologie identifiziert, wie in (B) exemplarisch dargestellt (Pfeile).

Da GPx2 KO-Mäuse eine basal erhöhte Apoptoserate im Kryptengrund des Colons haben ([80] und Kap. 3.2.2), wurde untersucht, ob auch die Anzahl der AOM-induzierten Apoptosen im Kryptengrund erhöht ist. Die Colonkrypte wurde hierfür der Länge nach in vier Viertel aufgeteilt betrachtet (Abb. 3–23A). Das erste Kryptenviertel repräsentiert hierbei die Kryptenspitze, das vierte Kryptenviertel den Kryptengrund. Abb. 3–23B zeigt exemplarisch das vermehrte Auftreten von Apoptosen im Kryptengrund einer AOM-behandelten Maus.

Während die AOM-Behandlung in der Kryptenspitze keine Auswirkungen auf die Anzahl von Apoptosen hatte (Abb. 3–24A), erhöhte sie im zweiten Kryptenviertel die Apoptoserate nur im GPx2 KO (Abb. 3–24B). Im dritten und vierten Kryptenviertel kam es bei beiden Genotypen zu einer massiven Steigerung der Apoptoserate durch AOM (Abb. 3–24C, D).

Im vierten Kryptenviertel war die Anzahl AOM-induzierter Apoptosen im GPx2 KO bei -Se und +Se im Vergleich zum WT leicht erhöht, diese Änderung war jedoch nicht signifikant (Abb. 3–24D). Im dritten Kryptenviertel induzierte AOM im GPx2 KO bei -Se signifikant mehr Apoptosen als im WT bei -Se (Abb. 3–24C). Noch stärker ausgeprägt war dieser Effekt im zweiten Kryptenviertel (Abb. 3–24B), wo die Anzahl AOM-induzierter Apoptosen in den GPx2 KO-Gruppen bei -Se und +Se doppelt so hoch war, wie im WT.

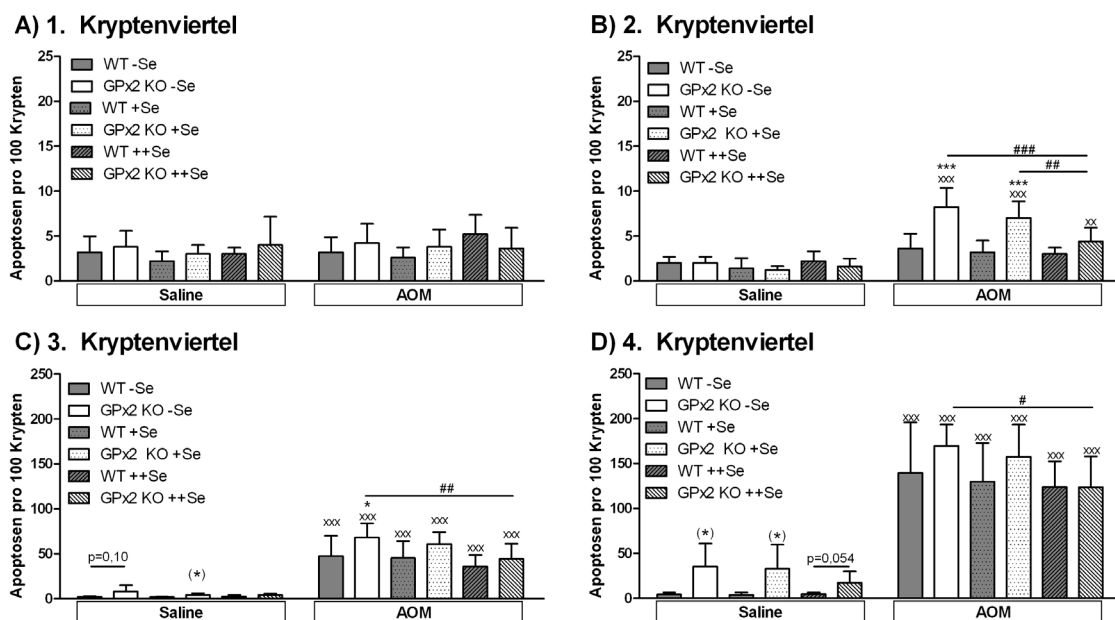


Abb. 3–24: AOM-induzierte Apoptosen im Colon 8 h nach AOM-Injektion

Dargestellt ist die Anzahl von Apoptosen je 100 Krypten im distalen Colon von GPx2 KO- und WT-Mäusen auf -Se, +Se oder ++Se Diät 8 h nach einmaliger Injektion von AOM bzw. Saline im ersten (A), zweiten (B) dritten (C) und vierten (D) Kryptenviertel als MW + SD, n = 5. 2way ANOVA: # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001 für Seleneffekte; * p < 0,05; *** p < 0,001 vs. WT; xx p < 0,01; xxx p < 0,001 vs. Saline. Student's T-Test: * p < 0,05 vs. WT und p-Werte wie gezeigt.

Die basale Apoptoserate in Saline-behandelten Tieren war im GPx2 KO vor allem im Kryptengrund höher als im WT (Abb. 3–24D). In den -Se und +Se-Gruppen kam es zu einer signifikanten Steigerung um das Achtfache der entsprechenden WT-Gruppen, in ++Se war die Steigerung schwächer ausgeprägt (p = 0,054).

Während im WT keine Seleneffekte auftraten, gab es in der ++Se-Gruppe im GPx2 KO im 2. bis 4. Kryptenviertel signifikant weniger AOM-induzierte Apoptosen als in der -Se-Gruppe. Im zweiten Kryptenviertel war dieser Effekt auch im Vergleich von ++Se zu +Se sichtbar.

Eine höhere Apoptoserate im GPx2 KO im Vergleich zum WT lag demnach im basalen Zustand im Kryptengrund, nach AOM-Behandlung jedoch eher in der Kryptenmitte vor. In beiden Fällen wurde sie durch ++Se vermindert.

Da bekannt ist, dass AOM-induzierte Apoptosen p53-abhängig sind [208], wurde untersucht, ob es zwischen den Genotypen Unterschiede in der nukleären Translokation von p53 gibt. Hierzu wurde eine p53-Immunfärbung mit Hilfe eines Punktesystems ausgewertet (Abb. 3–25A).

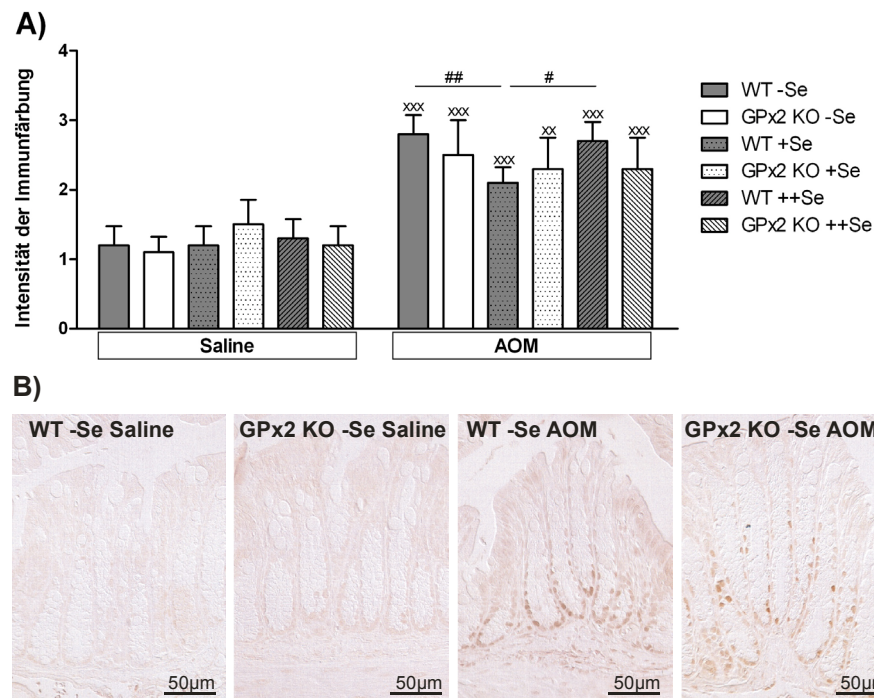


Abb. 3–25: Nukleäre Akkumulation von p53

Im distalen Colon von GPx2 KO- und WT-Mäusen auf -Se-, +Se- oder ++Se-Diät wurde 8 h nach einmaliger Injektion von AOM bzw. Saline die Intensität der nukleären p53-Immunfärbung mit Hilfe eines Punktesystems beurteilt (**A**). MW + SD, n = 5. 2way ANOVA: # p < 0,05; ## p < 0,01 für Seleneffekte; xx p < 0,01; xxx p < 0,001 vs. Saline. (**B**) Repräsentative Aufnahmen der p53-Immunfärbung des distalen Colons in den -Se-Gruppen.

In den Saline-behandelten Gruppen war eine schwache, homogene Immunfärbung zu beobachten, die weder durch den Genotyp, noch durch den Selenstatus beeinflusst wurde und die eventuell als unspezifische Hintergrundfärbung zu bewerten ist. Nach AOM-Behandlung war in allen Gruppen in der unteren Kryptenhälfte, vor allem am Kryptengrund, p53 im Zellkern erhöht (Abb. 3–25B). Im WT war die Intensität der p53-Immunfärbung im Zellkern nach AOM-Behandlung in der +Se-Gruppe signifikant geringer, als im WT bei -Se und WT bei ++Se. Unterschiede zwischen WT und GPx2 KO bestanden nicht.

3.5.2 Mehr proliferierende Zellen im GPx2 KO

Die Proliferation im Epithel des distalen Colons wurde über die Anzahl der Mitosen und die PCNA-Expression untersucht. Abb. 3–26A zeigt exemplarisch zwei Mitosen im

Kryptengrund. Da im oberen Kryptenviertel keine Mitosen vorkamen, wird es in der Grafik nicht aufgeführt.

AOM-behandelte GPx2 KO-Mäuse hatten im dritten Kryptenviertel (+Se und ++Se) und im zweiten Kryptenviertel (-Se und ++Se) signifikant mehr Mitosen, als die entsprechenden WT-Tiere (Abb. 3–26B, C). Im AOM-behandelten WT wurde die Mitoserate im zweiten Kryptenviertel durch ++Se im Vergleich zu +Se signifikant vermindert. Im WT ++Se war die Anzahl von Mitosen im dritten und vierten Kryptenviertel nach AOM-Behandlung im Vergleich zur entsprechenden Salinegruppe signifikant reduziert.

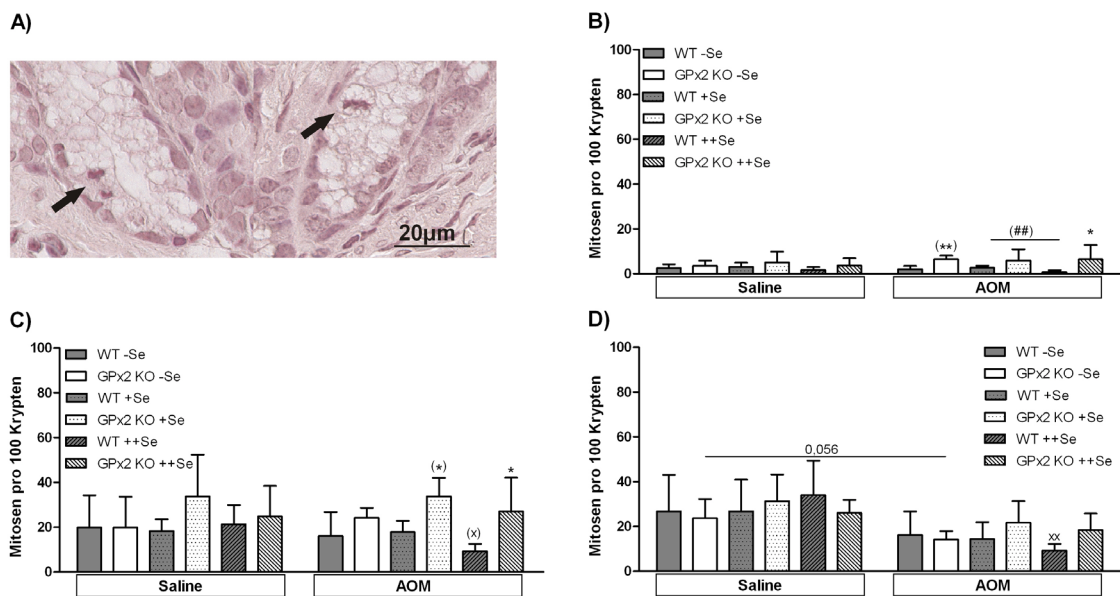


Abb. 3–26: Mitoserate

Zur Zählung von Mitosen in Hämatoxylin-gefärbten Schnitten wurde die Krypte eingeteilt, wie in Abb. 3–23 gezeigt. Mitosen wurden anhand ihrer Morphologie identifiziert, wie in (A) exemplarisch dargestellt (Pfeile). (B–D) Dargestellt ist die Anzahl von Mitosen je 100 Krypten im distalen Colon von GPx2 KO- und WT-Mäusen auf -Se-, +Se- oder ++Se-Diät 8 h nach einmaliger Injektion von AOM bzw. Saline im zweiten (B), dritten (C) und vierten (D) Kryptenviertel. Im ersten Kryptenviertel wurden keine Mitosen beobachtet. MW + SD, n = 5. 2way ANOVA: * p < 0,05 vs. WT; xx p < 0,01 vs. Saline. Student's T-Test: (##) p < 0,01 für Seleneffekte; (*) p < 0,05 vs. WT; (x) p < 0,05 vs. Saline und p-Werte wie angegeben.

Die Expression von PCNA im Zellkern markiert die proliferative Zone der Krypte. Die Länge dieser PCNA-positiven Zone sowie die Gesamt-Kryptenlänge, wurden ebenfalls im distalen Colon bestimmt. Abb. 3–27A zeigt repräsentative Aufnahmen der PCNA-Immunfärbung von Saline-behandelten Tieren. In nahezu allen Gruppen waren sowohl die PCNA-positive Zone, als auch die gesamte Krypte im GPx2 KO signifikant länger, als in den entsprechenden WT-Gruppen (Abb. 3–27B). Die Unterschiede in der Länge der PCNA-positiven Zone blieben auch nach Normalisierung auf die Gesamt-Kryptenlänge bestehen (nicht dargestellt). In allen GPx2 KO-Gruppen nahm die PCNA-positive Zone etwa 10% mehr von der Gesamt-Kryptenlänge ein, als beim WT. Eine Beeinflussung der PCNA-positiven Zone oder der Gesamt-Kryptenlänge durch den Selenstatus oder die AOM-Behandlung wurde nicht beobachtet.

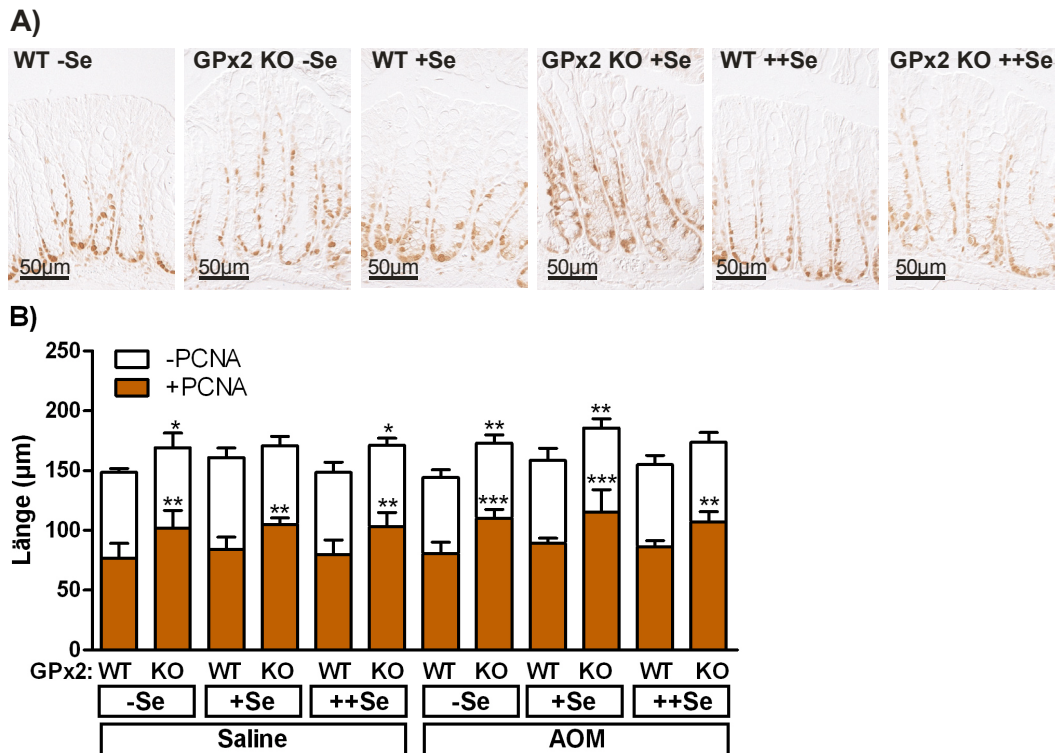


Abb. 3–27: Länge der PCNA-positiven Zone und Gesamtkryptenlänge im Colon

Die Kryptenlänge und die Länge der PCNA-positiven Zone als Maß für die proliferative Zone wurden im distalen Colon von GPx2 KO- und WT-Mäusen auf -Se, +Se oder ++Se Diät 8 h nach einmaliger Injektion von AOM bzw. Saline untersucht. **(A)** Repräsentative Photos der PCNA-Färbung in den Saline-behandelten Gruppen. **(B)** Die Länge der PCNA-positiven Zone (braun) und der PCNA-freien Zone (weiß) ergeben zusammen die Gesamt-Kryptenlänge (ganze Balken). Dargestellt sind MW + SD, n = 5. Signifikanzsymbole über dem braunen Abschnitt der Balken stellen Unterschiede in der PCNA-positiven Zone dar. Signifikanzsymbole über den Balken stellen Unterschiede in der Gesamt-Kryptenlänge dar. 2way ANOVA: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 vs. WT.

3.5.3 Cytokinlevel im Plasma

Als Marker für den Entzündungsstatus (vgl. Kap. 3.4.2) wurden Cytokinlevel im Plasma bestimmt. Neben Tnf α (vgl. Kap. 3.3.2) wurden PGE₂-Metabolite gemessen, da diese sowohl durch AOM [209] als auch durch GPx2 [74] beeinflusst werden können. Die Tnf α -Bestimmung erfolgte im Plasma unbehandelter Tiere nach 16-wöchiger Fütterung (vgl. Kap. 2.1.2), da nicht ausreichend Plasma aus dem Kurzzeitversuch zur Verfügung stand. Im +Se-Zustand hatten GPx2 KO-Mäuse signifikant höhere Plasma-Tnf α -Gehalte als der WT (Abb. 3–28A).

PGE₂-Metabolite wurden im Plasma der Mäuse im AOM-Kurzzeitversuch bestimmt (Abb. 3–28B). Im WT bei -Se und +Se wurden die PGE₂-Metabolitkonzentrationen im Plasma durch die AOM-Behandlung signifikant erhöht. Die Fütterung der ++Se-Diät bewirkte im AOM-behandelten WT eine signifikante Verminderung der PGE₂-Metabolite im Vergleich zur entsprechenden +Se-Gruppe. Auswirkungen des Genotyps auf die PGE₂-Metabolite im Plasma wurden nicht beobachtet.

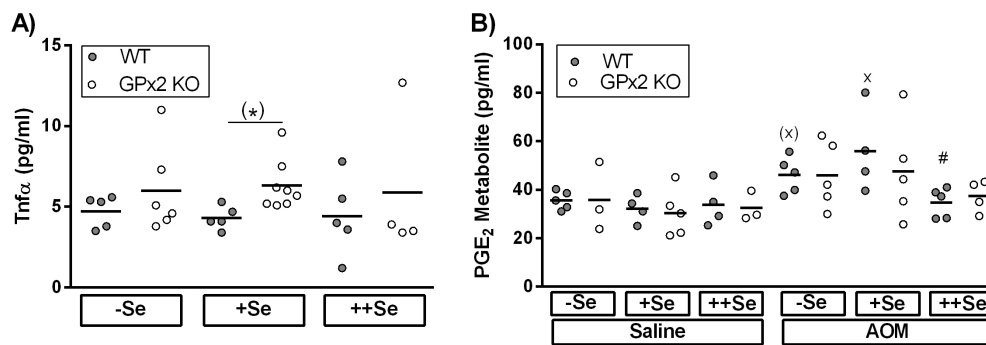


Abb. 3–28: Tnf α und PGE₂-Metabolite im Plasma

(A) Plasma-Tnf α -Gehalte von GPx2 KO- und WT-Mäusen nach 16-wöchiger Fütterung mit -Se-, +Se- oder ++Se-Diät wurden mittels ELISA bestimmt. MW + SD, n = 4-8. Student's T-Test: (*) p < 0,05. **(B)** PGE₂-Metabolite im Plasma von GPx2 KO- und WT-Mäusen auf -Se-, +Se- oder ++Se-Diät 8 h nach einmaliger Injektion von AOM bzw. Saline wurden mittels EIA bestimmt. MW + SD, n = 3-5. 2way ANOVA: # p < 0,05 vs. selenadäquate Gruppe; x p < 0,05 vs. Saline. Student's T-Test: (x) p < 0,05 vs. Saline.

Zusammenfassend hatten GPx2 KO-Mäuse im Vergleich zum WT mehr Apoptosen im Kryptengrund im basalen Zustand und mehr Apoptosen in der Kryptenmitte nach AOM-Behandlung. Diese Effekte waren bei Fütterung der -Se- und +Se-Diät am stärksten ausgeprägt und wurden durch ++Se vermindert. GPx2 KO-Mäuse hatten unabhängig vom Selenstatus längere Krypten und eine längere PCNA-positive Zone, als der WT und teilweise mehr Mitosen nach AOM-Behandlung. Bezüglich der untersuchten Cytokine wurde nur für Tnf α in der +Se-Gruppe ein erhöhter Plasmagehalt im GPx2 KO festgestellt.

4 Diskussion

4.1 Selenstatus

In allen Versuchen wurden Diäten mit verschiedenen Selengehalten gefüttert, um einerseits die Effekte einer marginal selendefizienten, -adäquaten oder -reichen Ernährung beim Menschen in WT-Mäusen zu simulieren und andererseits, um zu untersuchen, inwieweit andere, selensensitive Selenoproteine den Phänotyp des GPx2 KOs beeinflussen. Der dosisabhängige Anstieg des Selengehalts in Leber und Jejunum (Abb. 3–1B, C) demonstriert die Anreicherung von Selen in den Geweben mit steigendem Selengehalt der Nahrung.

Die Fütterung der –Se-Diät führte im Darm zu einer Halbierung der GPx-Aktivität im Vergleich zu +Se (Abb. 3–1E). Dies stimmt mit früheren Beobachtungen einer 45%igen Reduktion der GPx-Aktivität im Darm selenarmer Mäuse überein [210].

In der Leber kam es bei –Se zu einem deutlich stärkeren Absinken der GPx-Aktivität bis auf wenige Prozent der +Se-Gruppe (Abb. 3–1D), obwohl der Selengehalt der -Se-Diät immer noch bei etwa 50% der +Se-Diät lag. Diese drastische Reduktion der GPx-Aktivität in der selenarmen Leber stimmt überein mit den Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe [82] sowie mit anderen Studien mit selenarm gefütterten Mäusen [210] und Ratten [19, 211]. Letztgenannte Studien zeigten auch, dass es gleichzeitig zu einem Absinken der mRNA-Expression der niedrig in der Hierarchie der Selenoproteine stehenden GPx1 (Kap. 1.1.4) in der Leber kam, welche vermutlich ausschlaggebend für den Aktivitätsverlust im Selenmangel war [19, 211].

Zusammengefasst zeigen die Daten für Selenoprotein-Aktivität, -Protein- und -mRNA-Expression (Abb. 3–1, Abb. 3–2), dass die Fütterung der -Se-Diät eine deutliche Selen-defizienz verursachte, welche je nach Organ und betrachtetem Marker unterschiedlich stark ausgeprägt war.

Die Festlegung von 0,15 mg Selen / kg Futter als adäquaten Selengehalt beruht auf einer Optimierung der Gesamt-GPx-Aktivität, vor allem in der Leber [176]. Demnach wäre zu erwarten, dass es in diesem Organ zu keiner weiteren Steigerung der GPx-Aktivität von +Se zu ++Se kommt. Tatsächlich war im WT noch eine leichte Erhöhung der Leber-GPx-Aktivität von +Se zu ++Se zu beobachten (Abb. 3–1D), allerdings nicht in allen Versuchen. Eine ähnlich leichte und inkonsistente Steigerung der GPx-Aktivität in der Leber von +Se zu ++Se wurde auch in einer anderen Arbeit beobachtet (Abb. S1 in [82]). Vermutlich lag die eingesetzte Selenmenge genau an der Grenze der zur Optimierung der Leber-GPx-Aktivität notwendigen Dosis. Dagegen stieg der SelP-Gehalt im Plasma, ein weiterer Marker für den Selenstatus [148], von +Se zu ++Se nicht weiter an (Abb. 3–1A). Auch für Sep 15 (Abb. 3–5) sowie für die GPx1- und GPx2-Immunfärbung im WT-Colon (Abb. 3–3, Abb. 3–4) wurde kein weiterer Anstieg

von +Se zu ++Se beobachtet. Da der Großteil der Gesamt-GPx-Aktivität im Darm auf GPx1 und GPx2 zurückzuführen ist [79], stimmt diese Beobachtung mit einer vorangegangenen Arbeit überein, in der bei Fütterung der Selenidäten kein Anstieg der Gesamt-GPx-Aktivität von +Se zu ++Se im Colon von WT-Tieren detektiert wurde [80].

Auf der anderen Seite wurde im Jejunum eine deutliche Steigerung der Gesamt-GPx-Aktivität von +Se zu ++Se beobachtet (Abb. 3–1E), die bisher noch nicht beschrieben wurde. Die SelW mRNA-Expression im Colon wurde als besonders sensibler Marker für den Selenstatus identifiziert [193]. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Der SelW mRNA-Gehalt in Kryptengrundepithelzellen des Colons stieg mit zunehmendem Selengehalt der Diät sowohl von -Se zu +Se als auch von +Se zu ++Se deutlich (Abb. 3–2). Offensichtlich gibt es Selenoproteine, die, eventuell organspezifisch, auch bei Fütterung der selenadäquaten Diät noch nicht maximal exprimiert werden. Möglicherweise stehen die proliferierenden Zellen des Kryptengrunds hoch in der organspezifischen Hierarchie der Selenversorgung.

4.2 Gesteigerte Expression anderer Selenoproteine im GPx2 KO

Eine vorangegangene Arbeit zeigte eine erhöhte Gesamt-GPx-Aktivität im Colon (-Se, +Se, ++Se) und Ileum (+Se, ++Se) von GPx2 KO-Mäusen im Vergleich zum WT, welche aus einer erhöhten GPx1-Expression resultierte [80]. Da das Colon im Lang- und Kurzzeitversuch für die Analyse der AOM-Effekte benötigt wurde, konnte hier keine Gesamt-GPx-Aktivität gemessen werden. Stattdessen wurde die GPx-Aktivität im Jejunum als Marker für den Selenstatus im Darm untersucht (Abb. 3–1E). Hier wurde eine erhöhte Gesamt-GPx-Aktivität im GPx2 KO nur in der ++Se-Gruppe festgestellt. Möglicherweise ist der Genotypeneffekt in proximaleren Darmabschnitten weniger stark ausgeprägt. In der Abteilung vorliegende, nicht veröffentlichte Daten aus dem oben erwähnten Versuch (S. Krehl, M. Löwinger) zeigen Genotypunterschiede im Duodenum und im proximalen Jejunum ebenfalls nur in der ++Se-Gruppe. In der immunhistochemischen GPx1-Färbung im Colon wurde jedoch die erhöhte GPx1-Expression im Kryptengrund von GPx2 KO-Tieren [80] bestätigt (Abb. 3–4).

Da kein Einfluss des GPx2-Genotyps auf die GPx1 mRNA-Expression gefunden worden ist, wurde vermutet, dass die Steigerung der GPx1-Expression auf translationalen Mechanismen beruht [80]. Es wurde postuliert, dass im GPx2 KO durch das Fehlen der hoch in der Hierarchie stehenden GPx2 [56] mehr Selen für die Synthese der niedrig in der Hierarchie stehenden GPx1 zur Verfügung steht [80]. Um zu überprüfen, ob es sich tatsächlich um einen allgemeinen translationalen Mechanismus handelt, wurde die Expression eines weiteren, niedrig in der Hierarchie stehenden Selenoproteins untersucht. Die Aufrechterhaltung der Synthese der einzelnen Selenoproteine im Selenmangel wird durch ihre mRNA-Stabilität und translationale Mechanismen

bestimmt (siehe Kap. 1.1.2). Neben GPx1 ist auch Sep15 ein selenmangelresponsives Selenoprotein [193]. Sep15 enthält SeCys in einem CxU-Motiv und ist als Oxidoreduktase an der Proteinfaltung im ER beteiligt [212].

Zur Untersuchung der Sep15-Proteinexpression wurden Kryptengrundepithelzellen aus dem Colon isoliert, um zu vermeiden, dass mögliche spezifische Effekte in diesem Kompartiment, wie sie bei der immunhistochemischen Auswertung der GPx1-Expression beobachtet worden sind (Abb. 3–4), durch einen hohen Anteil anderer Zelltypen überdeckt werden. Ferner war Sep15, wie auch bei Irons et al. beschrieben [140], im Gesamtlysat des Colons kaum detektierbar. In den Epithelzellfraktionen war Sep15 hingegen deutlich exprimiert, was auf eine spezifische Expression in Epithelzellen hinweist. In den +Se und ++Se-Gruppen zeigte sich eine deutlich höhere Sep15-Proteinexpression im GPx2 KO als im WT. Auch im –Se-Zustand war dieser Effekt als Trend zu erkennen (Abb. 3–5). Somit entsprach das Muster der genotyp-abhängigen Sep15-Regulation im Colon dem oben zitierten Muster der Gesamt-GPx-Aktivität und GPx1-Expression in Abhängigkeit vom Genotyp. Auf mRNA-Ebene wurde die Sep15-Expression in Kryptengrundepithelzellen des Colons jedoch nicht durch den Genotyp beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Dies spricht gegen eine mögliche transkriptionelle Hochregulation von Sep15.

Im Gegensatz zu GPx1, welche als stress-responsives Selenoprotein auf die mcm⁵Um tRNA zur Synthese angewiesen ist, wurde die Sep15-Synthese bei Expression des mutierten *Trsp*-Gens ohne die entsprechende Methylierungsstelle partiell aufrecht erhalten [25] (siehe Kap. 1.1.2). „housekeeping“-Selenoproteine, die im Gegensatz zu den stress-assoziierten Selenoproteinen auch im Selenmangel noch synthetisiert werden, sind nicht abhängig von mcm⁵Um [25]. Die partielle Abhängigkeit von der mcm⁵Um tRNA legt eine mittlere Stellung von Sep15 in der Hierarchie der Selenoproteine nahe (vgl. Kap. 1.1.2). Dies stimmt mit einer signifikant reduzierten Sep15-Proteinexpression im Selenmangel überein, wohingegen von +Se zu ++Se keine weitere Steigerung beobachtet wurde (Abb. 3–5). Auch bezüglich der translationalen Regulation durch eIF4a3 (vgl. Kap. 1.1.2) besteht keine Übereinstimmung zwischen GPx1 und Sep15. Während in der GPx1 mRNA ein Typ 1 SECIS Element vorliegt, welches eine translationale Repression durch Bindung von eIF4a3 ermöglicht [28], besitzt Sep15 ein Typ 2 SECIS Element [213]. Eine Gemeinsamkeit von GPx1 und Sep15 liegt in der translationalen Regulation durch Nucleolin. Sowohl GPx1 als auch Sep15 haben eine geringe Bindungsaffinität zu Nucleolin, womit ihre Translation nicht durch Nucleolin gefördert wird [29]. GPx2 hat eine mittlere Bindungsaffinität zu Nucleolin [29] und wird somit bevorzugt translatiert. Der Wegfall der hoch in der Hierarchie stehenden GPx2 im KO könnte somit zu einer verstärkten Synthese der niedrig stehenden Selenoproteine GPx1 und Sep15 führen. Eine derartige Kompetition um die Selenoproteinsynthesemaschinerie wurde bereits im Menschen beschrieben. Ein SNP

in der 3'UTR der hoch in der Hierarchie der Selenoproteine stehenden GPx4 (Kap. 1.1.4), welcher die Effizienz der GPx4-Synthese beeinträchtigt, führte zu einer höheren Expression von GPx1 und GPx3 [214].

Somit kann diese Arbeit die postulierte Hypothese einer translationalen Hochregulation der GPx1 im GPx2 KO [80] um Sep15 erweitern und legt dementsprechend nahe, dass die Hochregulation nicht GPx1-spezifisch ist. Aus diesem Grund könnten auch weitere, niedrig in der Hierarchie stehende, Selenoproteine betroffen sein. Für die Interpretation der folgenden Ergebnisse bedeutet dies, dass nicht nur die fehlende GPx2-Expression, sondern auch die erhöhte Expression anderer Selenoproteine, Ursache für die beobachteten Effekte sein könnte.

Eine mögliche alternative Erklärung für die Hochregulation von Sep15 im GPx2 KO wäre ER-Stress (vgl. Kap. 3.3.3). Sep15 ist an der Proteinfaltung im ER beteiligt [212], und es wurde eine Induktion im Rahmen der Adaptation an ER-Stress gezeigt [215]. Eine spezifische Hochregulation von Sep15 wäre somit ebenfalls möglich, ist da keine Effekte auf mRNA-Ebene beobachtet wurden jedoch unwahrscheinlich.

4.3 Physiologische Rolle von GPx2 und Selen im Darmepithel

4.3.1 GPx2 schützt vor Apoptosen und vor oxidativen Schäden im Selenmangel

In einer vorangegangenen Arbeit war bei einer histologischen Analyse des Colonepithels eine erhöhte basale Apoptoserate im Kryptengrund von GPx2 KO-Mäusen im Vergleich zum WT festgestellt worden. Dieser Effekt war im –Se-Zustand am stärksten und wurde durch Selengabe abgesenkt, er blieb jedoch auch in der ++Se-Gruppe bestehen [80]. Diese Beobachtung konnte auf histologischer Ebene auch hier bestätigt werden (Abb. 3–24D).

In Kryptengrundepithelzellen des Colons war eine höhere Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7, die eine erhöhte Apoptoserate impliziert, im GPx2 KO im Vergleich zum WT nur im –Se-Zustand sichtbar (Abb. 3–8A). Es wäre möglich, dass die Messung der Caspaseaktivität nicht so sensitiv ist, wie die morphologische Identifikation einzelner apoptotischer Zellen, oder dass basal vorliegende, apoptotische Zellen im Isolationsprozess verloren wurden. Auch könnte die stressinduzierte Apoptose durch den Isolationsprozess basale Unterschiede in der Apoptoserate überdeckt haben.

Bei der Interpretation der Daten aus isolierten Darmepithelzellen ist zu beachten, dass auch in unstimulierten Zellen eine Stresssituation vorliegt. Durch Zellkontaktverlust wird Anoikis, eine Form der Apoptose, ausgelöst [216], in deren Verlauf es innerhalb weniger Stunden zur Caspase 3-Aktivierung kommt [217]. Es ist davon auszugehen, dass in den in dieser Arbeit analysierten Epithelzellen ähnliche Mechanismen aktiv

waren. Andere Stressfaktoren beim Isolationsprozess, wie mechanische Belastung oder die verwendeten Chemikalien, könnten ebenfalls Apoptose auslösen haben.

Im Duodenum trat kein Genotypeneffekt auf die Caspaseaktivität auf. Stattdessen war in WT und GPx2 KO die Caspase 3/7-Aktivität im –Se-Zustand im Vergleich zum +Se-Zustand signifikant erhöht und lag insgesamt auf einem deutlich höheren Niveau als im Colon. Eine marginale Selendefizienz begünstigte demnach die Apoptose von Kryptengrundzellen des Duodenums. Die Überexpression von Bcl2 kann den Zelltod durch Anoikis verhindern [216]. Bcl2 ist vor allem im Kryptengrund des Colons exprimiert, nicht jedoch im Dünndarm. Anhand von Bcl2 KO-Mäusen wurde ein Schutz vor spontaner und strahlungsinduzierter Apoptose durch Bcl2 im Kryptengrund des Colons, nicht jedoch im Dünndarm, festgestellt [111]. Dementsprechend könnte die geringe Bcl2-Expression ein Grund für eine erhöhte Anoikis-Sensitivität der Kryptengrundepithelzellen des Duodenums und dadurch für die beobachtete, erhöhte Caspase 3/7-Aktivität sein. Es wäre auch denkbar, dass der Genotypeneffekt im Colon aus einer erhöhten Anoikis-Sensitivität resultiert.

Die GPx2 reduziert H_2O_2 und Hydroperoxide. Basierend auf Zellkulturversuchen wurde ihr eine Funktion als Barriere gegen die Hydroperoxidabsorption im Darm zugeschrieben [61]. Dementsprechend war es naheliegend zu untersuchen, ob und wenn ja welche Rolle die GPx2 im antioxidativen Schutzsystem des Darmepithels *in vivo* spielt und ob die Apoptosen im GPx2 KO mit oxidativem Stress assoziiert waren. Da das Darmepithel eine Barriere zur Außenwelt bildet, ist es ständig Toxinen und reaktiven Molekülen aus Nahrung und Mikrobiota ausgesetzt. Auch werden in der Darmmucosa selbst reaktive Sauerstoffspezies produziert. Ein Netzwerk enzymatischer und nichtenzymatischer Mechanismen verhindert die oxidative Schädigung von Makromolekülen. Der Terminus „oxidativer Stress“ bezeichnet ein Ungleichgewicht zwischen antioxidativen Mechanismen und oxidativen Substanzen, in welchem letztere überwiegen [218]. Gleichzeitig haben einige reaktive Spezies (RS) wichtige Funktionen in der Immunabwehr und der Signaltransduktion. Zu den RS, die oxidativen Stress auslösen, gehören neben Sauerstoff-, auch Chlor- und Stickstoffverbindungen [184]. Abb. 4–1 gibt eine Übersicht über die wichtigsten Quellen für reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) sowie über die an der Detoxifizierung dieser RS beteiligten Enzyme. Eine zentrale Bedeutung bei der Reduktion von H_2O_2 und Hydroperoxiden haben Glutathionperoxidasen (Kap. 1.1.4). Neben GPx1 und GPx2 [69] werden auch GPx3 und 4 im Darmepithel exprimiert [193].

Die Rolle der GPx2 im antioxidativen System der Darmmucosa wurde in Darmepithelzellen mittels DHR-Assay bestimmt. Diese Methode detektiert relativ unspezifisch diverse RS, insbesondere Peroxynitrit und Hypochlorid. Auch Hydroperoxide wie H_2O_2 können detektiert werden [219, 220]. Die basalen Gehalte reaktiver Spezies wurden

nicht durch den Genotyp beeinflusst (Abb. 3–6A). Eine Stimulation mit dem Hydroperoxid HPODE führte jedoch im selenarmen GPx2 KO zu einer deutlich stärkeren DHR-Oxidation als im WT und im GPx2 KO +Se. Wie bereits vorher beschrieben [62, 80], wurde auch in dieser Arbeit ein Gradient der GPx2-Expression entlang der Colontypen, mit der stärksten Expression am Kryptengrund, festgestellt (Abb. 3–3). Während GPx1 im WT-Colon -Se nicht exprimiert war (Abb. 3–4), wurde die GPx2-Expression im Kryptengrund des WT auch in -Se auf niedrigem Niveau aufrechterhalten (Abb. 3–3). Demnach ist GPx2 vor allem im -Se-Zustand wichtig für den Schutz des Darmepithels vor Hydroperoxiden. Im +Se-Zustand kann offensichtlich ein anderes Selenoprotein, vermutlich die im GPx2 KO verstärkt exprimierte GPx1, diese Funktion kompensieren.

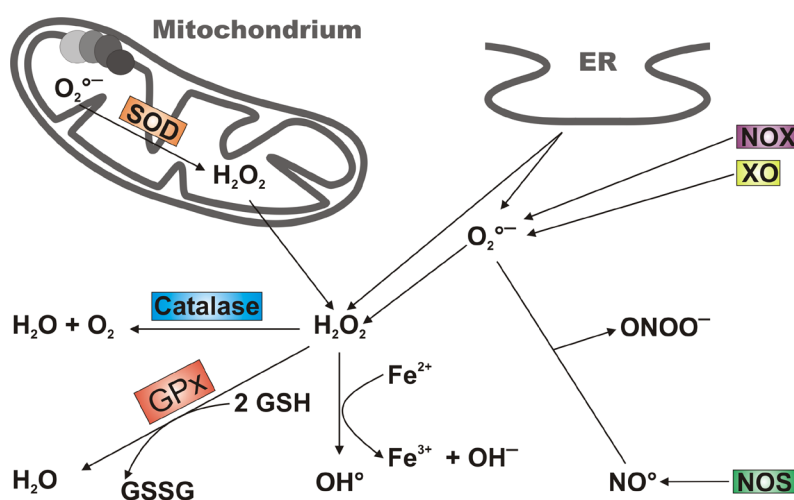


Abb. 4–1: Redox-Homöostase

Abbildung modifiziert nach [221]

Die wichtigste intrazelluläre Quelle für Superoxidanionradikale ($O_2^{\bullet-}$) ist die Atmungskette in den Mitochondrien. Des Weiteren wird $O_2^{\bullet-}$ durch NADPH Oxidasen (NOX) gebildet. Dies geschieht beim „oxidativen Burst“ von Phagozyten. Verschiedene NOX-Isoformen werden jedoch auch in Nicht-Immunzellen gebildet, wo die durch sie katalysierte ROS-Bildung an Signaltransduktionswegen beteiligt ist. Durch Reaktion mit Fe^{2+} können aus H_2O_2 reaktive Hydroxylradikale (OH^\bullet) entstehen (Fenton-Reaktion) [222]. $O_2^{\bullet-}$ wird durch Superoxiddismutasen (SOD) zu H_2O_2 und Wasser umgewandelt. Weitere ROS oder RNS bildende Enzyme sind Xanthinoxidase, Cyclooxygenasen und NO-Synthasen (Überblick bei [223]). Extrazellulär können ROS-generierende Toxine [224] sowie Lipidhydroperoxide aus der Nahrung [225] oxidativen Stress im Darmepithel auslösen. Neben Catalase katalysiert eine Reihe von Enzymen wie Peroxiredoxine, Glutaredoxine, sowie Thioredoxinreduktasen und Glutathionperoxidasen die Reduktion von H_2O_2 und Hydroperoxiden bzw. von Disulfiden in Proteinen und redoxaktiven Verbindungen wie Trx oder GSH und kontrolliert somit den Redox-Status der Zelle [226–229].

Die Hypothese der GPx2-Expression im Darm als Barriere gegen Hydroperoxide beruht auf Versuchen mit CaCo2-Colonkarzinomzellen in Einzellschichtkultur [61]. Bei einer Inkubation gelangte das Hydroperoxid HPODE nicht auf die basolaterale Seite, solange die Einzellschicht intakt war. Da dies auch im Selenmangel der Fall war und in diesem Zustand nur GPx2, nicht jedoch GPx1 gebildet wurde, ist der GPx2 eine essenzielle Rolle im Schutz vor der Resorption von Hydroperoxiden im Darm zugeschrieben worden. In selensupplementierten Zellen konnte die Integrität der Einzellschicht hingegen wesentlich länger aufrechterhalten und der HPODE-Transport zur basolateralen Seite verhindert werden, wohingegen es in selenarmen Zellen schnell zu

einem Verlust der Barriereintegrität und zur Diffusion von HPODE auf die basolaterale Seite kam. Somit spielt auch GPx1 eine Rolle im Schutz vor oxidativen Schäden im Darm [61].

Aus der zitierten Arbeit [61] und den vorliegenden Daten lässt sich schließen, dass die residuale GPx2-Expression im Selenmangel den Schutz vor Hydroperoxiden aufrechterhält. Die spezifische Expression der hoch in der Hierarchie der Selenoproteine stehenden GPx2 bietet demnach speziell den proliferierenden Zellen im Kryptengrund Schutz vor oxidativem Stress.

Der DHR-Assay ergab allerdings keine Hinweise für oxidativen Stress im GPx2 KO ohne Stimulation mit Oxidanzien. Jedoch ist die Aussagekraft dieser Methode eher gering, da sie relativ unspezifisch ist und nicht alle reaktiven Spezies effektiv detektiert [230]. Eine Untersuchung von DNA-Schäden mittels Comet-Assay zeigte in unbehandelten Kryptengrundepithelzellen des GPx2 KO -Se eine stärkere DNA-Schädigung als im WT oder im GPx2 KO +Se (Abb. 3–7). Dies könnte darauf hindeuten, dass das Fehlen der GPx2 bereits basal DNA-Schäden verursacht, die wiederum bei ausreichender Selenversorgung vermutlich durch GPx1 verhindert werden können. Es wurde aber auch gezeigt, dass Comet-Strukturen in frühen Apoptosestadien ohne zusätzliche genotoxische-Schädigungen entstehen können [231]. Somit könnte die erhöhte Apoptoserate im GPx2 KO -Se zu falsch-positiven Ergebnissen im Comet-Assay geführt haben.

Die vorliegenden Daten legen nahe, dass zumindestens im -Se-Zustand oxidativer Stress im GPx2 KO eine Ursache für die erhöhte Apoptoserate gewesen sein könnte. Über die Mechanismen, welche der in histologischen Schnitten beobachteten, erhöhten Apoptoserate im GPx2 KO in +Se und ++Se zugrunde liegen, lassen sie hingegen keine Aussage zu. Hierfür wären sensitive und zellorganellspezifische Nachweise einzelner RS notwendig. Die Substratspezifität von GPx1 und GPx2 ist ähnlich, es liegen jedoch Hinweise vor, dass GPx2 organische Hydroperoxide besser umsetzen kann als GPx1 [57, 61]. Auch eine spezifische Lokalisation von GPx2 in der Zelle könnte einen Einfluss dieses Enzyms auf die Apoptoserate erklären, welcher durch die erhöhte GPx1-Expression nicht kompensiert werden kann. Im humanen Colonepithel wurde eine Veränderung der subzellulären GPx2-Expression entlang der Kryptenachse sowie in frühen transformierten Krypten beschrieben, und mit der Beeinflussung apoptotischer Prozesse durch GPx2 in Zusammenhang gebracht [62]. Es wäre zudem möglich, dass GPx2 Apoptose durch Reduktion einer bestimmten RS beeinflussen kann. Einige RS haben Signalcharakter, was durch proliferationsstimulierende Effekte physiologischer, geringer H₂O₂-Dosen sowie die physiologische RS-Produktion in Zellen als Reaktion auf diverse Stimuli wie Wachstumsfaktoren und Cytokine, belegt wird [232]. Mechanistisch beruht diese Signalwirkung vor allem auf der Oxidation von

Thiolgruppen redoxsensitiver Zielproteine, wie Transkriptionsfaktoren, Proteintyrosinkinase und Proteintyrosinphosphatasen [221]. Auf diese Weise kann eine Reihe von Signalwegen und Transkriptionsfaktoren durch Redox-Modulation beeinflusst werden (Übersicht bei [221, 233]). Im Zusammenhang mit der Homöostase des Darmepithels ist vor allem die Aktivierung von β -Catenin (vgl. Kap. 1.2.1) durch Oxidation von Nucleoredoxin zu nennen [234]. Eine ROS-Produktion durch die, auch im Colon exprimierte [235], NOX1 ist essenziell für die Erhaltung der proliferativen Eigenschaften von Kryptenepithelzellen, da sie den Wnt- und Notch-Signalweg reguliert [236].

Allgemein wird die zelluläre Reaktion durch den Grad der Verschiebung hin zu einem stärker oxidativen Milieu bestimmt. In normalen, mitotisch kompetenten Zellen stimulieren geringe Mengen H_2O_2 bzw. ein leicht oxidativer Redox-Status die Proliferation. Bei einer weiteren Steigerung kommt es jedoch zu Differenzierung und Zellzyklusarrest und schließlich zu Apoptose, während sehr hohe H_2O_2 -Mengen direkt zytotoxisch wirken und auch einen nekrotischen Zelltod zur Folge haben können (siehe Abb. 4–2) [225, 232, 237, 238]. Eine erhöhte ROS-Bildung wird zudem als Signal in apoptotischen Signalwegen, welche durch nicht-oxidative Stimuli ausgelöst wurden, diskutiert. Antioxidantien wirken auch durch Verhinderung dieser ROS-Bildung anti-apoptotisch (diskutiert in [239-241]).

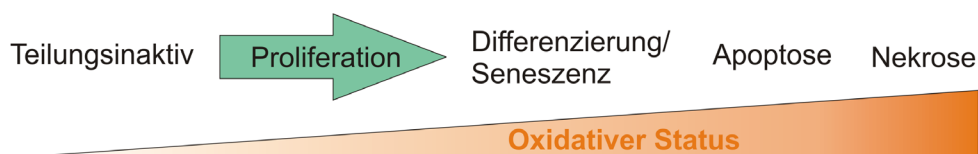


Abb. 4–2: Zelluläre Reaktionen in Abhängigkeit vom Redoxstatus

Durch die Reduktion von ROS wäre ein Einfluss von GPx2 auf nicht direkt durch oxidativen Stress induzierte Apoptosen oder eine Störung des in Abb. 4–2 dargestellten Redox-Gleichgewichts im GPx2 KO denkbar. Wegen eines beobachteten Zusammenhangs zwischen der Differenzierung embryonaler Stammzellen mit einem ROS-Anstieg und einer verminderten GPx2- und SOD2-Expression wurde postuliert, dass eine spezifische Expression dieser antioxidativen Enzyme in proliferierenden embryonalen Stammzellen dazu dient, diese vor einem zu starken ROS-Anstieg zu schützen, welcher zu Differenzierung und Seneszenz bzw. Apoptose führen würde [67]. Eine ähnliche Funktion könnte die GPx2 auch in adulten Stammzellen im Darm ausüben.

In vitro verminderte die GPx2-Überexpression H_2O_2 -induzierte Apoptosen und wirkte einer p53-Stabilisierung entgegen [65]. Eine, für diese Arbeit erfolgte, immunhistochemische Analyse der p53-Expression im Colon zeigte jedoch keinen Unterschied in der nukleären Lokalisation von p53 zwischen den Genotypen in Saline-behandelten Tieren (Abb. 3–25). Somit scheint die in histologischen Schnitten beobachtete, erhöhte basale Apoptoserate im GPx2 KO nicht p53-abhängig zu sein, was wiederum ein Hinweis darauf sein könnte, dass es sich nicht um klassische

stress-induzierte Apoptosen handelt (vgl. Kap. 1.2.2). Um dies zu verifizieren, müsste die p53-Aktivierung jedoch auch auf anderen Ebenen untersucht werden, um eine ungenügende Sensitivität des verwendeten Antikörpers auszuschließen.

4.3.2 Latente Entzündung in GPx2 KO-Mäusen und aktive Entzündung nach AOM-Behandlung

In einem PCR-Array wurde festgestellt, dass die erhöhte Apoptoserate im GPx2 KO mit einer erhöhten Tnf α -Expression assoziiert war (Tab. 3-1). Im Kryptengrund des Colons und Duodenums von GPx2 KO-Tieren (-Se und +Se) wurden erhöhte Tnf α -mRNA-Gehalte im Vergleich zum WT durch *qPCR* bestätigt (Abb. 3–10). Dieser Unterschied bestand vor allem im Kryptengrund, dem Kompartiment, in welchem im WT GPx2 lokalisiert ist (Abb. 3–3). Auf Proteinebene wurden erhöhte Tnf α -Gehalte im GPx2 KO im Vergleich zum WT in Überständen der *ex vivo*-Kultur von Darmabschnitten in der -Se-Gruppe (Abb. 3–11) sowie im Plasma in der +Se-Gruppe (Abb. 3–28A) gefunden. Generell lässt sich also feststellen, dass sich die erhöhten mRNA-Gehalte in Epithelzellen auf Proteinebene widerspiegeln. Tnf α könnte demnach auch ein kausaler Faktor für die gesteigerte Apoptoserate im Kryptengrund von GPx2 KO-Mäusen sein.

TNF α kann durch NF κ B [242] sowie über Aktivatorprotein 1- und cAMP-responsive Elemente [243] induziert werden und die TNF-Rezeptoren 1 und 2 (TNFR1 und TNFR2) aktivieren. TNFR1 ist ein sogenannter „Todesrezeptor“ (engl.: „*death receptor*“), welcher Apoptose auslösen kann (vgl. Kap. 1.2.2). Eine gleichzeitige Aktivierung von NF κ B- und JNK- (engl.: *c-Jun N-terminal kinase*) Signalwegen wirkt jedoch antiapoptotisch [244]. TNFR2 enthält keine Todesdomäne und aktiviert NF κ B, JNK, PI3K (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat 3-Kinase) und mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalwege [245]. Während die meisten Zellen TNFR1 exprimieren, wird TNFR2 überwiegend von Immunzellen sowie von Endothelzellen gebildet [194]. In Epithelzellen des Colons wird vorwiegend TNFR1 exprimiert, in der Maus sowie in Colitis-Patienten wurde jedoch auch eine Induktion des TNFR2 durch proinflammatorische Cytokine bei intestinaler Entzündung beobachtet [246]. In murinen Colonepithelzellen konnte zudem eine Aktivierung des NF κ B-Signalwegs durch TNF α über den TNFR2 nachgewiesen werden [107].

Im Colon von GPx2 KO-Mäusen wurde im Vergleich zum WT eine gesteigerte Infiltration von Makrophagen, die eine der Hauptquellen für TNF α im Darm sind [194], festgestellt (Abb. 3–12). Die erhöhte Tnf α -Expression und Makrophagendichte im Darm von GPx2 KO-Mäusen sowie die erhöhten Tnf α -Gehalte im Plasma der +Se-Gruppe, weisen auf das Vorliegen einer niedriggradigen Entzündung hin. Zudem hatten GPx2 KO-Mäuse längere Krypten und eine etwa 10% längere PCNA-positive

proliferative Zone als WT-Mäuse (Abb. 3–27). Eine Kryptenelongation wurde in, durch Colitis charakterisierten, Mausmodellen wie TCR α KO [247, 248], I110 KO [249] und in Muc2-defizienten Mäusen [250] sowie nach bakterieller Infektion [251] beschrieben. Auch eine DSS-induzierte Colitis führte in Mäusen zu einer Kryptenelongation [252] und erhöhte die Anzahl Ki-67-positiver, proliferierender Zellen in Ratten [253]. Ferner war in Colonepithelzellen von *Colitis Ulcerosa*-Patienten die Anzahl Ki-67 positiver proliferierender Zellen erhöht und Ki67-positive Zellen auch im luminalen Teil der Krypte vorhanden [254]. Somit könnten auch die in dieser Arbeit beobachtete Kryptenelongation und die Elongation der proliferativen Zone ein Indiz für das Vorliegen einer chronischen, niedriggradigen Entzündung im GPx2 KO sein.

Unklar bleibt der zelluläre Ursprung der erhöhten Tnf α -Expression. Im Darmepithel wurde bisher nur in Panethzellen im Dünndarm von Mäusen [255] und Menschen [256] eine TNF α Expression auf mRNA- nicht jedoch auf Proteinebene gefunden. Es ist nicht ausgeschlossen, dass auch die cKit-positiven Becherzellen im Kryptengrund des Colons, welche Panethzelleigenschaften aufweisen (siehe Kap. 1.2.1), TNF α -mRNA synthetisieren. Dies könnte erklären, warum sowohl im GPx2 KO als auch im WT bei -Se höhere mRNA-Gehalte im Kryptengrund als im Villus bzw. in der Kryptenspitze vorlagen (Abb. 3–10). Da AU-reiche Elemente in der 3'UTR der TNF α mRNA die Translation reprimieren, wäre es möglich, dass in nichthematopoietischen Zellen eine Expression auf mRNA-Ebene keine Expression auf Proteinebene bedingt [257]. Neuere Arbeiten geben jedoch Hinweise darauf, dass es zumindest unter bestimmten Bedingungen zu einer TNF α -Synthese in Darmepithelzellen kommen kann, welche zu einer verstärkten Rekrutierung F4/80-positiver Makrophagen führt [258]. Weiterhin können Darmepithelzellen entweder selbst eine Quelle für TNF α im Darmepithel darstellen oder zumindestens dessen Ausschüttung durch einen anderen Zelltyp vermitteln [259]. Die in dieser Arbeit beobachteten höheren mRNA-Gehalte in den GPx2 KO-Epithelzellen könnten entweder ursächlich für die höheren Proteingehalte im Darm und im Plasma, oder durch extrazellulären Tnf α induziert worden sein, welcher seinen Ursprung in Immunzellen hat. Denn TNF α kann sich über den TNFR1 selbst induzieren [243, 260]. Die erhöhte Makrophagendichte im GPx2 KO trug wahrscheinlich zu den erhöhten Tnf α -Proteingehalten in den Überständen *ex vivo*-Kultur von Darmabschnitten bei. Ob auch eine Tnf α -Sekernierung aus den Darmepithelzellen einen Anteil hieran hatte bzw. ob sich die erhöhten Tnf α mRNA-Gehalte in Darmepithelzellen überhaupt auf Proteinebene auswirkten, kann anhand der vorliegenden Daten nicht geklärt werden.

Eine erhöhte Apoptoserate kann die Barrierefunktion des Darmepithels stören, und eine gesteigerte Permeabilität der Darmbarriere durch TNF α -induzierte Apoptosen von Epithelzellen wird als wichtiger Faktor in der Pathogenese entzündlicher Darmerkrankungen angesehen [261]. Somit könnte im GPx2 KO, vor allem im -Se-Zustand, eine

Störung der Darmbarrierefunktion zu einer entzündlichen Reaktion und dadurch zu einer Tnf α -Ausschüttung geführt haben. Solch eine Ausschüttung durch Immunzellen könnte eine Tnf α -Induktion in den Epithelzellen, zumindestens auf mRNA-Ebene, bewirkt haben. Andererseits könnte, wie oben beschrieben, auch eine Tnf α -Sekretion durch Epithelzellen zu einer Rekrutierung F4/80-positiver Makrophagen geführt haben. Anhand der vorliegenden Proben kann dieser Zusammenhang nicht weiter geklärt werden, zumal Tnf α im Darmepithel immunhistochemisch nicht detektiert werden konnte.

Mäuse mit einem Doppelknockout (DKO) von GPx1 und GPx2 (GPx1^{-/-} GPx2^{-/-}) sind durch eine erhöhte Anzahl von Apoptosen und Mitosen sowie eine massive Entzündung im Colon und Ileum gekennzeichnet, in deren Verlauf sie Colitis-assoziierte Colontumore entwickeln [69, 79]. Diese Symptome waren abhängig von einer Kolonialisierung mit kommensalen Bakterien und traten in keimfreien Mäusen nicht auf [262]. Bereits ein Allel der GPx2 (GPx1^{-/-} GPx2^{+/-}), nicht jedoch ein Allel der GPx1 (GPx1^{+/-} GPx2^{-/-}), konnte die Entzündungssymptome stark abmildern [79]. Dies ist umso erstaunlicher, da die residuale Gesamt-GPx-Aktivität im Darm der GPx1^{-/-} GPx2^{+/-} Tiere niedriger war als im Darm der GPx1^{+/-} GPx2^{-/-}-Tiere [79] und legt eine antiinflammatorische Funktion der GPx2 nahe, die schon durch geringe Mengen GPx2, nicht jedoch von GPx1, erfüllt werden kann. GPx2 KO-Mäuse hatten zudem eine schwerere DSS-induzierte Colitis im AOM/DSS-Modell [82]. In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass ein *knockout* der GPx2 alleine bereits basal zu einer latenten Entzündung des Darms führt. Diese zeigt sich vorrangig im -Se- und +Se-Zustand, wo erhöhte Tnf α - Expression und Makrophagengehalte im Colon korrelieren, nicht jedoch in ++Se. Auch dies ist in Übereinstimmung mit dem AOM/DSS-Versuch, in dem durch Fütterung der ++Se-Diät die DSS-induzierte Entzündung im GPx2 KO abgemildert wurde [82].

Im Langzeitversuch zur AOM-induzierten Colonkanzerogenese hatten AOM-behandelte GPx2 KO-Tiere tendenziell ein höheres Milzgewicht als die entsprechenden WT-Tiere (Abb. 3–17). In der -Se-Gruppe war dieser Effekt am stärksten und signifikant. Ein gesonderter Vergleich von AOM-behandelten Tieren mit und ohne Tumoren zeigte zudem, dass der Effekt unabhängig vom Auftreten von Adenomen war (Daten nicht gezeigt). In Darmrollen AOM-behandelter Tiere im Langzeitversuch wurden ausschließlich in den GPx2 KO-Tieren bei -Se entzündliche Läsionen im Colon festgestellt, welche bis hin zu einer floriden Entzündung reichten (Abb. 3–20). Dies und die erhöhten Milzgewichte demonstrieren, dass die AOM-Behandlung in dieser Gruppe den Übergang von einer latenten zu einer aktiven Entzündung ausgelöst hatte. Die Beschränkung auf die -Se-Gruppe legt nahe, dass ein anderes Selenoprotein, z. B. GPx1, nur bei ausreichender Selenversorgung der Ausbildung einer aktiven Entzündung entgegenwirken konnte.

Das Modell der chemisch durch AOM-induzierten Colonkanzerogenese wird zur Untersuchung der sporadischen, nicht entzündungsassoziierten Colonkanzerogenese verwendet [123]. In selenarmen GPx2 KO-Mäusen wurde, vermutlich als Folge der AOM-Injektionen, dennoch eine aktive Entzündung ausgelöst. AOM induziert Apoptosen spezifisch im proliferativen Kryptengrundkompartiment mit einem Maximum nach 8 h [207, 263]. Im Kurzzeitversuch trat 8 h nach AOM-Behandlung in allen Gruppen eine massiv erhöhte Apoptoserate in der unteren Kryptenhälfte auf, welche im -Se GPx2 KO bis in die obere Kryptenhälfte (zweites Kryptenviertel) reichte (Abb. 3–24). Eine exzessive Apoptose von Darmepithelzellen kann die Barrierefunktion des Epithels stören, und zum Eindringen von Bakterien sowie zur Entstehung einer Entzündung führen [101, 102]. Möglicherweise ist in den -Se GPx2 KO-Mäusen die Barrierefunktion des Epithels bereits durch die basal erhöhte Apoptoserate angegriffen, was auch ein Grund für die oben beschriebene, niedriggradige Entzündung sein könnte. Vor allem in Kombination mit dem massiven, AOM-induzierten Zellverlust könnte sich dann eine aktive Entzündung ausbilden. Dass sich die Läsionen nicht zurückbilden, sondern auch 16 Wochen nach der letzten AOM-Injektion noch vorhanden sind, zeigt, dass selenarme GPx2 KO-Tiere nicht in der Lage waren, das Epithel zu regenerieren. Dies lag entweder am fortgesetzten erhöhten Zellverlust durch Apoptose, oder daran, dass der Entzündungsprozess durch das Fehlen der antiinflammatorischen Eigenschaften der GPx2 nicht aufgelöst werden konnte. Ob letztendlich die erhöhte Apoptoserate durch Störung der epithelialen Barrierefunktion zu den entzündlichen Prozessen führte, oder ob das Fehlen der antiinflammatorischen Funktionen der GPx2 im GPx2 KO entzündliche Vorgänge, und dadurch eine erhöhte Apoptoserate, auslöste, kann in diesem konstitutiven *Knockout*-Modell nicht abschließend geklärt werden.

Die Erhöhung von Entzündungsmarkern im GPx2 KO, trotz erhöhter GPx1-Expression im Colon von GPx2 KO-Tieren auch im -Se-Zustand (Abb. 3–4) und höherer Gesamt-GPx-Aktivität im Vergleich zum WT [80] zeigt, dass GPx2 eine spezifische antiinflammatorische Aktivität hat, welche nicht einfach mit der allgemeinen Kapazität zur Hydroperoxidreduktion gleichzusetzen ist. Ein möglicher Ansatzpunkt für einen Einfluss der GPx2 auf inflammatorische Prozesse ist die Regulation der Cyclooxygenase 2 (COX2), einem der Schlüsselenzyme in der Synthese proinflammatorischer Prostaglandine aus Arachidonsäure [264]. In HT29-Colonkarzinomzellen mit GPx2 KD wurde eine erhöhte Cox2-Expression sowie eine daraus resultierende erhöhte PGE₂-Synthese beobachtet, welche vermutlich aus einem verminderten Abbau für die COX2-Aktivität benötigter [265] Hydroperoxide resultierte [74]. Die PGE₂-Synthese durch COX2 wird zudem durch TNF α induziert, woran eine Tyrosinkinase-abhängige NF κ B-Aktivierung [266] sowie die Synthese von Sphingosinphosphat [267] beteiligt sind. Ein Einfluss auf den Eicosanoidstoffwechsel wurde auch für andere Glutathionperoxidasen beschrieben. So beruht die antiapoptotische Wirkung der GPx4 auf einer Redox-

Regulation der Lipoxygenase 12/15 [52]. In Kryptengrundepithelzellen des Darms konnten mögliche Unterschiede der Cox2-Expression nicht weiter untersucht werden, da diese auf mRNA-Ebene unter der Detektionsgrenze lag.

Zusammenfassend beschreibt diese Arbeit erstmals eine basale, niedriggradige intestinale Entzündung im GPx2 KO und ihren Übergang in eine aktive Entzündung in selenarmen, AOM-behandelten Tieren und untermauert hierdurch die Theorie einer antiinflammatorischen Funktion der GPx2.

4.3.3 Aktivierung stress-responsiver Signalwege im GPx2 KO

Intestinale Entzündung ist eng verknüpft mit ER-Stress, und kann sowohl Folge als auch Ursache von ER-Stress sein. RS spielen hier eine wichtige Rolle als Mediatoren [197, 268].

ER-Stress kann durch eine Reihe von Faktoren ausgelöst werden und ist durch eine Akkumulation fehlgefalteter Proteine im ER gekennzeichnet, in deren Folge die „*unfolded protein response*“ (UPR) ausgelöst wird. Die transkriptionalen und translationalen Kontrollmechanismen der UPR dienen zunächst dem Überleben der Zelle, indem protektive Proteine induziert und die Belastung des ERs durch Translationsarrest und den Abbau fehlgefalteter Proteine reduziert wird. Bei andauerndem ER-Stress kommt es jedoch zur Aktivierung proapoptotischer Signalwege und somit letztendlich zur Apoptose. Der Hauptsensor für ER-Stress ist das Chaperon GRP78, welches im ungestressten ER die Initiatoren der drei verschiedenen Arme der UPR, IRE1, PERK (engl.: *PKR like ER kinase*) und ATF6 in einem inaktiven Zustand hält (Abb. 4–3). GRP78 fungiert als Sensor für fehlgefaltete Proteine und dissoziiert bei ER-Stress von seinen Bindungspartnern, wodurch die UPR ausgelöst wird. IRE1 spaltet sodann in einer unkonventionellen Spleißreaktion die Xbp1 mRNA. Aus der gespleißten Xbp1_s mRNA wird in der Folge ein Transkriptionsfaktor synthetisiert, welcher über das UPR-responsive Element (UPRE) eine Reihe von Zielgenen induziert. ATF6 transloziert nach Aktivierung in den Golgi-Apparat, wo er durch Proteasen in eine aktive Form überführt wird, die anschließend im Nukleus Zielgene wie GRP78, CHOP (GADD153) und Xbp1 über das ER-Stress-responsive Element (ERSE) induzieren kann. Die aktive PERK phosphoryliert eIF2 α , einen essenziellen Bestandteil des eukaryotischen Translationsinitiationsapparats. Diese Phosphorylierung führt zu einem Arrest der allgemeinen Proteintranslation und zum Zellzyklusarrest, während gleichzeitig die Translation bestimmter UPR-Proteine, wie ATF4, verstärkt wird. ATF4 kann wiederum als Transkriptionsfaktor das UPRE aktivieren [198]. (vgl. Abb. 4–3)

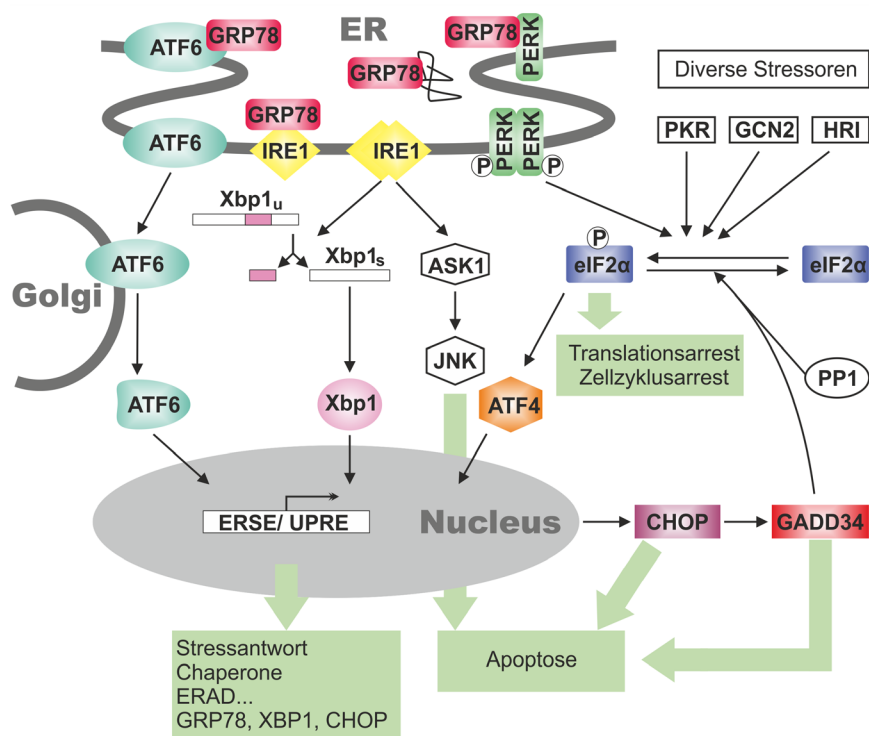


Abb. 4–3: UPR und ISR

Abbildung modifiziert nach [198]. Erklärung siehe Text.

Die eIF2 α -Phosphorylierung kann auch durch andere Stresssignale, vermittelt über die Kinasen GCN2 (engl.: *general control non-repressed 2*), PKR (engl.: *protein kinase activated by dsRNA*) und HRI (engl.: *heme regulated inhibitor*), ausgelöst werden. Die Integration diverser zellulärer Stresssignale in eine PERK, PKR, GCN2 oder HRI vermittelte eIF2 α -Phosphorylierung wird auch als integrierte Stressantwort (engl.: *integrated stress response*, ISR) bezeichnet und kann auch unabhängig von ER-Stress Translations- und Zellzyklusarrest und Apoptose auslösen [269, 270] (siehe Abb. 4–3).

ER-Stress-induzierte Apoptose wird unter anderem durch eine sequenzielle Aktivierung der Caspasen 12, 9 und 3 vermittelt, und kann durch IRE1 ausgelöst werden. Des Weiteren ist CHOP (GADD153) ein zentraler proapoptotischer Mediator von UPR und ISR [271]. Dieser Transkriptionsfaktor kann als Heterodimer mit anderen Transkriptionsfaktoren sowohl zur transkriptionalen Aktivierung, als auch zur Reprimierung von Genen führen [272]. CHOP reguliert unter anderem Gene der Bcl2-Familie [273]. Ein weiteres Zielgen von CHOP mit proapoptotischen Eigenschaften ist GADD34 [274–276].

Im Darm der in dieser Arbeit untersuchten GPx2 KO-Mäuse wurden eine erhöhte Tnf α -Expression und weitere Anzeichen einer niedriggradigen Entzündung festgestellt (Kap. 4.3.2). Es wurde gezeigt, dass Colitis beim Menschen und im Mausmodell mit ER-Stress einhergeht [197, 277]. Tnf α kann die UPR über ROS induzieren [196] und die UPR-Komponente GRP78 verstärkt die NF κ B-Aktivierung durch Tnf α und kann so zur Pathogenese chronischer Darmentzündungen beitragen [277]. Darüber hinaus können

aber auch Proteine der UPR und ISR selbst, wie phospho-eIF2 α und die eIF2 α -Kinasen [278-280], IRE1 [281] sowie ein ER-Stress-vermittelter Anstieg von intrazellulärem Ca²⁺ und ROS [282] zur Aktivierung des zentralen zellulären Stressensors und Entzündungsmediators NF κ B führen. ER-Stress sensibilisiert Zellen außerdem für TNF α -induzierte Apoptose, indem durch eine Verminderung der TRAF2 (engl.: *TNFR associated factor 2*)-Expression die Aktivierung der von den TNFR ausgehenden antiapoptotischen Signalwege zugunsten der proapoptotischen vermindert wird [281]. Hieraus wird geschlossen, dass ER-Stress ein wichtiger Faktor in der Pathogenese intestinaler Entzündungen ist [197, 283].

In Kryptengrundepithelzellen des Duodenums lag im GPx2 KO neben einer höheren Tnf α mRNA-Expression auch eine höhere Chop (Gadd153)- und Gadd34 mRNA-Expression als im WT vor (Abb. 3–13). Dies könnte, wie oben diskutiert, ein Zeichen für eine Aktivierung der UPR oder ISR durch Tnf α sein. Auch eine Ceramid-abhängige GADD34-Induktion durch TNF α wurde beschrieben [275]. Andererseits wäre es auch möglich, dass eine erhöhte Suszeptibilität der GPx2 KO-Mäuse für ER-Stress ursächlich für die erhöhte Tnf α -Produktion ist. In GPx1/ 2 DKO-Mäusen wurde ein verstärktes Xbp1-Spleißing im Vergleich zum WT nach Fütterung einer artherogenen Diät beschrieben, was ebenfalls auf ER-Stress hindeutet [284]. Allerdings war im Duodenum der GPx2 KO-Mäuse weder ein erhöhtes Xbp1_s/Xbp1-Verhältnis, noch eine eIF2 α -Phosphorylierung oder eine erhöhte Grp78-Proteinexpression erkennbar. Die basale Xbp1-Expression war jedoch im GPx2 KO -Se im Vergleich zum WT erhöht (Abb. 3–14). Diese Daten lassen keine endgültige Aussage darüber zu, ob es sich um ER-Stress oder um eine anderweitige Aktivierung der ISR handelt. Da Mäuse mit einem konstitutiven GPx2 KO untersucht wurden, muss angenommen werden, dass nicht alle sequenziell verlaufenden Schritte der stress-responsiven Signalwege detektiert werden können, sondern nur eine veränderte Balance oder Aktivierung einzelner Komponenten, die das Resultat verschiedener gegenregulatorischer Mechanismen ist. Erschwerend kommt außerdem hinzu, dass das zur Epithelzellisolation verwendete DTT selbst ER-Stress induzieren kann, sodass nicht unterschieden werden kann, ob die beobachteten Effekte basal vorlagen oder erst durch eine erhöhte Suszeptibilität des GPx2 KO für DTT-induzierten ER-Stress entstanden.

Im Kryptengrund des Colons wurde im GPx2 KO -Se und +Se eine erhöhte eIF2 α -Phosphorylierung im Vergleich zum WT festgestellt (Abb. 3–15). Die Gadd34 mRNA-Expression war im GPx2 KO nur in der +Se-Gruppe erhöht (Abb. 3–13C). Gleichzeitig wurden weder die Gadd153 mRNA (Abb. 3–13A), noch die Xbp1- und Xbp1_s mRNA- oder Grp78-Proteinexpression durch den Genotyp beeinflusst (Daten nicht gezeigt). *In vitro* wurde gezeigt, dass oxidativer Stress in Form von H₂O₂- oder Arsenitbehandlung zu einer eIF2 α -Phosphorylierung ohne gleichzeitige Aktivierung von ER-Stress Markern oder PERK führen kann [196, 285]. Somit könnte, zumindest im GPx2 KO

-Se, auch oxidativer Stress über eine der anderen Kinasen zur Aktivierung der ISR geführt haben. *In vitro* wurde beobachtet, dass Peroxynitrit Gadd34, 45 und 153 induziert, was durch Modulation des zellulären Redoxstatus über SOD, Catalase und GSH vermindert werden konnte [286]. Desweiteren wurde eine erhöhte mRNA-Expression von Atf5 im Kryptengrund des GPx2 KO bei -Se festgestellt (Tab. 3-1). Auch diese fügt sich in das Bild einer UPR- oder ISR-Aktivierung im GPx2 KO. Eine Atf5-Induktion, auch auf mRNA-Ebene, ist bereits durch eIF2 α -Phosphorylierung [287] und durch die eIF2 α -Kinasen GNC2 [288] und PERK [289] gezeigt worden.

In beiden Darmabschnitten liegen also Hinweise auf eine Aktivierung der UPR oder ISR auf unterschiedlicher Ebene vor, welche im Colon vermutlich in engem Zusammenhang mit den beobachteten inflammatorischen Parametern und Apoptosen stehen bzw. an deren Entstehung beteiligt gewesen sein könnten. Sowohl antiinflammatorische, als auch antioxidative Funktionen der GPx2, bzw. deren Fehlen, könnten der Auslöser hierfür gewesen sein. Die unterschiedliche Ausprägung in Dünndarm und Colon könnte auf eine unterschiedliche Ausstattung mit Stress- und Apoptoseregulatoren zurückzuführen sein (siehe Kap. 1.2.1). Einen Anteil hieran könnte auch eine unterschiedliche Aktivierung von Gegenregulationsmechanismen haben. So kann Gadd34 als Bestandteil des Proteinphosphatase 1 Komplexes eine Dephosphorylierung von eIF2 α herbeiführen, und so die ISR abschalten [290].

Es wurde gezeigt, dass GPx2 mit ER-Markern colokalisiert [74]. Demensprechend wäre es denkbar, dass sie eine spezifische Rolle in der Hydroperoxidreduktion am ER spielt, welches eine mögliche Quelle für ROS darstellt (siehe Abb. 4–1). Während der oxidativen Faltung von Proteinen im ER wird die Bildung von Disulfidbrücken durch Proteindisulfidisomerasen katalysiert, welche wiederum für diese Reaktion durch ERO1 (engl.: *ER oxidoreductin 1*) oxidiert werden. Bei der Übertragung von Elektronen von ERO1 auf O₂ entsteht H₂O₂ [291, 292]. Es wird vermutet, dass dieses ins Cytosol diffundieren kann, weshalb ERO1 im ER als eine weitere Quelle für ROS bzw. zellulären oxidativen Stress diskutiert wird [293, 294]. Möglicherweise dient die Expression der GPx2 am ER dazu, H₂O₂ abzufangen. Verschiedene Sauerstoffradikale können zudem die Lipidperoxidation in Gang setzen [295], deren Endprodukte ebenfalls die UPR aktivieren können [296]. In einer Colonkarzinomzelllinie induzierte 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE), ein Produkt der Lipidperoxidation, diverse ER-Stress assoziierte Gene, darunter Gadd34 [297].

4.3.4 Seleneffekte im WT

In Kryptengrundepithelzellen von Colon und Duodenum, sowie auch in Villusepithelzellen des Duodenums, lag im WT bei -Se eine höhere Tnf α mRNA-Expression vor, als bei +Se (Abb. 3–10). Es gab jedoch keine Hinweise auf Seleneffekte auf den Tnf α -

Proteingehalt oder auf F4/80-positive Zellen (siehe Abb. 3–11, Abb. 3–28, Abb. 3–12). Da TNF α ein NF κ B-Zielgen ist [242], könnte dies auf eine verstärkte Aktivität des redox-sensitiven NF κ B-Signalwegs im Selenmangel hindeuten. TNF α stimuliert die Generierung von ROS [298]. Selen [299, 300] sowie eine Überexpression der GPx1 [301] konnten *in vitro* den TNF α -induzierten Anstieg der ROS-Gehalte und eine anschließende NF κ B-Aktivierung verhindern. Die Hemmung des NF κ B-Signalwegs durch GPx1-Überexpression ging mit einer Abbauhemmung des NF κ B Inhibitors α (I κ B α) einher [301, 302]. Es ist unklar, ob GPx2 ähnliche Funktionen wahrnehmen kann und ob dies zur erhöhten Tnf α -Expression im GPx2 KO beitrug. Es muss auch die kompensatorisch erhöhte GPx1-Expression beachtet werden, welche einen gegenteiligen Effekt haben würde. Eine Untersuchung von Komponenten des NF κ B-Signalwegs in Epithelzellhomogenaten ergab keine Hinweise auf eine Beeinflussung durch Selen oder den GPx2 KO.

Des Weiteren wurde in Kryptengrundepithelzellen des Colons eine erhöhte Gadd153 und Gadd34 mRNA-Expression im WT bei -Se im Vergleich zu +Se festgestellt (Abb. 3–13), welche jedoch nicht mit einer erhöhten eIF2 α -Phosphorylierung einherging (Abb. 3–15, siehe auch Abb. 4–3). Eine erhöhte Gadd34 mRNA-Expression im Darm bei Selenmangel wurde auch von Rao [210] beschrieben. In dieser Publikation wird eine mögliche DNA-Schädigung durch oxidativen Stress als Grund für die Gadd34-Induktion diskutiert. Hierfür konnten in der vorliegenden Arbeit im WT jedoch keine Hinweise gefunden werden (vgl. Abb. 3–6, Abb. 3–7). Trotzdem ist eine Modulation des Redox-Status durch Selen bzw. Selenoproteine (vgl. Abb. 4–1) nicht ausgeschlossen, da mittels DHR-Assay nur einige wenige RS mit unterschiedlicher Sensitivität detektiert werden können (vgl. Kap. 4.3.1). Einer Induktion von Gadd34 und Gadd153 nach Peroxynitrit-Behandlung konnte durch Modulation des Redoxstatus durch antioxidative Enzyme wie Catalase und SOD sowie durch GSH entgegengewirkt werden [286]. Peroxynitrit entsteht *in vivo* durch Reaktion von NO \cdot mit O $_2^{\cdot-}$ und kann Proteine nitrieren und damit ihre Aktivität ändern (siehe Abb. 4–1) [303]. Es wurde beschrieben, dass GPx1 durch direkte Peroxynitrit-Reduktion und SelP und TrxR durch indirekte Mechanismen vor Schäden durch Peroxynitrit schützen und SeMet selbst verhindert Oxidationsreaktionen von Peroxynitrit [304].

4.4 AOM-induzierte Colonkanzerogenese

4.4.1 Erhöhte Expression von GPx2 und β -Catenin in MDF

Da in humanen colorektalen Adenomen [72] und Karzinomen [73, 305] im Vergleich zum umgebenden, nicht transformierten Gewebe eine erhöhte GPx2-Expression festgestellt wurde, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob eine Hochregulation der GPx2 auch in präneoplastischen Läsionen im Mausmodell zu beobachten ist.

In 67% der untersuchten MDF im WT +Se wurde eine stärkere GPx2-Färbung als im normalen Epithel festgestellt (Abb. 3–21 und Abb. 3–22). Eine verstärkte GPx2-Expression ist demnach ein relativ frühes Ereignis in der Colontumorerogenese. Es wäre denkbar, dass diese Hochregulation den prämaligen Zellen Wachstumsvorteile in der Promotionsphase bietet. In humanen colorektalen Adenomen wurde eine höhere GPx2-Expression beobachtet, als in Karzinomen [306]. Auch dies spricht für eine besondere Bedeutung der GPx2 in frühen Tumorigenesestadien. Ein weiteres Kriterium zur Beurteilung von Adenomen und Karzinomen ist der Differenzierungsgrad des Gewebes basierend auf histologischen Kriterien. Eine erhöhte GPx2-Expression wurde vor allem in Krypten mit einer geringen Dysplasie im Randbereich von humanen Colontumoren [62] und in gut und mäßig differenzierten Colontumoren (G1, G2) festgestellt, während sie in schlecht differenzierten Tumoren wieder abnahm und in undifferenzierten Tumoren kaum noch vorhanden war [74]. In einer weiteren Studie wurde eine signifikante Korrelation zwischen hoher GPx2-Expression und einem hohen Differenzierungsgrad colorektaler Karzinome festgestellt [305].

Bei der histologischen Analyse von Darmrollen wurde ein stark dysplastisches Mikroadenom (Abb. 3–22C) gefunden, in dessen Kernbereich GPx2 vollständig fehlte. In einzelnen, etwas weniger dysplastischen Krypten am Rand dieser Struktur, in denen z. T. noch Reste von Becherzellen zu erkennen waren, wurde GPx2 hingegen im Vergleich zum normalen Gewebe verstärkt exprimiert. Dieses Regulationsmuster stimmt mit der bei Florian et al. [62] beschriebenen Regulation der GPx2 in humanen Tumoren überein. Auch in einer anderen Studie, in welcher eine variable GPx2-Expression in Colontumoren festgestellt wurde, fiel ein Tumor durch das vollständige Fehlen von GPx2 auf mRNA- und Proteinebene auf [307]. Es handelte sich auch hier um einen Einzelfall, so dass keine generalisierten Schlüsse gezogen werden können. Unter bestimmten Bedingungen scheint aber auch eine Abschaltung der GPx2-Expression in Tumoren möglich zu sein. Da dieser Effekt bei Al-Taie [307] auch auf mRNA-Ebene beobachtet wurde, kommen hierfür transkriptionale oder epigenetische Regulationsmechanismen in Betracht. Ein LOH ist weniger wahrscheinlich, da Chromosom 14q, auf welchem das *GPx2*-Gen liegt, selten von diesem Phänomen betroffen ist [118].

Mutationen im *APC*-Gen und eine dadurch verursachte, aberrante β -Catenin-Expression sind frühe Ereignisse in der colorektalen Kanzerogenese [118] (vgl. Abb. 1–2). Eine erhöhte β -Catenin-Expression wurde in 85% aller histologisch identifizierten MDF gefunden (Kap. 3.4.6). Ein ähnlich großer Anteil β -Catenin-akkumulierender Krypten an den Gesamt-MDF wurde auch in einer anderen Studie festgestellt [206]. GPx2 ist ein Zielgen von β -Catenin [63, 64]. Eine gleichzeitige Hochregulation von GPx2 und β -Catenin zeigte sich in 61% aller MDF. Allerdings fand dies häufig in unterschiedlichen Teilen der Krypte statt. In MDF mit geringer Dysplasie war eine verstärkte β -Catenin-Expression häufig im luminalen Teil der Krypte und vor allem membranstän-

dig zu beobachten, während die GPx2-Farbtintensität vom Kryptengrund her zunahm (Abb. 3–22B). Es kann nicht beurteilt werden, ob es sich bei diesen Läsionen um besonders frühe dysplastische Stadien handelte, oder ob sie ein anderes Mutationspektrum aufwiesen, und dadurch nicht das Potential hatten, sich zu fortgeschrittenen präneoplastischen Läsionen zu entwickeln. Neben der fehlenden Kolo-kalisation spricht hier auch die fehlende, möglicherweise aber auch nicht detektierbare, Kernständigkeit von β -Catenin gegen eine Beteiligung an der Induktion der GPx2. In MDF mit fortgeschrittener Dysplasie (Abb. 3–22B) betraf die erhöhte β -Catenin-Expression in der Regel die gesamte Zelle und ging mit einer gesteigerten GPx2-Expression einher. Die Kryptenbereiche mit der stärksten GPx2-Expression stimmten jedoch nicht immer mit den Kryptenbereichen mit der stärksten β -Catenin-Expression überein.

In den untersuchten präneoplastischen Läsionen der Maus ergaben sich also keine deutlichen Hinweise für eine Induktion der GPx2-Expression während der Tumorigenese durch β -Catenin. Die erhöhte GPx2-Expression in MDF steht im Einklang mit der zum Thema vorliegenden Literatur und legt eine Hochregulation der GPx2 besonders in frühen Stadien der Colonkanzerogenese nahe.

4.4.2 Förderung der AOM-induzierten Tumorigenese durch GPx2, aber größere Tumore im GPx2 KO +Se

ACF und MDF gelten als Biomarker für die Colonkanzerogenese in der Maus [177, 178] und im Menschen [308, 309] (vgl. Kap. 3.4.3). Selenarme GPx2 KO-Mäuse hatten tendenziell mehr ACF mit geringer Kryptenmultiplizität und somit geringer Entartungswahrscheinlichkeit, aber signifikant weniger ACF mit einer Kryptenmultiplizität ≥ 4 , und somit einem hohen Entartungspotential, als der WT (Abb. 3–18D, E). Im +Se-Zustand hatten GPx2 KO-Tiere signifikant weniger MDF als der WT (Abb. 3–18F) und im ++Se-Zustand traten im GPx2 KO signifikant weniger Tumore auf (Abb. 3–18G). Ansonsten waren keine signifikanten Effekte zu beobachten, was vermutlich auf die insgesamt geringe Tumorzinzidenz zurückzuführen ist, die typisch ist für den C57Bl/6-Mausstamm im AOM-Modell [123, 310]. Bei einer Analyse der Tumoran-zahl pro Gruppe mittels Kreuztabellen zeigte sich im Vergleich zu den entsprechenden WT-Gruppen jedoch eine signifikant niedrigere Tumoran-zahl im GPx2 KO -Se und ++Se (Tab. 3-2). Es lässt sich also feststellen, dass GPx2 die Tumorigenese im AOM-Modell fördert. Allerdings entwickelten sich im GPx2 KO +Se größere Tumore als im WT (Abb. 3–19). Im diesem Kapitel sollen diese Phänomene in Bezug auf die antiapoptotische, antioxidative und antiinflammatorische Funktion der GPx2 diskutiert werden.

Apoptose

AOM bewirkt DNA-Methylierungen und daraus resultierende Guanin-Adenin-Transitionen [310, 311]. Eine effiziente Elimination geschädigter Stammzellen durch Apoptose

ist essenziell für den Schutz vor der Tumorinitiation [312]. Neben der basal erhöhten Apoptoserate im Kryptengrund im GPx2 KO bei -Se und +Se wurde in diesen Gruppen eine höhere Anzahl AOM-induzierter Apoptosen in der Kryptenmitte festgestellt (Abb. 3–24). Im zweiten Kryptenviertel traten nur im GPx2 KO AOM-induzierte Apoptosen auf. Dies könnte jedoch auch durch die Ausweitung der proliferativen Zone begründet sein. Denn AOM initiiert Apoptosen nur in teilungsaktiven Zellen [207] und durch die Verlängerung der proliferativen Zone bei GPx2 KO-Mäusen (Abb. 3–27) kommen diese, im Gegensatz zum WT, auch im zweiten Kryptenviertel vor. Andererseits migrieren vermutlich auch AOM-geschädigte Zellen, solange keine Mutation im *APC*-Gen induziert wurde, zur Kryptenspitze (siehe Kap. 1.2.3, 1.2.1), so dass die apoptotischen Zellen im zweiten Kryptenviertel zum Zeitpunkt der AOM-Schädigung möglicherweise noch in der unteren Kryptenhälfte lokalisiert waren. In der Bilanz könnte die höhere Mitoserate nach AOM-Gabe im GPx2 KO (Abb. 3–26) in Kombination mit einer höheren Apoptoserate auch als ein insgesamt erhöhter Zellumsatz interpretiert werden, welcher möglicherweise zu einer besseren Elimination initiiert Zellen beitragen könnte.

Eine verminderte Apoptoserate ist ein zentrales Merkmal in der Colonkanzerogenese [313]. Bei Untersuchungen chemisch induzierter Colonkanzerogenese in Mausmodellen mit einem *knockout* antiapoptotischer Gene korrelierte eine höhere Apoptoserate mit einer verminderten Tumorigenese [314-316]. Eine erhöhte Rate AOM-induzierter Apoptosen im GPx2 KO in der Initiationsphase könnte demnach dazu beitragen, dass weniger dysplastische Krypten entstehen, welche das Potential haben, sich zu Adenomen weiterzuentwickeln. Es wäre jedoch auch denkbar, dass erst die Zunahme der GPx2-Expression in präneoplastischen Läsionen (siehe Kap. 4.4.1) durch die Hemmung von Apoptosen einen entscheidenden Wachstumsvorteil für entartete Zellen in der Promotionsphase bewirkt. Auch eine spezifisch erhöhte Expression von GPx2 in Tumorstammzellen, im Vergleich zu ihren differenzierten Nachkommen [317], legt eine besondere Rolle der GPx2 in proliferierenden Tumorzellen nahe.

ROS

In Tumoren sowie in Tumorzelllinien (Überblick bei [318]) und in colorektalen Karzinomen [319] wurde eine erhöhte ROS-Produktion festgestellt. ROS induzierte DNA-Schäden können die Tumorigenese initiieren und durch die Induktion genomischer Instabilität auch die Aquisition weiterer Mutationen und somit die Tumorprogression vorantreiben. Des Weiteren fördern sie durch die Beeinflussung redoxsensitiver Signalkaskaden auch die Proliferation und somit die Tumorpromotion [318, 320]. Neben protumorigenen Signalwegen wie dem Ras-Signalweg sind ROS jedoch auch im antitumorigenen p38-Signalweg und assoziierten proapoptotischen Mechanismen involviert, so dass ihnen inzwischen eine duale Funktion in der Kanzerogenese

zugeschrieben wird [321]. Nach einem Schwellenwertkonzept [322-324] wirkt eine leichte Steigerung des ROS-Gehalts zunächst proliferationsfördernd (siehe auch Abb. 4–2). Wenn aber ein bestimmter Wert überschritten wird und der ROS-Gehalt die antioxidative Kapazität der Zelle übersteigt, kommt es zum Zelltod durch Apoptose bzw. bei höheren Konzentrationen durch Nekrose. Grundsätzlich greift dieser Mechanismus bei normalen, mitotisch kompetenten Zellen und bei Krebszellen. Die gleichzeitige Hochregulation antioxidativer Systeme ermöglicht es Krebszellen, hohe proliferationsfördernde ROS-Gehalte beizubehalten, ohne die cytotoxische Schwelle zu überschreiten [322-324]. Als entscheidende ROS-abbauende Systeme in der Zelle, welche diese Adaptation der Tumorzellen ermöglichen, werden das GSH/ GPx und das Trx/ TrxR System genannt [324]. Somit bietet die Schwellenwert-Theorie einen Erklärungsansatz für mögliche protumorigene Effekte von Selen bzw. antioxidativ wirkenden Selenoproteinen. Insbesondere für TrxR1 wurden nicht nur anti- [325] sondern auch prokanzerogene [326, 327] Effekte beschrieben. Sep15 hatte prokanzerogene Effekte *in vitro* und im *Xenograft*-Modell [173, 174] sowie in der AOM-induzierten Colonkanzerogenese [175], wo Sep15 KO-Mäuse weniger ACF entwickelten (diskutiert bei [159]). Auch für GPx1 wurden nicht nur anti- [328], sondern auch prokanzerogene [329] Effekte beobachtet. Es wäre denkbar, dass vor allem im ++Se-Zustand GPx2 zusammen mit anderen Selenoproteinen einen Wachstums- und Überlebensvorteil für Tumorzellen darstellt.

Die Ergebnisse des Comet-Assays (Abb. 3–7) legen eine basale DNA-Schädigung in -Se GPx2 KO-Tieren nahe. Aus inflammatorischen Reaktionen resultierende RS können durch oxidative Schäden zu DNA-Mutationen führen und so zur Tumorumitiation beitragen [330]. Ein derartiger Effekt wurde jedoch nicht beobachtet. Bei der, aus der sechsmaligen AOM-Behandlung resultierenden, Mutationslast sind derartige Effekte vermutlich zu vernachlässigen. Zudem traten in unbehandelten GPx2 KO-Tieren keine Tumore oder präneoplastischen Läsionen auf.

eIF2 α

In unbehandelten Tieren wurde in Kryptengrundepithelzellen des Colons eine erhöhte eIF2 α -Phosphorylierung im GPx2 KO bei -Se und +Se im Vergleich zum WT gefunden. Phospho-eIF2 α kann das Tumorstadium fördern. Dies wurde in einem *Xenograft*-Modell demonstriert, wo PERK-defiziente Zellen sowie Zellen, in welchen durch eine Ser51-Mutation von eIF2 α die eIF2 α -Phosphorylierung verhindert wurde, kleinere Tumore in Nackmäusen bildeten [331]. Auch in der vorliegenden Arbeit korrelierten im Vergleich zum WT erhöhte phospho-eIF2 α -Gehalte im Gpx2 KO +Se mit größeren Tumoren im (Abb. 3–15, Abb. 3–19). Andererseits wurden der eIF2 α -Phosphorylierung eine Reihe antikanzergener Effekte zugeschrieben. So wurde die Induktion von Proliferationsarrest und Apoptose in HT29-Darmkrebszellen durch Indomethacin über eine

PKR-abhängige Phosphorylierung von eIF2 α vermittelt [332]. Für die Induktion von Apoptose und die Wachstumshemmung in Weichagar durch den Tumorsuppressor PTEN (engl.: *phosphatase and tensin homolog*) war eine PKR-abhängige Phosphorylierung von eIF2 α notwendig [333]. Auf Grund der antiproliferativen und proapoptischen Effekte wurde die Induktion der eIF2 α -Phosphorylierung auch für die Tumorthherapie vorgeschlagen [334]. Es wäre also auch denkbar, dass eine mögliche permanente eIF2 α -Phosphorylierung im GPx2 KO der Entstehung von Tumoren bzw. präneoplastischen Läsionen im GPx2 KO bei -Se und +Se entgegenwirkte.

Entzündung

Chronische Entzündung und intestinale Kanzerogenese sind eng verknüpft. Cytokine und ROS bzw. RNS erzeugen genomische Instabilität, wodurch Tumorumitiation und -progression gefördert werden können, beeinflussen über epigenetische Mechanismen die Genexpression und ändern die Aktivität von entscheidenden Signalwegen. Durch antiapoptische Mechanismen, gesteigerte Proliferation, sowie Förderung von Invasivität, Metastasivität und Angiogenese können Tumorpromotion und -progression gefördert werden [99, 335]. Gleichzeitig kann eine tumorassoziierte Entzündung auch antikanzerogene Effekte haben, indem sie zur Antitumor-Immunität beiträgt [330]. Während in der Colitis-assoziierten Colonkanzerogenese die protumorigenen Eigenschaften des Immunsystems überwiegen, steht in der spontanen colorektalen Kanzerogenese die Elimination von Tumorzellen durch die Antitumor-Immunüberwachung des Immunsystems den protumorigenen Eigenschaften des Immunsystems gegenüber. In frühen Tumorigenese-Phasen kann die Immunüberwachung zu einer Detektion und Elimination initiiertter Zellen oder früher präneoplastischer Läsionen und in späten Phasen zur Elimination metastasierender Zellen führen. In anderen Stadien können jedoch proliferationsstimulierende Effekte sowie eine Suppression der Antitumorimmunüberwachung überwiegen [336].

Im AOM/DSS-Modell der entzündungsassoziierten Colonkanzerogenese hatten GPx2 KO-Tiere in Abhängigkeit vom Selenstatus eine stärkere Entzündung und damit einhergehend tendenziell mehr Tumore [82]. Da die Kanzerogenese im AOM/DSS-Modell maßgeblich von der Entzündung abhängt [337], geht die antikanzerogene Rolle der GPx2 in diesem Modell vermutlich auf ihre antiinflammatorischen Eigenschaften zurück. Die Kontrolle der COX2-Expression als möglicher antiinflammatorischer Mechanismus der GPx2 wurde bereits in Kap. 4.3.2 diskutiert. Eine erhöhte, COX2-abhängige, PGE₂-Produktion und deren prokanzerogene Eigenschaften in der Tumorpromotion wurden sowohl in der humanen Colonkanzerogenese als auch im Nagermodell beobachtet (diskutiert bei [310, 338, 339]). Auch die höhere Invasivität und Migrationsfähigkeit von GPx2 KD-Zellen resultierte aus dem Wegfallen der COX2-Hemmung durch GPx2 [83]. In der vorliegenden Arbeit lag die Cox2-Expression in

Kryptenepithelzellen auf mRNA-Ebene unter der Detektionsgrenze und im Plasma wurde keine Beeinflussung des Gehalts an PGE₂-Metaboliten durch den Genotyp festgestellt. Acht Stunden nach AOM-Gabe kam es jedoch, wie schon bei Riehl et al. [209] beschrieben, im WT bei -Se und +Se zu einem PGE₂-Anstieg im Vergleich zu den Saline-behandelten Gruppen (Abb. 3–28B). Die ++Se-Diät konnte diesen Anstieg im WT verhindern. Hier zeigt sich eine antiinflammatorische Rolle der Selensupplementation, die auch schon in der DSS-induzierten Colitis beobachtet worden ist [82].

In dieser Arbeit wurde die AOM-induzierte, nicht entzündungsgetriebene Colonkarzinogenese untersucht, deren Pathogenesemechanismen sich von denen der Colitis-assoziierten Carzinogenese unterscheiden [336]. Auch hier werden jedoch Tumorzinzidenz und -größe von inflammatorischen Prozessen beeinflusst. Während die Tumorgöße im WT ein Minimum bei +Se hatte, und sowohl zu -Se als auch zu ++Se zunahm, hatten GPx2 KO-Tiere in -Se und +Se gleich große Tumore, in der ++Se-Gruppe waren die Tumore jedoch kleiner (Abb. 3–19). Aus dieser unterschiedlichen Reaktion auf den Selenstatus ergaben sich in der +Se-Gruppe signifikant größere Tumore im GPx2 KO im Vergleich zum WT. Die basal erhöhte Tnf α -Expression und Makrophagendichte im GPx2 KO bei -Se und +Se (Abb. 3–10, Abb. 3–11, Abb. 3–12) weisen darauf hin, dass die in Kap. 4.3.2 diskutierte, niedriggradige Entzündung vor allem in diesen Diätgruppen vorliegt und somit parallel zur hier beschriebenen Tumorgöße verläuft. In der Promotionsphase tragen vor allem von Immunzellen sezernierte Cytokine zu Wachstum und Invasivität prämaligener Zellen bei, wobei von diesen ausgeschüttete Cytokine den Effekt durch ein positives Feedback auf die Immunzellen verstärken [330]. TNF α ist eines der wichtigsten an der Tumorpromotion beteiligten Cytokine (Überblick bei [330, 340]). Es wurde gezeigt, dass durch Makrophagen und Colontumorzellen sezernierter TNF α das Tumorstadium fördert [341] und den Wnt-Signalweg aktiviert [342]. Auch Adipositas geht mit chronischer niedriggradiger Entzündung sowie erhöhter TNF α -Produktion einher [343] und in adipösen Mäusen wurde das Tumorstadium durch Tnf α gefördert [344]. Es erscheint somit naheliegend, dass die niedriggradige Entzündung auch im GPx2 KO -Se und +Se das Tumorstadium förderte. Im +Se-Zustand korrelierten im Vergleich zum WT erhöhte Plasma-Tnf α -Gehalte im GPx2 KO (Abb. 3–28), welche auf systemische Auswirkungen der niedriggradigen Entzündung im Darm hinweisen, mit größeren Tumoren (Abb. 3–19). Bei Fütterung der ++Se-Diät konnte möglicherweise ein anderes Selenoprotein den GPx2-Verlust kompensieren und die niedriggradige Entzündung aufheben, woraus die signifikante Reduktion der Tumorgöße in der GPx2 KO-Gruppe ++Se (Abb. 3–19) resultieren könnte.

Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit waren die Tumore im AOM/DSS-Modell im GPx2 KO in der -Se und tendenziell auch in der ++Se-Gruppe kleiner als im WT [82]. In der Colitis-assoziierten Colontumorigenese wird die Tumorentwicklung durch die

Ausschüttung von Cytokinen durch Immunzellen maßgeblich vorangetrieben, während in der spontanen colorektalen Carzinogenese eine Balance zwischen pro- und antitumorigenen Eigenschaften des Immunsystems besteht, welche durch die vorhandenen Immunzelltypen und die von ihnen sezernierten Cytokine beeinflusst wird [336]. Möglicherweise fallen deshalb veränderte Konzentrationen einzelner Entzündungsmediatoren im AOM/DSS-Modell nicht so stark ins Gewicht. Ein Beispiel dafür sind Mäuse mit einem Cox2 KO, welche im AOM/DSS-Modell keine Unterschiede zum WT aufwiesen, jedoch resistent gegen eine AOM-induzierte Colonkanzerogenese waren [345]. HT29-Zellen mit einem siRNA-vermittelten *knockdown* der GPx2 bildeten in Nacktmäusen ebenfalls kleinere Tumore als die Kontrollzellen [83]. Auch dieses Modell ist nicht mit der AOM-induzierten Colonkanzerogenese zu vergleichen, da Nacktmäuse immundefizient sind und zudem nicht die Tumormikroumgebung im GPx2-defizienten Darm repräsentieren.

Ein wichtiger antikanzerogener Mechanismus ist die Elimination von Tumorzellen durch cytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen des Immunsystems. Die Induktion von Apoptose verläuft über zwei Mechanismen, die Exocytose von Perforin und Granzymen sowie die Exposition des CD95-Liganden (CD95L), welcher über den CD95-Rezeptor (CD95) den extrinsischen Apoptosesignalweg auslösen kann. Diese Tumorummunüberwachung kann von Tumorzellen umgangen werden, wenn sie Resistenzen gegen diese Mechanismen entwickeln [346].

In vitro liegen Hinweise auf eine Beteiligung von ROS an der CD95-induzierten Apoptose [347] und an einer Induktion von CD95 und CD95L [348, 349] vor. Eine Überexpression von GPx1 in Brustkrebszellen konnte den ROS-Anstieg nach CD95-Aktivierung und damit auch ROS-induzierte Apoptosen verhindern, und GPx1-überexprimierende Mäuse zeigten eine geringere Mortalität nach CD95-Behandlung [350]. Dies legt nahe, dass Hydroperoxid-reduzierende Enzyme die Antitumorimmunreaktion über den CD95-Rezeptor abschwächen können. In einem Mausmodell für chemisch-induzierten Hautkrebs wurde die Tumorzinzidenz und -anzahl durch GPx1- oder gleichzeitige GPx1- und SOD-Überexpression erhöht [329]. Als möglicher Grund für diesen unerwarteten prokanzerogenen Effekt der antioxidativen Enzyme wurde auch hier eine Umgehung der Antitumorimmunüberwachung diskutiert. Da für GPx2 ähnliche Effekte erwartet werden können, wäre es denkbar, dass eine hohe GPx1- und GPx2-Expression im WT bei +Se und vor allem ++Se einen besonderen Vorteil für prä-maligne Zellen bietet, da sie vor einer Elimination durch das Immunsystem schützt.

Im -Se-Zustand bildete sich im AOM-behandelten GPx2 KO eine aktive intestinale Entzündung aus, welche offensichtlich nicht aufgelöst werden konnte (Kap. 4.3.2). Möglicherweise verhinderte die massive Immunzellinfiltration die Entstehung prä-neoplastischer Läsionen. In Patienten mit colorektalen Karzinomen korrelierte eine hoch-

gradige Entzündung im Tumor mit einem längeren Überleben der Patienten [351]. Als weiterer unabhängiger prognostischer Marker war auch eine erhöhte Makrophagen-Infiltration mit einer besseren Überlebensrate assoziiert. Diese Korrelationen wurden auf eine Förderung der Tumorregression durch die Antitumorimmunität zurückgeführt [351]. Tumorassoziierten Makrophagen, die sonst prokanzerogen wirken, werden in der spontanen Colonkanzerogenese antikanzerogene Eigenschaften zugeschrieben [352].

Fazit zur Rolle der GPx2

Schlussfolgernd lässt sich feststellen, dass GPx2 die Tumorigenese im -Se und ++Se-Zustand vermutlich über unterschiedliche Mechanismen fördert. In diesen Diätgruppen hatten GPx2 KO-Mäuse weniger Tumore als WT-Tiere. Dies steht im Gegensatz zu einer protektiven Wirkung der GPx2 im AOM/DSS-Modell, welche hier durch ihre anti-inflammatorischen Eigenschaften bedingt wurde [82]. Im -Se-Zustand könnten eine erhöhte Apoptoserate, antitumorogene Effekte von phospho-eIF2 α und eine Elimination neoplastischer Zellen durch das Immunsystem Gründe für die verminderte Anzahl von Tumoren und großen ACF im GPx2 KO sein. In abgeschwächter Form scheinen die ersten beiden Faktoren auch im +Se GPx2 KO vorzuliegen. Hier tritt ein Unterschied zum WT auf Ebene der MDF zu Tage, was nahelegt, dass ein adäquater Selenstatus im WT die Tumorigenese verzögert (siehe Kap. 4.4.3). In der ++Se-Gruppe lagen basal keine Genotypunterschiede bezüglich Tnf α -Expression, Makrophagen, eIF2 α -Phosphorylierung (diskutiert in Kap. 4.3) oder AOM-induzierten Apoptosen vor, und die Steigerung der basalen Apoptoserate war sehr gering (Abb. 3–24). Trotzdem war die Reduktion der Tumoranzahl im GPx2 KO mit dieser Diät am deutlichsten (Abb. 3–18G, Tab. 3-2). Möglicherweise förderte GPx2 in dieser Gruppe das Tumorstadium im Zusammenspiel mit anderen, prokanzerogenen Eigenschaften aufweisenden Selenoproteinen, wie Sep15 und TrxR. Eine besondere Rolle könnte hierbei die Modulation des Redox-Status in Krebszellen spielen.

Die hier diskutierten prokanzerogenen Effekte der GPx2 kommen vermutlich in der Initiations- und / oder Promotionsphase der Tumorigenese zum Tragen. Da die sporadische Colonkanzerogenese im Menschen auch durch oxidative DNA-Schädigungen initiiert werden kann, könnte GPx2 hier jedoch auch protektiv wirken. Für eine Untersuchung von Invasivität und Metastasierung eignet sich das AOM-Modell nicht [310]. Basierend auf der höheren Invasivität und Migrationsfähigkeit von GPx2 KD-Zellen [83] wären hier auch prokanzerogene Effekte denkbar. Letztlich scheinen die Effekte der GPx2 in der Colonkanzerogenese abhängig vom Kanzerogenesemechanismus, insbesondere von der Beteiligung einer Entzündung, sowie vom Kanzerogenesestadium zu sein.

4.4.3 Einfluss des Selenstatus im WT

In dieser Arbeit wurden die Effekte von SeMet, einer der häufigsten Selenverbindungen in der Nahrung, in einem ernährungsrelevanten Dosisbereich analysiert, um Auswirkungen einer Variation der Selenzufuhr durch die Ernährung zu untersuchen. In diesem Dosisbereich wurde keine signifikante Reduktion der Anzahl von Tumoren, ACF oder MDF durch Selensupplementation beobachtet.

Eine chemopräventive Wirkung von Selen auf die durch die AOM-Vorstufe Dimethylhydrazin (DMH)-induzierte Colonkanzerogenese in der Ratte zeigte sich vor allem bei sehr hohen Konzentrationen (4 ppm) anorganischer Selenverbindungen wie Selenit oder Selenat [128, 130], welche aus toxikologischer Sicht nicht auf den Menschen übertragbar sind, nicht jedoch bei Fütterung einer selenadäquaten Diät mit 0,1 ppm Selen in Form von Selenit [353]. In der AOM-induzierten Colonkanzerogenese wiesen Mäuse, welche auf Grund einer Mutation im *Trsp*-Gen keine stressassoziierten Selenoproteine exprimierten (siehe Kap. 1.1.2, 1.2.3), eine geringere Anzahl von ACF als WT-Tiere auf, was darauf hinweist, dass Selenoproteine die antikanzerogenen Effekte von Selen vermitteln [140]. Sowohl im WT wie auch in den transgenen Tieren wurde die ACF-Anzahl durch Fütterung einer Diät mit 1,6 ppm Selen in Form von Selenit im Vergleich zu einer Diät mit 0,2 ppm Selen vermindert. Dies wurde als möglicher Effekt niedermolekularer Selenverbindungen interpretiert (vgl. Kap. 1.3) [140]. Bei einem Vergleich der chemischen Formen zeigte sich, dass 2 ppm Selen als Selenit oder Selenat, nicht jedoch in Form von SeMet, die Anzahl durch aromatische Amine induzierter ACF verminderten [131]. Auch in der AOM-induzierten Colonkanzerogenese in Ratten wurde keine chemopräventive Wirkung einer SeMet-reichen Diät im Vergleich zu einer Kontrolldiät mit nicht spezifiziertem Selengehalt festgestellt [354]. Chemopräventive Effekte hoher Selendosen werden auf die protektive Wirkung niedermolekularer, methylierter Selenverbindungen und nicht auf Selenoproteine zurückgeführt (siehe Kap. 1.3), und SeMet wird in dieser Hinsicht als wenig effektiv betrachtet, da es unspezifisch anstelle von Methionin in Proteine eingebaut werden kann [141, 355]. Die Verwendung von Selen in Form von SeMet und der Selengehalt der ++Se-Diät von nur 0,6 ppm erklären somit, weshalb in der vorliegenden Studie keine chemopräventiven Effekte der ++Se-Diät feststellbar waren. Demgegenüber wurde AOM/DSS-Modell eine protektive, da antiinflammatorische Wirkung der ++Se-Diät beobachtet [82]. Für antiinflammatorische Effekte durch Selensupplementation ist demnach eine geringere Dosis erforderlich als für nicht-entzündungsassoziierte, antikanzerogene Effekte.

Anstelle einer dosisabhängig zunehmenden protektiven Wirkung mit dem Selengehalt der Diät wurde in der vorliegenden Studie eher eine eher adverse Wirkung der ++Se-Diät im WT beobachtet. Dieser Effekt war bezogen auf die Tumoranzahl pro Gruppe

nicht signifikant (Tab. 3-2). Im Vergleich zum GPx2 KO zeigte sich jedoch ein Genotyp-effekt in -Se und ++Se auf die Tumorzahl, während er im +Se-Zustand auf Ebene der Tumorstufen (MDF, Abb. 3–18F) lag. Dies könnte als Verzögerung der Tumorigenese durch die +Se-Diät gedeutet werden. Ein ähnlicher Einfluss des Selenstatus zeigt sich auch bei Betrachtung der Tumorgröße (Abb. 3–19) im WT. Im +Se-Zustand war die Tumorgröße hier am geringsten, während sie sowohl in der -Se, als auch in der ++Se WT-Gruppe im Vergleich zu +Se tendenziell erhöht war. Sowohl Selendefizienz, als auch ein supranutritionaler Selenstatus förderten hier demnach das Tumorwachstum. Während die antikanzerogene Wirkung eines adäquaten Selenstatus im Vergleich zu einer Selendefizienz auf Basis der in Kap. 1.3 diskutierten Literatur zu erwarten war und vermutlich aus einer suboptimalen Selenoproteinexpression resultiert, war der eher protumorigene Effekt der ++Se-Diät unerwartet. Die Festlegung der adäquaten Selendosis orientierte sich an der Optimierung der Leber-GPx-Aktivität [176]. Es ist jedoch möglich, dass andere Selenoproteine, möglicherweise auch organspezifisch, höhere Selendosen für eine optimale Expression benötigen. Auch diese Arbeit gibt Hinweise dafür, dass bestimmte Selenoproteine, wie z. B. SelW (siehe Kap. 4.1), besonders sensitiv auf den Selenstatus reagieren. Für einige Selenoproteine wurden neben antikanzerogenen auch prokanzerogene Effekte beobachtet (diskutiert in [146, 157-159, 356]). Somit könnte eine maximierte Expression prokanzerogen wirkender Selenoproteine (siehe Kap. 4.4.2) zu den oben beschriebenen Effekten der ++Se-Diät beitragen. Alternativ oder zusätzlich könnten auch selenbindende Proteine oder Effekte von SeCys und SeMet auf den Redoxstatus der Zelle eine Rolle spielen [357].

Auch in Humanstudien wurden bereits Hinweise auf einen U-förmigen Effekt von Selen auf die Mortalität und Tumorzinzidenz gefunden (diskutiert bei [7]). In *Follow-up*-Analysen der NPC-Studie wurde eine nicht-signifikant erhöhte Gesamtkrebsinzidenz in Probanden des oberen Selentertils [149] sowie ein signifikant erhöhtes Hautkrebsrisiko in Patienten der oberen beiden Tertile [150] ermittelt. Deshalb empfehlen einige Autoren nicht mehr Selen zu supplementieren, als für eine adäquate Selenversorgung benötigt wird [7, 146]. Möglicherweise können dieselben Mechanismen, die normale Zellen vor Schäden schützen, auch in Tumorzellen cytoprotektive Wirkungen entfalten und somit im gesunden Organismus antikanzerogen, beim Vorhandensein maligner oder prämaligener Läsionen aber prokanzerogen wirken [158, 358]. Diese Hypothese wird auch dadurch unterstützt, dass vereinzelte prokanzerogene Effekte einer Selensupplementation sich bevorzugt bei älteren Probanden zeigten, bei denen mit größerer Wahrscheinlichkeit schon präneoplastische Läsionen vorlagen, während vor allem jüngere Probanden von der Selensupplementation profitierten. In einer *Follow up*-Analyse der Linxian-Studie wurde festgestellt, dass vor allem junge Probanden von

der Einnahme von Selen, Vitamin E und β -Carotin profitierten, wohingegen die Einnahme bei Probanden über 55 Jahre das Ösophaguskrebsrisiko erhöhte [359].

4.5 Fazit

Die spezifische Expression der hoch in der Hierarchie der Selenoproteine stehenden GPx2 in proliferierenden Zellen gewährleistet diesen einen besonderen Schutz vor oxidativem Stress, auch im Selenmangel. Darüber hinaus scheint die GPx2 unabhängig von einem generellen Schutz vor oxidativem Stress weitere Funktionen zu haben, welche durch andere Selenoproteine nicht kompensiert werden können. GPx2 KO-Mäuse waren in dieser Arbeit durch eine erhöhte Apoptoserate im Kryptengrund, durch eine niedriggradige Entzündung und durch die Aktivierung des UPR- oder ISR-Signalwegs gekennzeichnet. Ursächlich hierfür könnte sowohl eine antiinflammatorische, als auch eine antiapoptotische Funktion der GPx2, oder eine spezifische, möglicherweise redoxregulatorische Rolle am ER sein. Die niedriggradige Entzündung in GPx2 KO-Tieren demonstriert die antiinflammatorische Funktion der GPx2. In der Abb. 4–4 sind diese Zusammenhänge dargestellt.

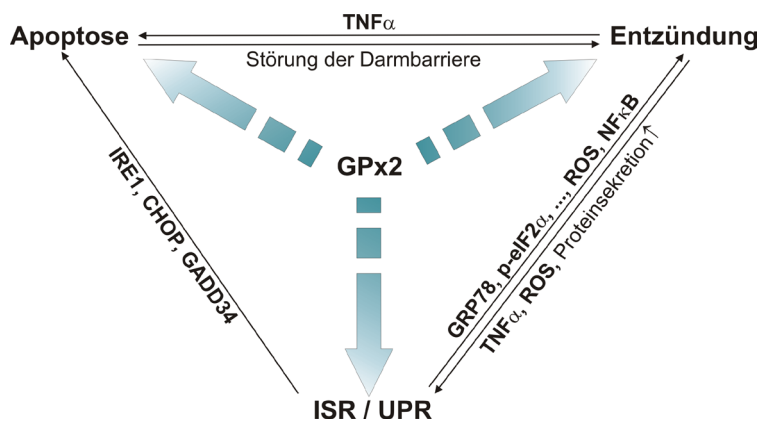


Abb. 4–4: Einfluss von GPx2 auf Apoptose, Entzündung und ISR / UPR

Bislang wurden sowohl pro- als auch antikanzerogene Effekte der GPx2 identifiziert. Bei dem in dieser Arbeit untersuchten AOM-Modell der murinen Colonkanzerogenese förderte der GPx2 KO das Tumorwachstum, was auf die proliferationsfördernde Wirkung der im GPx2 KO vorliegenden, niedriggradigen Entzündung zurückzuführen sein könnte. Gleichzeitig förderte GPx2 jedoch die Entstehung von präneoplastischen Läsionen und Tumoren. Möglicherweise wirkte GPx2 prokanzerogen, indem sie die effiziente Elimination geschädigter Zellen durch Apoptose in der Initiationsphase verhindert. Eine ähnliche Wirkung wäre auch in der Promotionsphase denkbar, in der es, wie in dieser Arbeit an MDF demonstriert, häufig zu einer Hochregulation der GPx2 kommt. Außerdem könnte die prokanzerogene Rolle der GPx2 aus einer Modulation von ISR / UPR-Signalwegen, oder infolge einer Hemmung der Elimination neoplastischer Zellen durch das Immunsystem resultieren. Vor allem bei guter Selenversorgung

könnte GPx2 zusammen mit anderen Selenoproteinen die Tumorentstehung fördern. Eine wichtige Rolle könnte hierbei die Modulation des Redox-Status in Tumorzellen spielen. Abb. 4–5 stellt mögliche Angriffspunkte der GPX2 in der Colonkanzerogenese zusammengefasst dar.

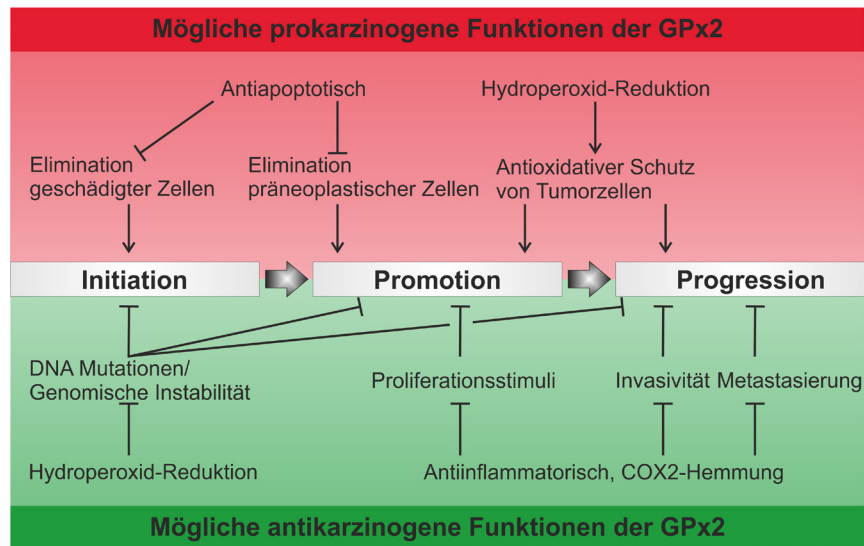


Abb. 4–5: Rolle von GPx2 in verschiedenen Phasen der Colonkanzerogenese
Abbildung modifiziert nach [157].

Eine eher prokanzerogene Wirkung der ++Se-Diät im WT könnte aus einem Zusammenwirken der GPx2 mit anderen prokanzerogenen Selenoproteinen wie Sep15 und TrxR1 resultieren. Eine nähere Analyse dieses Zusammenhangs ist notwendig, um beurteilen zu können, welche Patienten von einer Supplementation mit Selen sowie mit sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, die antioxidative Enzyme wie GPx2 induzieren, profitieren und bei welchen adverse Effekte überwiegen könnten.

4.6 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Fehlen der GPx2 bereits basal mit einer niedriggradigen Entzündung assoziiert ist, welche mit einer erhöhten Apoptoserate im Kryptengrund und einer Aktivierung stress-responsiver Signalwege (UPR und / oder ISR) verknüpft ist. Im hier untersuchten *knockout*-Modell war es nicht möglich herauszufinden, welche dieser Reaktionen kausal durch den GPx2 KO ausgelöst worden ist, und welche in dessen Folge entstanden. Um herauszufinden, ob die initiale Schädigung im GPx2 KO auf einer Beeinflussung inflammatorischer Signalwege, der ISR / UPR oder auf einer Modulation apoptotischer Signalwege beruht, müssten die Folgen eines konditionalen *knockouts* der GPx2 im Darmepithel in einer Zeitreihe untersucht werden.

Um mechanistische Hinweise zu erhalten, wäre es zudem sinnvoll, Methoden einzusetzen, die eine zellorganellspezifische Darstellung des Redox-Status ermög-

lichen. In Betracht kämen Weiterentwicklungen von *roGFP*-Sonden zur Evaluierung des Thiol-Redoxstatus [360, 361] oder *HyPer*-Sonden zur organellspezifischen Hydroperoxid detektion [362]. Eine spezifische Rolle der GPx2 in der Regulation Redox-sensitiver Signalwege könnte zudem anhand des Aktivierungszustands von Proteintyrosinkinasen, Proteintyrosinphosphatasen und PTEN untersucht werden. Auch eine weitere Analyse des NF κ B-Signalweges bietet sich an.

Bezüglich der Rolle der GPx2 in der nicht-entzündungsassoziierten Colonkanzerogenese besteht weiterhin Klärungsbedarf. Die Rolle des Immunsystems und der Antitumorimmunität sollte durch eine genauere Analyse der tumorinfiltrierenden Immunzelltypen und Cytokine erfolgen. Auch wenn in der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede in den Plasma-PGE₂-Gehalten gefunden wurden, könnte eine Analyse der lokalen PGE₂-Synthese im Darm Genotypunterschiede zu Tage bringen. Erfolgversprechend wäre zudem eine Untersuchung der Apoptoserate in Tumoren und präneoplastischen Läsionen. Wegen der geringen Tumorinzidenz und der relativ geringen Anzahl präneoplastischer Läsionen war dies anhand der vorliegenden Proben nicht möglich. Da der C57Bl/6-Mausstamm generell eine niedrige Tumorinzidenz im AOM-Modell aufweist [310], erscheint es sinnvoll für weitere Versuche den Mausstamm zu wechseln oder die AOM-Dosis zu erhöhen. Auch hier wäre die Nutzung eines konditionellen *knockouts* sinnvoll. Da die GPx2 anscheinend in den einzelnen Tumorigenesephasen unterschiedliche Auswirkungen hat, könnte so der Effekt eines KO vor der Tumorumitiation mit einem KO in einer späteren Phase der Kanzerogenese verglichen werden.

Die niedriggradige Entzündung und erhöhte Tnf α -Expression im GPx2 KO könnten unter anderem die größeren Tumore im GPx2 KO bedingt haben. Um kausale Effekte von TNF α zu untersuchen, könnten TNF α -Antagonisten wie Etanercept verwendet werden.

Die eher U-förmige Wirkungskurve von Selen in der AOM-induzierten Colonkanzerogenese in dieser Arbeit fügt sich ein in die Warnungen von Fachleuten vor einer zu hohen Selensupplementation [7, 145, 146]. Im Gegensatz dazu wirkte sich eine hohe Selengabe im AOM/DSS-Modell positiv aus [82]. Da gerade in der Krebstherapie häufig hochdosiertes Selen eingesetzt wird, sollten mögliche adverse Effekte in Abhängigkeit vom Kanzerogenesemechanismus und der chemischen Form des Selens näher untersucht werden. Gleiches gilt im speziellen für die GPx2, da diese offensichtlich pro- und antikanzerogene Eigenschaften besitzt.

5 Zusammenfassung

Dem Mikronährstoff Selen wird eine antikanzerogene Funktion in der Colonkanzerogenese zugeschrieben. Das Selenoprotein GPx2 wird in der colorektalen Kanzerogenese verstärkt exprimiert. Es handelt sich hierbei um ein Hydroperoxide-reduzierendes Enzym, welches vor allem im Kryptengrund des Darmepithels lokalisiert ist. Wegen der spezifischen Lokalisation und Regulation der GPx2-Expression wird vermutet, dass GPx2 spezifische Funktionen in proliferierenden Zellen wahrnimmt. Bisher wurden sowohl anti- als auch prokanzerogene Funktionen der GPx2 beschrieben. In Zellkultur-experimenten förderte GPx2 das Wachstum von Tumorzellen und Xenografts, während die Invasivität und Migrationsfähigkeit von Tumorzellen durch GPx2 gehemmt wurden. Dies konnte teilweise auf eine antiinflammatorische Wirkung der GPx2 durch Cox2-Hemmung zurückgeführt werden. Auch im AOM/DSS-Modell der entzündungsassoziierten Colonkanzerogenese in der Maus fungierte GPx2 antiinflammatorisch und wirkte so der Tumorentstehung entgegen, förderte aber gleichzeitig das Tumorstadium. Ziel dieser Arbeit war es, zum einen die physiologische Funktion der GPx2 im Kryptengrund näher zu charakterisieren. Zum anderen sollte untersucht werden, welchen Effekt ein *knockout* der GPx2 in der nicht-entzündungsassoziierten, AOM-induzierten Colonkanzerogenese hat.

Im Selenmangel wird die Expression bestimmter Selenoproteine bevorzugt aufrechterhalten. GPx2 gehört zu diesen hoch in der Biosynthesehierarchie stehenden Selenoproteinen. In der vorliegenden Arbeit war in selenarmen WT-Mäusen keine GPx1-Expression mehr detektierbar, während die GPx2-Expression am Kryptengrund aufrechterhalten wurde. In isolierten Kryptengrundepithelzellen der -Se-Gruppe lag im GPx2 KO eine erhöhte Caspase 3/7-Aktivität vor. Zugleich zeigte sich bei einer Stimulation mit dem Hydroperoxid HPODE eine stärkere Anfälligkeit für oxidativen Stress. In den +Se- und ++Se-Gruppen traten diese Effekte nicht auf. Dies lässt darauf schließen, dass ein anderes Selenoprotein, möglicherweise die im Kryptengrund des Colons von GPx2 KO-Mäusen verstärkt exprimierte GPx1, das Fehlen der GPx2 kompensieren konnte. Demnach besteht eine der Funktionen der spezifischen Expression der GPx2 in proliferierenden Zellen in der Aufrechterhaltung des Schutzes vor oxidativen Schäden und Apoptose im Selenmangel.

In histologischen Schnitten war eine erhöhte Apoptoserate im Kryptengrund des Colons im GPx2 KO im Vergleich zum WT auch in +Se- und ++Se-Tieren zu erkennen. Dies lässt darauf schließen, dass GPx2 in den Kryptengrundepithelzellen noch weitere Funktionen außer dem Schutz vor oxidativem Stress hat.

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass GPx2 KO-Mäuse bereits basal eine niedriggradige Entzündung aufweisen. Diese war gekennzeichnet durch eine erhöhte Tnf α mRNA-Expression in Kryptengrundepithelzellen (-Se, +Se), eine erhöhte

Tnf α -Sekretion von Darmabschnitten in der *ex vivo*-Kultur (-Se) und erhöhte Tnf α -Plasmaspiegel (+Se), eine vermehrte Makrophageninfiltration in die *Lamina propria* des Colons (-Se, +Se) und eine Kryptenelongation sowie eine Elongation der proliferativen Zone der Colorkrypte. Des Weiteren war der GPx2 KO durch eine Aktivierung von UPR- bzw. ISR-Markern gekennzeichnet, welche in Dünn- und Dickdarm unterschiedlich ausgeprägt war. Inflammatorische Prozesse im Darmepithel gehen häufig mit ER-Stress bzw. mit einer Aktivierung der UPR einher, wobei sie sowohl kausal für, als auch Folge von ER-Stress sein können. Nach AOM-Behandlung kam es im Colon des GPx2 KO bei -Se zur Ausbildung einer aktiven Entzündung. Neben dem histologischen Erscheinungsbild des Colons war diese durch erhöhte Milzgewichte charakterisiert. Es ist anzunehmen, dass die vermehrten AOM-induzierten Apoptosen in Kombination mit der erhöhten basalen Apoptoserate zu einer gestörten Barrierefunktion des Darms und in der Folge zur Ausbildung einer akuten Entzündung führten, welche aufgrund des Mangels an GPx2 nicht mehr aufgelöst werden konnte. Zusammenfassend demonstrieren diese Daten eine wichtige anti-inflammatorische Rolle der GPx2 im Darmepithel.

Diverse Publikationen zeigen eine Hochregulation der GPx2 in der colorektalen Kannzerogenese. In 67% der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten MDF (WT +Se) wurde eine verstärkte GPx2-Immunfärbung beobachtet. Eine verstärkte GPx2-Expression ist demnach ein relativ frühes Ereignis in der Colonkanzerogenese. Allerdings colokalisierte diese nicht immer mit dem in 87% der untersuchten MDF hochregulierten β -Catenin, so dass sich die Hypothese einer Induktion der GPx2 in der Colonkanzerogenese durch β -Catenin nicht festigen ließ.

In der +Se-Gruppe hatten die GPx2 KO-Tiere größere Tumore als WT-Tiere, was möglicherweise auf die proliferationsfördernde Wirkung der im GPx2 KO vorliegenden niedriggradigen Entzündung zurückzuführen sein könnte. Insgesamt resultierte das Fehlen der GPx2 jedoch in einer verminderten Entstehung von Tumoren (-Se und ++Se) und präneoplastischen Läsionen (-Se und +Se). Acht Stunden nach AOM-Gabe war im GPx2 KO-Colon eine erhöhte Apoptoserate in der Kryptenmitte (-Se, +Se), nicht jedoch im Kryptengrund oder in der ++Se-Gruppe zu beobachten. Möglicherweise wirkt GPx2 prokanzerogen, indem sie die effiziente Elimination geschädigter Zellen in der Initiationsphase verhindert. Eine ähnliche Wirkung wäre auch durch die erhöhte GPx2-Expression in MDF in der Promotionsphase denkbar. Des Weiteren kommen als Erklärung für prokanzerogene Eigenschaften der GPx2 ISR-Signalwege und eine bessere Elimination neoplastischer Zellen durch das Immunsystem in Betracht. Vor allem in +Se und ++Se könnte GPx2 im Zusammenwirken mit anderen Selenoproteinen die Entstehung von MDF bzw. Tumoren fördern. Eine wichtige Rolle könnte hierbei die Modulation des Redox-Status in Tumorzellen spielen.

Letzteres könnte auch ein Erklärungsansatz für den beobachteten, tendenziell U-förmigen Effekt des Selenstatus im WT auf Tumorentstehung und Tumorgroße sein. Auch dieser steht im Gegensatz zu einer antiinflammatorischen Wirkung der ++Se-Diät im AOM/DSS-Modell.

Zusammenfassend scheint die Rolle von Selen und GPx2 in der Colonkanzerogenese vom Kanzerogenesestadium und vor allem vom Kanzerogenesemechanismus, bzw. der Beteiligung einer Entzündung, abzuhängen. Eine nähere Analyse dieser Zusammenhänge ist notwendig, um beurteilen zu können, welche Patienten von einer Supplementation mit Selen sowie mit sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, die antioxidative Enzyme wie GPx2 induzieren, profitieren und bei welchen adverse Effekte überwiegen könnten.

6 Literaturverzeichnis

1. Schwarz, K., Foltz C.M. *Selenium as an Integral Part of Factor 3 against Dietary Necrotic Liver Degeneration*. J. Am. Chem. Soc., 1957. 79 (12): 3292-3293.
2. Rayman, M. *Food-chain selenium and human health: emphasis on intake*. Br. J. Nutr., 2008. 100 (2): 254-268.
3. DGE, ÖGE, SGE *Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr*. Neustadt an der Weinstraße: Neuer Umschau Buchverlag, 2012.
4. FNB *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids: The National Academies Press*, 2000.
5. WHO, FAO *Vitamin and mineral requirements in human nutrition*, Second edition. Genf: WHO, 2004.
6. Rayman, M.P. *The importance of selenium to human health*. Lancet, 2000. 356 (9225): 233-241.
7. Rayman, M.P. *Selenium and human health*. Lancet, 2012. 379 (9822): 1256-1268.
8. Papp, L.V., Lu J., Holmgren A., Khanna K.K. *From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health*. Antioxid. Redox. Signaling, 2007. 9 (7): 775-806.
9. Lee, B.J., Worland P.J., Davis J.N., Stadtman T.C., Hatfield D.L. *Identification of a selenocysteyl-tRNA(Ser) in mammalian cells that recognizes the nonsense codon, UGA*. Journal of Biological Chemistry 1989 264 (17): 9724-9727
10. Berry, M., Banu L., Harney J., Larsen P. *Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine insertion at UGA codons*. EMBO J., 1993. 12 (8): 3315-3322.
11. Xu, X.-M., Carlson B.A., Mix H., Zhang Y., Saira K., Glass R.S., Berry M.J., Gladyshev V.N., Hatfield D.L. *Biosynthesis of Selenocysteine on Its tRNA in Eukaryotes*. PLoS Biol., 2007. 5 (1): e4.
12. Copeland, P.R., Stepanik V.A., Driscoll D.M. *Insight into Mammalian Selenocysteine Insertion: Domain Structure and Ribosome Binding Properties of Sec Insertion Sequence Binding Protein 2*. Mol. Cell. Biol., 2001. 21 (5): 1491-1498.
13. Zavacki, A.M., Mansell J.B., Chung M., Klimovitsky B., Harney J.W., Berry M.J. *Coupled tRNA^{Sec}-Dependent Assembly of the Selenocysteine Decoding Apparatus*. Mol. Cell, 2003. 11 (3): 773-781.
14. Tujebajeva, R., Copeland P., Xu X., Carlson B., Harney J., Driscoll D., Hatfield D., Berry M. *Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion*. EMBO Rep., 2000. 1 (2): 158-163.
15. Chavatte, L., Brown B., Driscoll D. *Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes*. Nat. Struct. Mol. Biol., 2005. 12 (5): 408-416.
16. Xu, X., Mix H., Carlson B., Grabowski P., Gladyshev V., Berry M., Hatfield D. *Evidence for direct roles of two additional factors, SECp43 and soluble liver antigen, in the selenoprotein synthesis machinery*. J. Biol. Chem., 2005. 280 (50): 41568-41575.
17. 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., Berry M.J. *Supramolecular Complexes Mediate Selenocysteine Incorporation In Vivo*. Mol. Cell. Biol., 2006. 26 (6): 2337-2346.
18. Behne, D., Hilmert H., Scheid S., Gessner H., Elger W. *Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins*. Biochim. Biophys. Acta, 1988. 966 (1): 12-21.
19. Hill, K.E., Reid Lyons P., Burk R.F. *Differential regulation of rat liver selenoprotein mRNAs in selenium deficiency*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1992. 185 (1): 260-263.
20. Hatfield, D., Gladyshev V. *How selenium has altered our understanding of the genetic code*. Mol. Cell. Biol., 2002. 22 (11): 3565-3576.
21. Moriarty, P., Reddy C., Maquat L. *Selenium deficiency reduces the abundance of mRNA for Se-dependent glutathione peroxidase 1 by a UGA-dependent mechanism likely to be nonsense codon-mediated decay of cytoplasmic mRNA*. Mol. Cell. Biol., 1998. 18 (5): 2932-2939.

22. Wingler, K., Müller C., Brigelius-Flohé R. *Stability of gastrointestinal glutathione peroxidase mRNA in selenium deficiency depends on its 3' UTR*. Biofactors, 2001. 14 (1-4): 43-50.
23. Müller, C., Wingler K., Brigelius-Flohé R. *3'UTRs of glutathione peroxidases differentially affect selenium-dependent mRNA stability and selenocysteine incorporation efficiency*. J. Biol. Chem., 2003. 384 (1): 11-18.
24. 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. *Dietary selenium affects methylation of the wobble nucleoside in the anticodon of selenocysteine tRNA([Ser]Sec)*. J. Biol. Chem., 1993. 268 (19): 14215-14223.
25. Carlson, B.A., Xu X.-M., Gladyshev V.N., Hatfield D.L. *Selective rescue of selenoprotein expression in mice lacking a highly specialized methyl group in selenocysteine tRNA*. J. Biol. Chem., 2005. 280 (7): 5542-5548.
26. Carlson, B.A., Moustafa M.E., Sengupta A., Schweizer U., Shrimali R., Rao M., Zhong N., Wang S., Feigenbaum L., Lee B.J. *Selective restoration of the selenoprotein population in a mouse hepatocyte selenoproteinless background with different mutant selenocysteine tRNAs lacking Um34*. J. Biol. Chem., 2007. 282 (45): 32591-32602.
27. Squires, J.E., Stoytchev I., Forry E.P., Berry M.J. *SBP2 Binding Affinity Is a Major Determinant in Differential Selenoprotein mRNA Translation and Sensitivity to Nonsense-Mediated Decay*. Mol. Cell. Biol., 2007. 27 (22): 7848-7855.
28. Budiman, M., Bubenik J., Miniard A., Middleton L., Gerber C., Cash A., Driscoll D. *Eukaryotic initiation factor 4a3 is a selenium-regulated RNA-binding protein that selectively inhibits selenocysteine incorporation*. Mol. Cell, 2009. 35 (4): 479-489.
29. Miniard, A., Middleton L., Budiman M., Gerber C., Driscoll D. *Nucleolin binds to a subset of selenoprotein mRNAs and regulates their expression*. Nucleic Acids Res., 2010. 38 (14): 4807-4820.
30. Kryukov, G.V., Castellano S., Novoselov S.V., Lobanov A.V., Zehtab O., Guigó R., Gladyshev V.N. *Characterization of mammalian selenoproteomes*. Science, 2003. 300 (5624): 1439-1443.
31. Lobanov, A.V., Hatfield D.L., Gladyshev V.N. *Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes*. Biochim. Biophys. Acta, 2009. 1790 (11): 1424-1428.
32. Stadtman, T. *Selenocysteine*. Annu. Rev. Biochem., 1996. 65 83-100.
33. Bösl, M.R., Takaku K., Oshima M., Nishimura S., Taketo M.M. *Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (Trsp)*. Proc. Natl. Acad. Sci. , 1997. 94 (11): 5531-5534.
34. Matsui, M., Oshima M., Oshima H., Takaku K., Maruyama T., Yodoi J., Taketo M.M. *Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene*. Dev. Biol., 1996. 178 (1): 179-185.
35. Nonn, L., Williams R.R., Erickson R.P., Powis G. *The Absence of Mitochondrial Thioredoxin 2 Causes Massive Apoptosis, Exencephaly, and Early Embryonic Lethality in Homozygous Mice*. Mol. Cell. Biol., 2003. 23 (3): 916-922.
36. Yant, L., Ran Q., Rao L., Van Remmen H., Shibatani T., Belter J., Motta L., Richardson A., Prolla T. *The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults*. Free Radical Biol. Med., 2003. 34 (4): 496-502.
37. Brigelius-Flohé, R. *Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors*. J. Biol. Chem., 2006. 387 (10-11): 1329-1335.
38. Flohe, L., Günzler W.A., Schock H.H. *Glutathione peroxidase: A selenoenzyme*. FEBS Lett., 1973. 32 (1): 132-134.
39. Esworthy, R.S., Ho Y.-S., Chu F.-F. *The Gpx1 Gene Encodes Mitochondrial Glutathione Peroxidase in the Mouse Liver*. Arch. Biochem. Biophys., 1997. 340 (1): 59-63.
40. Cheng, W.-H., Ho Y.-S., Valentine B.A., Ross, Deborah A., Combs G.F., Lei X.G. *Cellular Glutathione Peroxidase Is the Mediator of Body Selenium To Protect against Paraquat Lethality in Transgenic Mice*. The Journal of Nutrition 1998 128 (7): 1070-1076
41. Cheng, W.-H., Fu Y.X., Porres J.M., Ross D.A., Lei X.G. *Selenium-dependent cellular glutathione peroxidase protects mice against a pro-oxidant-induced oxidation of NADPH, NADH, lipids, and protein*. FASEB J., 1999. 13 (11): 1467-1475.

42. Takahashi, K., Avissar N., Whitin J., Cohen H. *Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: A selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme.* Arch. Biochem. Biophys., 1987. 256 (2): 677-686.
43. Avissar, N., Ornt D.B., Yagil Y., Horowitz S., Watkins R.H., Kerl E.A., Takahashi K., Palmer I.S., Cohen H.J. *Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase.* Am. J. Physiol. Cell Physiol., 1994. 266 (2): C367-C375.
44. Burk, R.F., Olson G.E., Winfrey V.P., Hill K.E., Yin D. *Glutathione peroxidase-3 produced by the kidney binds to a population of basement membranes in the gastrointestinal tract and in other tissues.* Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 2011. 301 (1): G32-G38.
45. Olson, G.E., Whitin J.C., Hill K.E., Winfrey V.P., Motley A.K., Austin L.M., Deal J., Cohen H.J., Burk R.F. *Extracellular glutathione peroxidase (Gpx3) binds specifically to basement membranes of mouse renal cortex tubule cells.* Am. J. Physiol. Renal Physiol., 2010. 298 (5): F1244-F1253.
46. Björnstedt, M., Xue J., Huang W., Akesson B., Holmgren A. *The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase.* J. Biol. Chem., 1994. 269 (47): 29382-29384.
47. Ursini, F., Maiorino M., Valente M., Ferri L., Gregolin C. *Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides.* Biochim. Biophys. Acta, 1982. 710 (2): 197-211.
48. Ursini, F., Maiorino M., Gregolin C. *The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase.* Biochim. Biophys. Acta, 1985. 839 (1): 62-70.
49. Lei, X., Evenson J., Thompson K., Sunde R. *Glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase are differentially regulated in rats by dietary selenium.* J. Nutr., 1995. 125 (6): 1438-1446.
50. Pushpa-Rekha, T.R., Burdsall A.L., Oleksa L.M., Chisolm G.M., Driscoll D.M. *Rat Phospholipid-hydroperoxide Glutathione Peroxidase: cDNA Cloning and Identification of Multiple Transcription and Translation Start Sites.* J. Biol. Chem., 1995. 270 (45): 26993-26999.
51. Ran, Q., Liang H., Gu M., Qi W., Walter C.A., Roberts L.J., Herman B., Richardson A., Van Remmen H. *Transgenic Mice Overexpressing Glutathione Peroxidase 4 Are Protected against Oxidative Stress-induced Apoptosis.* J. Biol. Chem., 2004. 279 (53): 55137-55146.
52. Seiler, A., Schneider M., Förster H., Roth S., Wirth E.K., Culmsee C., Plesnila N., Kremmer E., Radmark O., Wurst W. *Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent-and AIF-mediated cell death.* Cell Metab. , 2008. 8 (3): 237-248.
53. Brigelius-Flohé, R. *Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases.* Free Radical Biol. Med., 1999. 27 (9): 951-965.
54. Brigelius-Flohé, R., Maiorino M. *Glutathione peroxidases.* Biochim. Biophys. Acta, 2013. 1830 3289-3303.
55. Ursini, F., Heim S., Kiess M., Maiorino M., Roveri A., Wissing J., Flohé L. *Dual Function of the Selenoprotein PHGPx During Sperm Maturation.* Science, 1999. 285 (5432): 1393-1396.
56. Wingler, K., Böcher M., Flohé L., Kollmus H., Brigelius-Flohé R. *mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins.* Eur. J. Biochem., 1999. 259 (1-2): 149-157.
57. Chu, F., Doroshov J., Esworthy R. *Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI.* J. Biol. Chem., 1993. 268 (4): 2571-2576.
58. Brigelius-Flohé, R., Müller C., Menard J., Florian S., Schmehl K., Wingler K. *Functions of GI-GPx: lessons from selenium-dependent expression and intracellular localization.* Biofactors, 2001. 14 (1-4): 101-106.
59. Chu, F.-F., Esworthy R.S., Lee L., Wilczynski S. *Retinoic Acid Induces Gpx2 Gene Expression in MCF-7 Human Breast Cancer Cells.* J. Nutr., 1999. 129 (10): 1846-1854.
60. Komatsu, H., Okayasu I., Mitomi H., Imai H., Nakagawa Y., Obata F. *Immunohistochemical detection of human gastrointestinal glutathione peroxidase in normal tissues and cultured cells with novel mouse monoclonal antibodies.* J. Histochem. Cytochem., 2001. 49 (6): 759-766.

61. Wingler, K., Müller C., Schmehl K., Florian S., Brigelius-Flohé R. *Gastrointestinal Glutathione Peroxidase Prevents Transport of Lipid Hydroperoxides in CaCo-2 Cells*. *Gastroenterology*, 2000. 119 (2): 420-430.
62. Florian, S., Wingler K., Schmehl K., Jacobasch G., Kreuzer O.J., Meyerhof W., Brigelius-Flohé R. *Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue*. *Free Radical Res.*, 2001. 35 (6): 655-663.
63. Kipp, A., Banning A., Brigelius-Flohé R. *Activation of the glutathione peroxidase 2 (GPx2) promoter by beta-catenin*. *Biol. Chem.*, 2007. 388 (10): 1027-1033.
64. Kipp, A.P., Müller M.F., Göken E.M., Deubel S., Brigelius-Flohé R. *The selenoproteins GPx2, TrxR2 and TrxR3 are regulated by Wnt signalling in the intestinal epithelium*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012. 1820 (10): 1588-1596.
65. Yan, W., Chen X. *GPX2, a direct target of p63, inhibits oxidative stress-induced apoptosis in a p53-dependent manner*. *J. Biol. Chem.*, 2006. 281 (12): 7856-7862.
66. Yang, A., Kaghad M., Wang Y., Gillett E., Fleming M.D., Dötsch V., Andrews N.C., Caput D., McKeon F. *p63, a p53 Homolog at 3q27-29, Encodes Multiple Products with Transactivating, Death-Inducing, and Dominant-Negative Activities*. *Mol. Cell*, 1998. 2 (3): 305-316.
67. Saretzki, G., Walter T., Atkinson S., Passos J., Bareth B., Keith W., Stewart R., Hoare S., Stojkovic M., Armstrong L., von Zglinicki T., Lako M. *Downregulation of multiple stress defense mechanisms during differentiation of human embryonic stem cells*. *Stem Cells*, 2008. 26 (2): 455-464.
68. Speckmann, B., Bidmon H.-J., Pinto A., Anlauf M., Sies H., Steinbrenner H. *Induction of glutathione peroxidase 4 expression during enterocytic cell differentiation*. *J. Biol. Chem.*, 2011. 286 (12): 10764-10772.
69. Chu, F.F., Esworthy R.S., Chu P.G., Longmate J.A., Huycke M.M., Wilczynski S., Doroshow J.H. *Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes*. *Cancer Res.*, 2004. 64 (3): 962-968.
70. Esworthy, R.S., Mann J.R., Sam M., 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): G426-G436.
71. Banning, A., Deubel S., Kluth D., Zhou Z., Brigelius-Flohé R. *The GI-GPx gene is a target for Nrf2*. *Mol. Cell. Biol.*, 2005. 25 (12): 4914-4923.
72. Mörk, H., al-Taie O.H., Bahr K., Zierer A., Beck C., Scheurlen M., Jakob F., Köhrle 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): 108-116.
73. Murawaki, Y., Tsuchiya H., Kanbe T., Harada K., Yashima K., Nozaka K., Tanida O., Kohno M., Mukoyama T., Nishimuki E., Kojo H., Matsura T., Takahashi K., Osaki M., Ito H., Yodoi J., Shiota G. *Aberrant expression of selenoproteins in the progression of colorectal cancer*. *Cancer Lett.*, 2008. 259 (2): 218-230.
74. Banning, A., Florian S., Deubel S., Thalmann S., Müller-Schmehl K., Jacobasch G., Brigelius-Flohé R. *GPx2 counteracts PGE2 production by dampening COX-2 and mPGES-1 expression in human colon cancer cells*. *Antioxid. Redox. Signaling*, 2008. 10 (9): 1491-1500.
75. Serewko, M.M., Popa C., Dahler A.L., Smith L., Strutton G.M., Coman W., Dicker A.J., Saunders N.A. *Alterations in gene expression and activity during squamous cell carcinoma development*. *Cancer Res.*, 2002. 62 (13): 3759-3765.
76. Walshe, J., Serewko-Auret M.M., Teakle N., Cameron S., Minto K., Smith L., Burcham P.C., Russell T., Strutton G., Griffin A. *Inactivation of glutathione peroxidase activity contributes to UV-induced squamous cell carcinoma formation*. *Cancer Res.*, 2007. 67 (10): 4751-4758.
77. Woenckhaus, M., Klein-Hitpass L., Grepmeier U., Merk J., Pfeifer M., Wild P., Bettstetter M., Wuensch P., Blaszyk H., Hartmann A., Hofstaedter F., Dietmaier W. *Smoking and cancer-related gene expression in bronchial epithelium and non-small-cell lung cancers*. *J. Pathol.*, 2006. 210 (2): 192-204.
78. Naiki-Ito, A., Asamoto M., Hokaiwado N., Takahashi S., Yamashita H., Tsuda H., Ogawa K., Shirai T. *Gpx2 Is an Overexpressed Gene in Rat Breast Cancers Induced by Three Different Chemical Carcinogens*. *Cancer Res.*, 2007. 67 (23): 11353-11358.

79. Esworthy, R.S., Aranda R., Martin M.G., Doroshov J.H., Binder S.W., Chu F.F. *Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis*. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 2001. 281 (3): G848-G855.
80. Florian, S., Krehl S., Loewinger M., Kipp A., Banning A., Esworthy S., Chu F., Brigelius-Flohé R. *Loss of GPx2 increases apoptosis, mitosis, and GPx1 expression in the intestine of mice*. Free Radical Biol. Med., 2010. 49 (11): 1694-1702.
81. Dittrich, A.M., Meyer H.-A., Krokowski M., Quarcoo D., Ahrens B., Kube S.M., Witzenrath M., Esworthy R.S., Chu F.-F., Hamelmann E. *Glutathione peroxidase-2 protects from allergen-induced airway inflammation in mice*. Eur. Respir. J., 2010. 35 (5): 1148-1154.
82. Krehl, S., Loewinger M., Florian S., Kipp A.P., Banning A., Wessjohann L.A., Brauer M.N., Iori R., Esworthy R.S., Chu F., Brigelius-Flohé R. *Glutathione peroxidase-2 and selenium decreased inflammation and tumors in a mouse model of inflammation-associated carcinogenesis whereas sulforaphane effects differed with selenium supply*. Carcinogenesis, 2012. 33 (3): 620-628.
83. Banning, A., Kipp A., Schmitmeier S., Löwinger M., Florian S., Krehl S., Thalmann S., Thierbach R., Steinberg P., Brigelius-Flohé 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): 9746-9753.
84. Fritsch, H., Kühnel W. *Taschenatlas Anatomie*, 10. Auflage, Band 2 Innere Organe. Stuttgart: Thieme, 2009.
85. Junqueira, L.C.U., Carneiro J., Gratzl M. *Histologie*, 6. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2005.
86. MacDonald, T.T., Monteleone G. *Human Gut-Associated Lymphoid Tissues*. In: J. Mestecky, M. E. Lamm, W. Strober, J. Bienstock, J. R. McGhee, and L. Mayer (eds.), Mucosal Immunology. Burlington/ San Diego/ London: Elsevier Academic Press, 2005.
87. Gordon, J.I., Hermiston M.L. *Differentiation and self-renewal in the mouse gastrointestinal epithelium*. Curr. Opin. Cell Biol., 1994. 6 (6): 795-803.
88. Barker, N., van Es J.H., Kuipers J., Kujala P., van den Born M., Cozijnsen M., Haegebarth A., Korving J., Begthel H., Peters P.J. *Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5*. Nature, 2007. 449 (7165): 1003-1007.
89. Sangiorgi, E., Capecchi M.R. *Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells*. Nat. Genet., 2008. 40 (7): 915-920.
90. Yan, K., Chia L., Li X., Ootani A., Su J., Lee J., Su N., Luo Y., Heilshorn S., Amieva M., Sangiorgi E., Capecchi M., Kuo C. *The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations*. Proc. Natl. Acad. Sci. , 2012. 109 (2): 466-471.
91. Scoville, D.H., Sato T., He X.C., Li L. *Current View: Intestinal Stem Cells and Signaling*. Gastroenterology, 2008. 134 (3): 849-864.
92. Medema, J., Vermeulen L. *Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer*. Nature, 2011. 474 (7351): 318-326.
93. Marshman, E., Booth C., Potten C.S. *The intestinal epithelial stem cell*. BioEssays, 2002. 24 (1): 91-98.
94. Gerbe, F., van Es J.H., Makrini L., Brulin B., Mellitzer G., Robine S., Romagnolo B., Shroyer N.F., Bourgaux J.-F., Pignodel C., Clevers H., Jay P. *Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium*. J. Cell Biol., 2011. 192 (5): 767-780.
95. Rothenberg, M.E., Nusse Y., Kalisky T., Lee J.J., Dalerba P., Scheeren F., Lobo N., Kulkarni S., Sim S., Qian D. *Identification of a Ckit+ colonic crypt base secretory cell that supports Lgr5+ stem cells in mice*. Gastroenterology, 2012. 142 (5): 1195-1205.
96. Sato, T., van Es J.H., Snippert H.J., Stange D.E., Vries R.G., van den Born M., Barker N., Shroyer N.F., van de Wetering M., Clevers H. *Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts*. Nature, 2010. 469 (7330): 415-418.
97. Crosnier, C., Stamatakis D., Lewis J. *Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control*. Nat. Rev. Genet., 2006. 7 (5): 349-359.
98. Battle, E., Henderson J.T., Begthel H., van den Born M.M., Sancho E., Huls G., Meeldijk J., Robertson J., van de Wetering M., Pawson T. *Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in*

- the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB*. Cell, 2002. 111 (2): 251-263.
99. Hanahan, D., Weinberg R.A. *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. 144 (5): 646-674.
100. Edelblum, K.L., Yan F., Yamaoka T., Polk D.B. *Regulation of apoptosis during homeostasis and disease in the intestinal epithelium*. Inflamm. bowel dis., 2006. 12 (5): 413-424.
101. Watson, A.J.M., Hughes K.R. *TNFalpha induced intestinal epithelial cell shedding: implications for intestinal barrier function*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 2012. 1258 (1): 1-8.
102. Günther, C., Neumann H., Neurath M.F., Becker C. *Apoptosis, necrosis and necroptosis: cell death regulation in the intestinal epithelium*. Gut, 2012. Epub doi:10.1136/gutjnl-2011-301364.
103. Alberts, B., Johnson A., Lewis J. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. New York: Garland Science, 2002.
104. Potten, C. *The significance of spontaneous and induced apoptosis in the gastrointestinal tract of mice*. Cancer Metastasis Rev., 1992. 11 (2): 179-195.
105. Schleich, K., Lavrik I.N. *Systems Biology of Death Receptor-Induced Apoptosis*. In: I. N. Lavrik (ed.), *Systems Biology of Apoptosis*, pp. 33-56. Heidelberg: Springer, 2013.
106. Bubici, C., Papa S., Pham C.G., Zazzeroni F., Franzoso G. *NF-kappaB and JNK: an intricate affair*. Cell Cycle, 2004. 3 (12): 1524-1529.
107. Onizawa, M., Nagaishi T., Kanai T., Nagano K.-i., Oshima S., Nemoto Y., Yoshioka A., Totsuka T., Okamoto R., Nakamura T., Sakamoto N., Tsuchiya K., Aoki K., Ohya K., Yagita H., Watanabe M. *Signaling pathway via TNFalpha/NF-kappaB in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis*. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 2009. 296 (4): G850-G859.
108. Potten, C.S., Grant H. *The relationship between ionizing radiation-induced apoptosis and stem cells in the small and large intestine*. Br. J. Cancer, 1998. 78 (8): 993-1003.
109. Potten, C.S., Owen G., Booth D. *Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands*. J. Cell Sci., 2002. 115 (11): 2381-2388.
110. Watson, A.J., Pritchard D.M. *VII. Apoptosis in intestinal epithelium: lessons from transgenic and knockout mice*. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 2000. 278 (1): G1-G5.
111. Merritt, A.J., Potten C.S., Watson A., Loh D.Y., Nakayama K.-i., Hickman J.A. *Differential expression of bcl-2 in intestinal epithelia. Correlation with attenuation of apoptosis in colonic crypts and the incidence of colonic neoplasia*. J. Cell Sci., 1995. 108 (6): 2261-2271.
112. Bullen, T., Forrest S., Campbell F., Dodson A., Hershman M., Pritchard D., Turner J., Montrose M., Watson A. *Characterization of epithelial cell shedding from human small intestine*. Lab. Invest., 2006. 86 (10): 1052-1063.
113. Kaatsch, P., C. S., Baras N., Barnes B., Bertz J., Dahm S., Haberland J., Kraywinkel K., Laudi A., Wolf U. *Krebs in Deutschland 2007/2008*, 8. Ausgabe. Berlin: Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2012.
114. Rustgi, A.K. *The genetics of hereditary colon cancer*. Genes Dev., 2007. 21 (20): 2525-2538.
115. Munkholm, P. *Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease*. Aliment. Pharmacol. Ther., 2003. 18 Suppl 2 1-5.
116. Pitot, H.C., Dragan Y. *Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis*. FASEB J., 1991. 5 (9): 2280-2286.
117. Pitot, H. *The molecular biology of carcinogenesis*. Cancer, 1993. 72 (3 Suppl): 962-970.
118. Fearon, E., Vogelstein B. *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. 61 (5): 759-767.
119. Sansom, O.J., Reed K.R., Hayes A.J., Ireland H., Brinkmann H., Newton I.P., Batlle E., Simon-Assmann P., Clevers H., Nathke I.S. *Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration*. Genes Dev., 2004. 18 (12): 1385-1390.
120. Barker, N., Ridgway R.A., van Es J.H., van de Wetering M., Begthel H., van den Born M., Danenberg E., Clarke A.R., Sansom O.J., Clevers H. *Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer*. Nature, 2009. 457 (7229): 608-611.

121. Perše, M., Cerar A. *Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats*. J Biomed Biotechnol, 2011. 2011 (Article ID 473964): 1-14.
122. Morán, A., Ortega P., de Juan C., Fernández-Marcelo T., Frías C., Sánchez-Pernaute A., Torres A., Díaz-Rubio E., Iñiesta P., Benito M. *Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance*. World J. Gastrointest. Oncol., 2010. 2 (3): 151-158.
123. Neufert, C., Becker C., Neurath M.F. *An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression*. Nat. Protoc, 2007. 2 (8): 1998-2004.
124. Shamberger, R.J. *Relationship of Selenium to Cancer. I. Inhibitory Effect of Selenium on Carcinogenesis*. J. Natl. Cancer Inst., 1970. 44 (4): 931-936.
125. Schrauzer, G.N., White D.A., Schneider C.J. *Cancer mortality correlation studies-III: Statistical associations with dietary selenium intakes*. Bioinorg. Chem., 1977. 7 (1): 23-34.
126. Schrauzer, G.N. *Selenium and cancer: A review*. Bioinorg. Chem., 1976. 5 (3): 275-281.
127. Clayton, C.C., Baumann C.A. *Diet and Azo Dye Tumors: Effect of Diet During a Period When the Dye is Not Fed*. Cancer Res., 1949. 9 (10): 575-582.
128. Jacobs, M., Jansson B., Griffin A. *Inhibitory effects of selenium on 1,2-dimethylhydrazine and methylazoxymethanol acetate induction of colon tumors*. Cancer Lett., 1977. 2 (3): 133-137.
129. Harbach, P.R., Swenberg J.A. *Effects of selenium on 1, 2-dimethylhydrazine metabolism and DNA alkylation*. Carcinogenesis, 1981. 2 (7): 575-580.
130. Jao, S., Shen K., Lee W., Ho Y. *Effect of selenium on 1,2-dimethylhydrazine-induced intestinal cancer in rats*. Dis. Colon Rectum, 1996. 39 (6): 628-631.
131. Feng, Y., Finley J., Davis C., Becker W., Fretland A., Hein D. *Dietary selenium reduces the formation of aberrant crypts in rats administered 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl*. Toxicol. Appl. Pharmacol., 1999. 157 (1): 36-42.
132. Hu, Y., McIntosh G., Le Leu R., Woodman R., Young G. *Suppression of colorectal oncogenesis by selenium-enriched milk proteins: apoptosis and K-ras mutations*. Cancer Res., 2008. 68 (12): 4936-4944.
133. Clark, L., Combs G., Turnbull B., Slate E., Chalker D., Chow J., Davis L., Glover R., Graham G., Gross E., Krongrad A., Leshner J., Park H., Sanders B., Smith C., Taylor J. *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): 1957-1963.
134. Wei, W.-Q., Abnet C.C., Qiao Y.-L., Dawsey S.M., Dong Z.-W., Sun X.-D., Fan J.-H., Gunter E.W., Taylor P.R., Mark S.D. *Prospective study of serum selenium concentrations and esophageal and gastric cardia cancer, heart disease, stroke, and total death*. Am. J. Clin. Nutr., 2004. 79 (1): 80-85.
135. Zhuo, H., Smith A.H., Steinmaus C. *Selenium and lung cancer: a quantitative analysis of heterogeneity in the current epidemiological literature*. Cancer Epidem. Biomar., 2004. 13 (5): 771-778.
136. Amaral, A.F.S., Cantor K.P., Silverman D.T., Malats N. *Selenium and bladder cancer risk: a meta-analysis*. Cancer Epidem. Biomar., 2010. 19 (9): 2407-2415.
137. Etminan, M., FitzGerald J.M., Gleave M., Chambers K. *Intake of Selenium in the Prevention of Prostate Cancer: a Systematic Review and Meta-analysis*. Cancer Cause. Control, 2005. 16 (9): 1125-1131.
138. Brinkman, M., Reulen R.C., Kellen E., Buntinx F., Zeegers M.P. *Are men with low selenium levels at increased risk of prostate cancer? Eur. J. Cancer*, 2006. 42 (15): 2463-2471.
139. WCRF, AICR Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington DC: AICR, 2007.
140. Irons, R., Carlson B.A., Hatfield D.L., Davis C.D. *Both selenoproteins and low molecular weight selenocompounds reduce colon cancer risk in mice with genetically impaired selenoprotein expression*. J. Nutr., 2006. 136 (5): 1311-1317.
141. Ip, C. *Lessons from basic research in selenium and cancer prevention*. J. Nutr., 1998. 128 (11): 1845-1854.

142. Ip, C., Dong Y., Ganther H. *New concepts in selenium chemoprevention*. *Cancer Metastasis Rev.*, 2002. 21 (3-4): 281-289.
143. Brozmanová, J., Mániková D., Vlcková V., Chovanec M. *Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer*. *Arch. Toxicol.*, 2010. 84 (12): 919-938.
144. Brigelius-Flohé, R. *Selenium compounds and selenoproteins in cancer*. *Chem. Biodivers.*, 2008. 5 (3): 389-395.
145. Hatfield, D.L., Yoo M.-H., Carlson B.A., Gladyshev V.N. *Selenoproteins that function in cancer prevention and promotion*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009. 1790 (11): 1541-1545.
146. Davis, C.D., Tsuji P.A., Milner J.A. *Selenoproteins and cancer prevention*. *Annu. Rev. Nutr.*, 2012. 32 73-95.
147. Rayman, M. *Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action*. *Proc. Nutr. Soc.*, 2005. 64 (4): 527-542.
148. Rayman, M.P. *Selenoproteins and human health: Insights from epidemiological data*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009. 1790 (11): 1533-1540.
149. Duffield-Lillico, A.J., Reid M.E., Turnbull B.W., Combs G.F., Slate E.H., Fischbach L.A., Marshall J.R., Clark L.C. *Baseline Characteristics and the Effect of Selenium Supplementation on Cancer Incidence in a Randomized Clinical Trial: A Summary Report of the Nutritional Prevention of Cancer Trial*. *Cancer Epidem. Biomar.*, 2002. 11 (7): 630-639.
150. Duffield-Lillico, A.J., Slate E.H., Reid M.E., Turnbull B.W., Wilkins P.A., Combs G.F., Park H.K., Gross E.G., Graham G.F., Stratton M.S., Marshall J.R., Clark L.C., Group F.t.N.P.o.C.S. *Selenium Supplementation and Secondary Prevention of Nonmelanoma Skin Cancer in a Randomized Trial*. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2003. 95 (19): 1477-1481.
151. Thomson, C., Robinson M., Butler J., Whanger P. *Long-term supplementation with selenate and selenomethionine: selenium and glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) in blood components of New Zealand women*. *Br. J. Nutr.*, 1993. 69 (2): 577-588.
152. Duffield, A.J., Thomson C.D., Hill K.E., Williams S. *An estimation of selenium requirements for New Zealanders*. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1999. 70 (5): 896-903.
153. Xia, Y., Hill K.E., Li P., Xu J., Zhou D., Motley A.K., Wang L., Byrne D.W., 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. 92 (3): 525-531.
154. Burk, R.F., Norsworthy B.K., Hill K.E., Motley A.K., Byrne D.W. *Effects of Chemical Form of Selenium on Plasma Biomarkers in a High-Dose Human Supplementation Trial*. *Cancer Epidem. Biomar.*, 2006. 15 (4): 804-810.
155. Lippman, S., Klein E., Goodman P., Lucia M., Thompson I., Ford L., Parnes H., Minasian L., Gaziano J., Hartline J., Parsons J., Bearden J., Crawford E., Goodman G., Claudio J., Winquist E., Cook E., Karp D., Walther P., Lieber M., Kristal A., Darke A., Arnold K., Ganz P., Santella R., Albanes D., Taylor P., Probstfield J., Jagpal T., Crowley J., Meyskens F., Baker L., Coltman C. *Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT)*. *JAMA*, 2009. 301 (1): 39-51.
156. Méplan, C., Hesketh J. *Functional Aspects of the Genomics of Selenoproteins and Selenocysteine Incorporation Machinery*. *Selenium*, 2012. 505-515.
157. Brigelius-Flohé, R., Kipp A. *Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2009. 1790 (11): 1555-1568.
158. Brigelius-Flohé, R., Müller M., Lippmann D., Kipp A.P. *The Yin and Yang of Nrf2-regulated selenoproteins in carcinogenesis*. *International Journal of Cell Biology*, 2012. 2012 EPub doi:10.1155/2012/486147.
159. Yoo, M.H., Carlson B.A., Tsuji P.A., Tobe R., Naranjo-Suarez S., Lee B.J., Davis C.D., Gladyshev V.N., Hatfield D.L. *Selenoproteins harboring a split personality in both preventing and promoting cancer*. *Selenium*, 2012. 325-333.
160. Knekt, P., Aromaa A., Maatela J., Alfthan G., Aaran R., Hakama M., Hakulinen T., Peto R., Teppo L. *Serum selenium and subsequent risk of cancer among Finnish men and women*. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1990. 82 (10): 864-868.

161. Nomura, A., Heilbrun L.K., Morris J.S., Stemmermann G.N. *Serum Selenium and the Risk of Cancer, by Specific Sites: Case-Control Analysis of Prospective Data*. J. Natl. Cancer Inst., 1987. 79 (1): 103-108.
162. Fernandez-Banares, F., Cabre E., Esteve M., Mingorance M., Abad-Lacruz A., Lachica M., Gil A., Gassull M. *Serum selenium and risk of large size colorectal adenomas in a geographical area with a low selenium status*. American J. Gastroenterol., 2002. 97 (8): 2103-2108.
163. Nelson, M., Goulet A., Jacobs E., Lance P. *Studies into the anticancer effects of selenomethionine against human colon cancer*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 2005. 1059 26-32.
164. Clark, L.C., Hixson L.J., Combs G.F., Reid M.E., Turnbull B.W., Sampliner R.E. *Plasma selenium concentration predicts the prevalence of colorectal adenomatous polyps*. Cancer Epidem. Biomar., 1993. 2 (1): 41-46.
165. Russo, M., Murray S., Wurzelmann J., Woosley J., Sandler R. *Plasma selenium levels and the risk of colorectal adenomas*. Nutr. Cancer, 1997. 28 (2): 125-129.
166. Peters, U., Chatterjee N., Church T.R., Mayo C., Sturup S., Foster C.B., Schatzkin A., Hayes R.B. *High Serum Selenium and Reduced Risk of Advanced Colorectal Adenoma in a Colorectal Cancer Early Detection Program*. Cancer Epidem. Biomar., 2006. 15 (2): 315-320.
167. Wallace, K., Byers T., Morris J.S., Cole B.F., Greenberg E.R., Baron J.A., Gudino A., Spate V., Karagas M.R. *Prediagnostic Serum Selenium Concentration and the Risk of Recurrent Colorectal Adenoma A Nested Case-Control Study*. Cancer Epidem. Biomar., 2003. 12 (5): 464-467.
168. Jacobs, E.T., Jiang R., Alberts D.S., Greenberg E.R., Gunter E.W., Karagas M.R., Lanza E., Ratnasinghe L., Reid M.E., Schatzkin A., Smith-Warner S.A., Wallace K., Martínez M.E. *Selenium and Colorectal Adenoma: Results of a Pooled Analysis*. J. Natl. Cancer Inst., 2004. 96 (22): 1669-1675.
169. Davis, C.D., Feng Y., Hein D.W., Finley J.W. *The chemical form of selenium influences 3, 2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-DNA adduct formation in rat colon*. J. Nutr., 1999. 129 (1): 63-69.
170. Méplan, C., Hughes D.J., Pardini B., Naccarati A., Soucek P., Vodickova L., Hlavatá I., Vrána D., Vodicka P., Hesketh J.E. *Genetic variants in selenoprotein genes increase risk of colorectal cancer*. Carcinogenesis, 2010. 31 (6): 1074-1079.
171. Haug, U., Poole E.M., Xiao L., Curtin K., Duggan D., Hsu L., Makar K.W., Peters U., Kulmacz R.J., Potter J.D. *Glutathione peroxidase tagSNPs: Associations with rectal cancer but not with colon cancer*. Gene. Chromosome. Canc., 2012. 51 (6): 598-605.
172. Barrett, C.W., Ning W., Chen X., Smith J.J., Washington M.K., Hill K.E., Coburn L.A., Peek R.M., Chaturvedi R., Wilson K.T., Burk R.F., Williams C.S. *Tumor Suppressor Function of the Plasma Glutathione Peroxidase Gpx3 in Colitis-Associated Carcinoma*. Cancer Res., 2013. 73 (3): 1245-1255.
173. Tsuji, P.A., Naranjo-Suarez S., Carlson B.A., Tobe R., Yoo M.-H., Davis C.D. *Deficiency in the 15 kDa selenoprotein inhibits human colon cancer cell growth*. Nutrients, 2011. 3 (9): 805-817.
174. Irons, R., Tsuji P.A., Carlson B.A., Ouyang P., Yoo M.-H., Xu X.-M., Hatfield D.L., Gladyshev V.N., Davis C.D. *Deficiency in the 15-kDa Selenoprotein Inhibits Tumorigenicity and Metastasis of Colon Cancer Cells*. Cancer Prev. Res., 2010. 3 (5): 630-639.
175. Tsuji, P.A., Carlson B.A., Naranjo-Suarez S., Yoo M.-H., Xu X.-M., Fomenko D.E., Gladyshev V.N., Hatfield D.L., Davis C.D. *Knockout of the 15 kDa Selenoprotein Protects against Chemically-Induced Aberrant Crypt Formation in Mice*. PLoS ONE, 2012. 7 (12): e50574.
176. NRC *Nutrient requirements of laboratory animals*. Washington DC: National Academies Press, 1995.
177. Bird, R.P. *Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: Preliminary findings*. Cancer Lett., 1987. 37 (2): 147-151.
178. Caderni, G., Femia A.P., Giannini A., Favuzza A., Luceri C., Salvadori M., Dolara P. *Identification of Mucin-depleted Foci in the Unsectioned Colon of Azoxymethane-treated Rats*. Cancer Res., 2003. 63 (10): 2388-2392.
179. Ferraris, R.P., Villenas S.A., Diamond J. *Regulation of brush-border enzyme activities and enterocyte migration rates in mouse small intestine*. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 1992. 262 (6): G1047-G1059.

180. Mariadason, J.M., Nicholas C., L'Italien K.E., Zhuang M., Smartt H.J., Heerdt B.G., Yang W., Corner G.A., Wilson A.J., Klampfer L. *Gene expression profiling of intestinal epithelial cell maturation along the crypt-villus axis*. *Gastroenterology*, 2005. 128 (4): 1081-1088.
181. Olsen, L., Hansen M., Ekström C.T., Troelsen J.T., Olsen J. *CVD: the intestinal crypt/villus in situ hybridization database*. *Bioinformatics*, 2004. 20 (8): 1327-1328.
182. Scholzen, T., Gerdes J. *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. *J. Cell. Physiol.*, 2000. 182 (3): 311-322.
183. Emmendorffer, A., Hecht M., Lohmann-Matthes M.-L., Roesler J. *A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123*. *J. Immunol. Methods*, 1990. 131 (2): 269-275.
184. Halliwell, B., Whiteman M. *Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?* *Br. J. Pharmacol.*, 2004. 142 (2): 231-255.
185. Bradford, M. *rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. 72 (7): 248-254.
186. Schweizer, U., Michaelis M., Köhrle J., Schomburg L. *Efficient selenium transfer from mother to offspring in selenoprotein-P-deficient mice enables dose-dependent rescue of phenotypes associated with selenium deficiency*. *Biochem. J.*, 2004. 378 (Pt 1): 21-26.
187. Brigelius-Flohé, R., Winkler K., Müller C. *Estimation of individual types of glutathione peroxidases* *Methods in Enzymology*. In: H. S. a. L. Packer (ed.), *Protein Sensors and Reactive Oxygen Species - Part A: Selenoproteins and Thioredoxin*, Vol. 347, pp. 101-112: Academic Press, 2002.
188. Marshall, O.J. *PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR*. *Bioinformatics*, 2004. 20 (15): 2471-2472.
189. Zhang, K., Kaufman R. *Identification and characterization of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in vivo*. *Methods Enzymol.*, 2008. 442 395-419.
190. Böcher, M., Böldicke T., Kieß M., Bilitewski U. *Synthesis of mono- and bifunctional peptide-dextran conjugates for the immobilization of peptide antigens on ELISA plates: properties and application*. *J. Immunol. Methods*, 1997. 208 (2): 191-202.
191. Sheehan, T.M., Gao M. *Simplified fluorometric assay of total selenium in plasma and urine*. *Clinical Chemistry*, 1990. 36 (12): 2124-2126.
192. Schomburg, L., Schweizer U., Holtmann B., Flohé L., Sendtner M., Köhrle J. *Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues*. *Biochem. J.*, 2003. 370 (Pt 2): 397-402.
193. Kipp, A., Banning A., van Schothorst E.M., Meplan C., Schomburg L., Evelo C., Coort S., Gaj S., Keijer J., Hesketh J., Brigelius-Flohé R. *Four selenoproteins, protein biosynthesis, and Wnt signalling are particularly sensitive to limited selenium intake in mouse colon*. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2009. 53 (12): 1561-1572.
194. Aggarwal, B. *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword*. *Nat Rev Immunol*, 2003. 3 (9): 745-756.
195. Zhang, K., Kaufman R.J. *From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response*. *Nature*, 2008. 454 (7203): 455-462.
196. Xue, X., Piao J.-H., Nakajima A., Sakon-Komazawa S., Kojima Y., Mori K., Yagita H., Okumura K., Harding H., Nakano H. *Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) induces the unfolded protein response (UPR) in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNFalpha*. *J. Biol. Chem.*, 2005. 280 (40): 33917-33925.
197. Kaser, A., Blumberg R. *Endoplasmic reticulum stress and intestinal inflammation*. *Mucosal Immunol.*, 2010. 3 (1): 11-16.
198. Todd, D., Lee A., Glimcher L. *The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity*. *Nature Reviews Immunology*, 2008. 8 (9): 663-674.
199. Raju, J. *Azoxymethane-induced rat aberrant crypt foci: relevance in studying chemoprevention of colon cancer*. *World J. Gastroenterol.*, 2008. 14 (43): 6632-6635.
200. Jen, J., Powell S.M., Papadopoulos N., Smith K.J., Hamilton S.R., Vogelstein B., Kinzler K.W. *Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions*. *Cancer Res.*, 1994. 54 (21): 5523-5526.

201. Roncucci, L., Medline A., Bruce W.R. *Classification of aberrant crypt foci and microadenomas in human colon*. Cancer Epidem. Biomar., 1991. 1 (1): 57-60.
202. Corpet, D.E., Stamp D., Medline A., Minkin S., Archer M.C., Bruce W.R. *Promotion of colonic microadenoma growth in mice and rats fed cooked sugar or cooked casein and fat*. Cancer Res., 1990. 50 (21): 6955-6958.
203. Femia, A.P., Dolara P., Caderni G. *Mucin-depleted foci (MDF) in the colon of rats treated with azoxymethane (AOM) are useful biomarkers for colon carcinogenesis*. Carcinogenesis, 2004. 25 (2): 277-281.
204. Pretlow, T.P., O'Riordan M.A., Somich G.A., Amini S.B., Pretlow T.G. *Aberrant crypts correlate with tumor incidence in F344 rats treated with azoxymethane and phytate*. Carcinogenesis, 1992. 13 (9): 1509-1512.
205. Femia, A.P., Bendinelli B., Giannini A., Salvadori M., Pinzani P., Dolara P., Caderni G. *Mucin-depleted foci have beta-catenin gene mutations, altered expression of its protein, and are dose- and time-dependent in the colon of 1,2-dimethylhydrazine-treated rats*. Int. J. Cancer, 2005. 116 (1): 9-15.
206. Yoshimi, N., Morioka T., Kinjo T., Inamine M., Kaneshiro T., Shimizu T., Suzui M., Yamada Y., Mori H. *Histological and immunohistochemical observations of mucin-depleted foci (MDF) stained with Alcian blue, in rat colon carcinogenesis induced with 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride*. Cancer Sci., 2004. 95 (10): 792-797.
207. Hong, M.Y., Chapkin R.S., Wild C.P., Morris J.S., Wang N., Carroll R.J., Turner N.D., Lupton J.R. *Relationship between DNA adduct levels, repair enzyme, and apoptosis as a function of DNA methylation by azoxymethane*. Cell Growth Differ, 1999. 10 (11): 749-758.
208. Hu, Y., Le Leu R.K., Young G.P. *Absence of acute apoptotic response to genotoxic carcinogens in p53-deficient mice is associated with increased susceptibility to azoxymethane-induced colon tumours*. Int. J. Cancer, 2005. 115 (4): 561-567.
209. Riehl, T.E., George R.J., Sturmoski M.A., May R., Dieckgraefe B., Anant S., Houchen C.W. *Azoxymethane protects intestinal stem cells and reduces crypt epithelial mitosis through a COX-1-dependent mechanism*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. 291 (6): G1062-G1070.
210. Rao, L., Puschner B., Prolla T.A. *Gene expression profiling of low selenium status in the mouse intestine: transcriptional activation of genes linked to DNA damage, cell cycle control and oxidative stress*. J. Nutr., 2001. 131 (12): 3175-3181.
211. Saedi, M.S., Smith C.G., Frampton J., Chambers I., Harrison P.R., Sunde R.A. *Effect of selenium status on mRNA levels for glutathione peroxidase in rat liver*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1988. 153 (2): 855-861.
212. Labunskyy, V., Hatfield D., Gladyshev V. *The Sep15 protein family: roles in disulfide bond formation and quality control in the endoplasmic reticulum*. IUBMB Life, 2007. 59 (1): 1-5.
213. Grundner-Culemann, E., Martin 3rd G., Harney J., Berry M. *Two distinct SECIS structures capable of directing selenocysteine incorporation in eukaryotes*. Rna, 1999. 5 (5): 625-635.
214. Méplan, C., Crosley L.K., Nicol F., Horgan G.W., Mathers J.C., Arthur J.R., Hesketh J.E. *Functional effects of a common single-nucleotide polymorphism (GPX4c718t) in the glutathione peroxidase 4 gene: interaction with sex*. Am. J. Clin. Nutr., 2008. 87 (4): 1019-1027.
215. Labunskyy, V., Yoo M., Hatfield D., Gladyshev V. *Sep15, a thioredoxin-like selenoprotein, is involved in the unfolded protein response and differentially regulated by adaptive and acute ER stresses*. Biochemistry, 2009. 48 (35): 8458-8465.
216. Frisch, S., Francis H. *Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis*. J. Cell Biol., 1994. 124 (4): 619-626.
217. Grossmann, J., Walther K., Artinger M., Kiessling S., Scholmerich J. *Apoptotic Signaling during Initiation of Detachment-induced Apoptosis ("Anoikis") of Primary Human Intestinal Epithelial Cells*. Cell Growth Differ, 2001. 12 (3): 147-155.
218. Sies, H. *Oxidative stress: from basic research to clinical application*. Am. J. Med., 1991. 91 (3C): 31S-38S.
219. Henderson, L.M., Chappell J.B. *Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation?* Eur. J. Biochem., 1993. 217 (3): 973-980.

220. Crow, J.P. *Dichlorodihydrofluorescein and Dihydrorhodamine 123 Are Sensitive Indicators of Peroxynitrite in Vitro: Implications for Intracellular Measurement of Reactive Nitrogen and Oxygen Species*. Nitric Oxide, 1997. 1 (2): 145-157.
221. Trachootham, D., Lu W., Ogasawara M., Nilsa R., Huang P. *Redox regulation of cell survival*. Antioxid. Redox. Signaling, 2008. 10 (8): 1343-1374.
222. Lambert, A., Brand M. *Reactive oxygen species production by mitochondria*. Methods Mol. Biol., 2009. 554 165-181.
223. Lander, H.M. *An essential role for free radicals and derived species in signal transduction*. FASEB J., 1997. 11 (2): 118-124.
224. Ames, B. *Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases*. Science, 1983. 221 (4617): 1256-1264.
225. Aw, T.Y. *Molecular and cellular responses to oxidative stress and changes in oxidation-reduction imbalance in the intestine*. Am. J. Clin. Nutr., 1999. 70 (4): 557-565.
226. Fujii, J., Ikeda Y. *Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein*. Redox Rep., 2002. 7 (3): 123-130.
227. Wood, Z., Poole L., Karplus P. *Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling*. Science (New York, NY), 2003. 300 (5619): 650-653.
228. Holmgren, A., Lu J. *Thioredoxin and thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2010. 396 (1): 120-124.
229. Fernandes, A.P., Holmgren A. *Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system*. Antioxid. Redox. Signaling, 2004. 6 (1): 63-74.
230. Kalyanaraman, B., Darley-Usmar V., Davies K.J.A., Dennery P.A., Forman H.J., Grisham M.B., Mann G.E., Moore K., Roberts II L.J., Ischiropoulos H. *Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations*. Free Radical Biol. Med., 2012. 52 (1): 1-6.
231. Choucroun, P., Gillet D., Dorange G., Sawicki B., Dewitte J.D. *Comet assay and early apoptosis*. Mutat. Res., 2001. 478 (1-2): 89-96.
232. Stone, J., Yang S. *Hydrogen peroxide: a signaling messenger*. Antioxid. Redox. Signaling, 2006. 8 (3-4): 243-270.
233. Brigelius-Flohé, R., Flohé L. *Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors*. Antioxid. Redox. Signaling, 2011. 15 (8): 2335-2381.
234. Funato, Y., Michiue T., Asashima M., Miki H. *The thioredoxin-related redox-regulating protein nucleoredoxin inhibits Wnt-beta-catenin signalling through dishevelled*. Nat. Cell Biol., 2006. 8 (5): 501-508.
235. Suh, Y.-A., Arnold R.S., Lassegue B., Shi J., Xu X., Sorescu D., Chung A.B., Griendling K.K., Lambeth J.D. *Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1*. Nature, 1999. 401 (6748): 79-82.
236. Coant, N., Ben Mkaddem S., Pedruzzi E., Guichard C., Treton X., Ducroc R., Freund J.-N., Cazals-Hatem D., Bouhnik Y., Woerther P.-L., Skurnik D., Grodet A., Fay M., Biard D., Lesuffleur T., Deffert C., Moreau R., Groyer A., Krause K.-H., Daniel F., Ogier-Denis E. *NADPH Oxidase 1 Modulates WNT and NOTCH1 Signaling To Control the Fate of Proliferative Progenitor Cells in the Colon*. Mol. Cell. Biol., 2010. 30 (11): 2636-2650.
237. Circu, M.L., Aw T.Y. *Redox biology of the intestine*. Free Radical Res., 2011. 45 (11-12): 1245-1266.
238. Circu, M.L., Aw T.Y. *Intestinal redox biology and oxidative stress*. Semin. Cell Dev. Biol., 2012. 23 729-737.
239. Slater, A.F.G., Stefan C., Nobel I., Van Den Dobbelen D.J., Orrenius S. *Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis*. Toxicol. Lett., 1995. 82-83 (0): 149-153.
240. Chandra, J., Samali A., Orrenius S. *Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress*. Free Radical Biol. Med., 2000. 29 (3-4): 323-333.
241. Fleury, C., Mignotte B., Vayssière J.-L. *Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling*. Biochimie, 2002. 84 (2-3): 131-141.

242. Collart, M.A., Baeuerle P., Vassalli P. *Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B*. Mol. Cell. Biol., 1990. 10 (4): 1498-1506.
243. Leitman, D.C., Ribeiro R.C., Mackow E.R., Baxter J.D., West B.L. *Identification of a tumor necrosis factor-responsive element in the tumor necrosis factor alpha gene*. J. Biol. Chem., 1991. 266 (15): 9343-9346.
244. Micheau, O., Tschopp J. *Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes*. Cell, 2003. 114 (2): 181-190.
245. Hehlgans, T., Pfeffer K. *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games*. Immunology, 2005. 115 (1): 1-20.
246. Mizoguchi, E., Mizoguchi A., Takedatsu H., Cario E., de Jong Y., Ooi C., Xavier R., Terhorst C., Podolsky D., Bhan A. *Role of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in colonic epithelial hyperplasia and chronic intestinal inflammation in mice*. Gastroenterology, 2002. 122 (1): 134-144.
247. Bhan, A., Mizoguchi E., Smith R., Mizoguchi A. *Colitis in transgenic and knockout animals as models of human inflammatory bowel disease*. Immunol. Rev., 1999. 169 195-207.
248. Mizoguchi, E., Xavier R.J., Reinecker H.C., Uchino H., Bhan A.K., Podolsky D.K., Mizoguchi A. *Colonic epithelial functional phenotype varies with type and phase of experimental colitis*. Gastroenterology, 2003. 125 (1): 148-161.
249. Davidson, N.J., Hudak S.A., Lesley R.E., Menon S., Leach M.W., Rennick D.M. *IL-12, But Not IFN-gamma, Plays a Major Role in Sustaining the Chronic Phase of Colitis in IL-10-Deficient Mice*. J. Immunol., 1998. 161 (6): 3143-3149.
250. Heazlewood, C.K., Cook M.C., Eri R., Price G.R., Tauro S.B., Taupin D., Thornton D.J., Png C.W., Crockford T.L., Cornall R.J., Adams R., Kato M., Nelms K.A., Hong N.A., Florin T.H.J., Goodnow C.C., McGuckin M.A. *Aberrant Mucin Assembly in Mice Causes Endoplasmic Reticulum Stress and Spontaneous Inflammation Resembling Ulcerative Colitis*. PLoS Med, 2008. 5 (3): 0440-0460.
251. Higgins, L.M., Frankel G., Connerton I., Goncalves N.S., Dougan G., MacDonald T.T. *Role of Bacterial Intimin in Colonic Hyperplasia and Inflammation*. Science, 1999. 285 (5427): 588-591.
252. Williams, K., Fuller C., Dieleman L., DaCosta C., Haldeman K., Sartor R., Lund P. *Enhanced survival and mucosal repair after dextran sodium sulfate-induced colitis in transgenic mice that overexpress growth hormone*. Gastroenterology, 2001. 120 (4): 925-937.
253. Vetuschi, A., Latella G., Sferra R., Caprilli R., Gaudio E. *Increased proliferation and apoptosis of colonic epithelial cells in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats*. Dig. Dis. Sci., 2002. 47 (7): 1447-1457.
254. Franklin, W.A., McDonald G.B., Stein H.O., Gatter K.C., Jewell D.P., Clarke L.C., Mason D.Y. *Immunohistologic demonstration of abnormal colonic crypt cell kinetics in ulcerative colitis*. Hum. Pathol., 1985. 16 (11): 1129-1132.
255. Keshav, S., Lawson L., Chung L., Stein M., Perry V., Gordon S. *Tumor necrosis factor mRNA localized to Paneth cells of normal murine intestinal epithelium by in situ hybridization*. J. Exp. Med., 1990. 171 (1): 327-332.
256. Tan, X., Hsueh W., Gonzalez-Crussi F. *Cellular localization of tumor necrosis factor (TNF)-alpha transcripts in normal bowel and in necrotizing enterocolitis. TNF gene expression by Paneth cells, intestinal eosinophils, and macrophages*. Am. J. Pathol., 1993. 142 (6): 1858-1865.
257. Kontoyiannis, D., Pasparakis M., Pizarro T.T., Cominelli F., Kollias G. *Impaired On/Off Regulation of TNF Biosynthesis in Mice Lacking TNF AU-Rich Elements: Implications for Joint and Gut-Associated Immunopathologies*. Immunity, 1999. 10 (3): 387-398.
258. Guma, M., Stepniak D., Shaked H., Spehlmann M.E., Shenouda S., Cheroutre H., Vicente-Suarez I., Eckmann L., Kagnoff M.F., Karin M. *Constitutive intestinal NF-kappaB does not trigger destructive inflammation unless accompanied by MAPK activation*. J. Exp. Med., 2011. 208 (9): 1889-1900.
259. Chen, L.-W., Egan L., Li Z.-W., Greten F.R., Kagnoff M.F., Karin M. *The two faces of IKK and NF-kappaB inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion*. Nature, 2003. 425 (7000): 575-581.

260. Brinkman, B., Telliez J., Schievella A., Lin L., Goldfeld A. *Engagement of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 leads to ATF-2- and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent TNF-alpha gene expression.* J. Biol. Chem., 1999. 274 (43): 30882-30886.
261. Hausmann, M. *How bacteria-induced apoptosis of intestinal epithelial cells contributes to mucosal inflammation.* Int. J. Inflam., 2010. 2010 doi:10.4061/2010/574568.
262. Esworthy, R., Binder S., Doroshov J., Chu F. *Microflora trigger colitis in mice deficient in selenium-dependent glutathione peroxidase and induce Gpx2 gene expression.* J. Biol. Chem., 2003. 384 (4): 597-607.
263. Hirose, Y., Yoshimi N., Makita H., Hara A., Tanaka T., Mori H. *Early alterations of apoptosis and cell proliferation in azoxymethane-initiated rat colonic epithelium.* Jpn. J. Cancer Res., 1996. 87 (6): 575-582.
264. Dubois, R.N., Abramson S.B., Crofford L., Gupta R.A., Simon L.S., A. Van De Putte L.B., Lipsky P.E. *Cyclooxygenase in biology and disease.* The FASEB Journal 1998 12 (12): 1063-1073
265. Kulmacz, R.J. *Regulation of cyclooxygenase catalysis by hydroperoxides.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 2005. 338 (1): 25-33.
266. Nakao, S., Ogtata Y., Shimizu E., Yamazaki M., Furuyama S., Sugiyama H. *Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced prostaglandin E2 release is mediated by the activation of cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription via NFkappaB in human gingival fibroblasts.* Mol. Cell. Biochem., 2002. 238 (1-2): 11-18.
267. Pettus, B., Bielawski J., Porcelli A., Reames D., Johnson K., Morrow J., Chalfant C., Obeid L., Hannun Y. *The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway mediates COX-2 induction and PGE2 production in response to TNF-alpha.* FASEB J., 2003. 17 (11): 1411-1421.
268. Rath, E., Haller D. *Unfolded Protein Responses in the Intestinal Epithelium: Sensors for the Microbial and Metabolic Environment.* J. Clin. Gastroenterol., 2012. 46 S3-S5.
269. Harding, H., Novoa I., Zhang Y., Zeng H., Wek R., Schapira M., Ron D. *Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells.* Mol. Cell, 2000. 6 (5): 1099-1108.
270. Harding, H., Zhang Y., Zeng H., Novoa I., Lu P., Calton M., Sadri N., Yun C., Popko B., Paules R. *An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress.* Mol. Cell, 2003. 11 (3): 619-633.
271. Szegezdi, E., Fitzgerald U., Samali A. *Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far.* Ann. N.Y. Acad. Sci., 2003. 1010 186-194.
272. Oyadomari, S., Mori M. *Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress.* Cell Death Differ., 2004. 11 (4): 381-389.
273. Kim, I., Xu W., Reed J.C. *Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities.* Nat. Rev. Drug Discovery, 2008. 7 (12): 1013-1030.
274. Hollander, M.C., Zhan Q., Bae I., Fornace Jr A.J. *Mammalian GADD34, an apoptosis-and DNA damage-inducible gene.* J. Biol. Chem., 1997. 272 (21): 13731-13737.
275. Hollander, M.C., Sheikh M.S., Yu K., Zhan Q., Iglesias M., Woodworth C., Fornace A.J. *Activation of Gadd34 by diverse apoptotic signals and suppression of its growth inhibitory effects by apoptotic inhibitors.* Int. J. Cancer, 2001. 96 (1): 22-31.
276. Marciniak, S.J., Ron D. *Endoplasmic reticulum stress signaling in disease.* Physiol. Rev., 2006. 86 (4): 1133-1149.
277. Shkoda, A., Ruiz P.A., Daniel H., Kim S.C., Rogler G., Sartor R.B., Haller D. *Interleukin-10 Blocked Endoplasmic Reticulum Stress in Intestinal Epithelial Cells: Impact on Chronic Inflammation.* Gastroenterology, 2007. 132 (1): 190-207.
278. Jiang, H.-Y., Wek S.A., McGrath B.C., Scheuner D., Kaufman R.J., Cavener D.R., Wek R.C. *Phosphorylation of the alpha Subunit of Eukaryotic Initiation Factor 2 Is Required for Activation of NF-kappaB in Response to Diverse Cellular Stresses.* Mol. Cell. Biol., 2003. 23 (16): 5651-5663.
279. Deng, J., Lu P., Zhang Y., Scheuner D., Kaufman R., Sonenberg N., Harding H., Ron D. *Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2.* Mol. Cell. Biol., 2004. 24 (23): 10161-10168.

280. Takada, Y., Ichikawa H., Pataer A., Swisher S., Aggarwal B. *Genetic deletion of PKR abrogates TNF-induced activation of I κ B kinase, JNK, Akt and cell proliferation but potentiates p44/p42 MAPK and p38 MAPK activation.* *Oncogene*, 2007. 26 (8): 1201-1212.
281. Hu, P., Han Z., Couvillon A.D., Kaufman R.J., Exton J.H. *Autocrine Tumor Necrosis Factor Alpha Links Endoplasmic Reticulum Stress to the Membrane Death Receptor Pathway through IRE1 α -Mediated NF- κ B Activation and Down-Regulation of TRAF2 Expression.* *Mol. Cell. Biol.*, 2006. 26 (8): 3071-3084.
282. Pahl, H.L., Baeuerle P.A. *Activation of NF- κ B by ER stress requires both Ca²⁺ and reactive oxygen intermediates as messengers.* *FEBS Lett.*, 1996. 392 (2): 129-136.
283. Rath, E., Haller D. *Inflammation and cellular stress: a mechanistic link between immune-mediated and metabolically driven pathologies.* *Eur. J. Nutr.*, 2011. 50 (4): 219-233.
284. Gao, Q., Esworthy R., Kim B., Synold T., Smith D., Chu F. *Atherogenic diets exacerbate colitis in mice deficient in glutathione peroxidase.* *Inflamm. bowel dis.*, 2010. 16 (12): 2043-2054.
285. Mounir, Z., Krishnamoorthy J.L., Wang S., Papadopoulou B., Campbell S., Muller W.J., Hatzoglou M., Koromilas A.E. *Akt Determines Cell Fate Through Inhibition of the PERK-eIF2 { α } Phosphorylation Pathway.* *Sci. Signal.*, 2011. 4 (192): ra62.
286. Oh-Hashi, K., Maruyama W., Isobe K. *Peroxynitrite induces GADD34, 45, and 153 VIA p38 MAPK in human neuroblastoma SH-SY5Y cells.* *Free Radical Biol. Med.*, 2001. 30 (2): 213-221.
287. Zhou, D., Palam L.R., Jiang L., Narasimhan J., Staschke K.A., Wek R.C. *Phosphorylation of eIF2 directs ATF5 translational control in response to diverse stress conditions.* *J. Biol. Chem.*, 2008. 283 (11): 7064-7073.
288. Dang Do, A., Kimball S., Cavener D., Jefferson L. *eIF2 α kinases GCN2 and PERK modulate transcription and translation of distinct sets of mRNAs in mouse liver.* *Physiol. Genomics*, 2009. 38 (3): 328-341.
289. Osowski, C.M., Hara T., O'Sullivan-Murphy B., Kanekura K., Lu S., Hara M., Ishigaki S., Zhu L.J., Hayashi E., Hui S.T. *Thioredoxin-Interacting Protein Mediates ER Stress-Induced beta Cell Death through Initiation of the Inflammasome.* *Cell Metab.*, 2012. 16 (2): 265-273.
290. Novoa, I., Zeng H., Harding H.P., Ron D. *Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 α .* *J. Cell Biol.*, 2001. 153 (5): 1011-1022.
291. Tu, B., Weissman J. *The FAD- and O₂-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum.* *Mol. Cell*, 2002. 10 (5): 983-994.
292. Gross, E., Sevier C., Heldman N., Vitu E., Bentzur M., Kaiser C., Thorpe C., Fass D. *Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p.* *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2006. 103 (2): 299-304.
293. Tu, B.P., Weissman J.S. *Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences.* *J. Cell Biol.*, 2004. 164 (3): 341-346.
294. Chakravarthi, S., Jessop C.E., Bulleid N.J. *The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress.* *EMBO Rep.*, 2006. 7 (3): 271-275.
295. Lupton, J.R., Trumbo P.R. *Lipids, Sterols and Their Metabolites.* In: M. E. Shils, M. Shike, A. C. Ross, B. Caballero, and R. J. Cousins (eds.), *Modern Nutrition in Health and Disease*, 10 edition, pp. 92-123. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
296. Kansanen, E., Jyrkkänen H., Levonen A. *Activation of stress signaling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids.* *Free Radical Biol. Med.*, 2012. 52 (6): 973-982.
297. West, J., Marnett L. *Alterations in gene expression induced by the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal.* *Chem. Res. Toxicol.*, 2005. 18 (11): 1642-1653.
298. Schulze-Osthoff, K., Bakker A.C., Vanhaesebroeck B., Beyaert R., Jacob W.A., Fiers W. *Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation.* *J. Biol. Chem.*, 1992. 267 (8): 5317-5323.
299. Tolando, R., Jovanovic A., Brigelius-Flohé R., Ursini F., Maiorino M. *Reactive oxygen species and proinflammatory cytokine signaling in endothelial cells: effect of selenium supplementation.* *Free Radical Biol. Med.*, 2000. 28 (6): 979-986.

300. Maehira, F., Miyagi I., Eguchi Y. *Selenium regulates transcription factor NF-kappaB activation during the acute phase reaction*. Clinica Chimica Acta, 2003. 334 (1-2): 163-171.
301. Kretz-Remy, C., Mehlen P., Mirault M.E., Arrigo A.P. *Inhibition of I kappa B-alpha phosphorylation and degradation and subsequent NF-kappa B activation by glutathione peroxidase overexpression*. J. Cell Biol., 1996. 133 (5): 1083-1093.
302. Li, S., Yan T., Yang J.-Q., Oberley T.D., Oberley L.W. *The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase*. Cancer Res., 2000. 60 (14): 3927-3939.
303. Murphy, M.P., Packer M.A., Scarlett J.L., Martin S.W. *Peroxyntirite: A Biologically Significant Oxidant*. Gen. Pharmacol. -Vasc. S., 1998. 31 (2): 179-186.
304. Klotz, L.-O., Sies H. *Defenses against peroxyntirite: selenocompounds and flavonoids*. Toxicol. Lett., 2003. 140-141 125-132.
305. Chiu, S.-T., Hsieh F.-J., Chen S.-W., Chen C.-L., Shu H.-F., Li H. *Clinicopathologic Correlation of Up-regulated Genes Identified Using cDNA Microarray and Real-time Reverse Transcription-PCR in Human Colorectal Cancer*. Cancer Epidem. Biomar., 2005. 14 (2): 437-443.
306. Lin, Y.M., Furukawa Y., Tsunoda T., Yue C.T., Yang K.C., Nakamura Y. *Molecular diagnosis of colorectal tumors by expression profiles of 50 genes expressed differentially in adenomas and carcinomas*. Oncogene, 2002. 21 (26): 4120-4128.
307. Al-Taie, O.H., Uceyler N., Eubner U., Jakob F., Mörk H., Scheurlen M., Brigelius-Flohé R., Schöttker K., Abel J., Thalheimer A., Katzenberger T., Illert B., Melcher R., Köhrle J. *Expression profiling and genetic alterations of the selenoproteins GI-GPx and SePP in colorectal carcinogenesis*. Nutr. Cancer, 2004. 48 (1): 6-14.
308. Stevens, R.G., Swede H., Rosenberg D.W. *Epidemiology of colonic aberrant crypt foci: Review and analysis of existing studies*. Cancer Lett., 2007. 252 (2): 171-183.
309. Femia, A.P., Giannini A., Fazi M., Tarquini E., Salvadori M., Roncucci L., Tonelli F., Dolara P., Caderni G. *Identification of Mucin Depleted Foci in the Human Colon*. Cancer Prev. Res., 2008. 1 (7): 562-567.
310. Rosenberg, D.W., Giardina C., Tanaka T. *Mouse models for the study of colon carcinogenesis*. Carcinogenesis, 2009. 30 (2): 183-196.
311. Fiala, E. *Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogens 1, 2-dimethylhydrazine and azoxymethane*. Cancer, 1977. 40 (5 Suppl): 2436-2445.
312. Yu, J. *PUMA Kills Stem Cells to Stall Cancer?* Mol. cell. pharmacol., 2009. 1 (3): 112-118.
313. Evan, G.I., Vousden K.H. *Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer*. Nature, 2001. 411 (6835): 342-348.
314. Duckworth, C.A., Pritchard D.M. *Suppression of apoptosis, crypt hyperplasia, and altered differentiation in the colonic epithelia of bak-null mice*. Gastroenterology, 2009. 136 (3): 943-952.
315. Qiu, W., Carson-Walter E.B., Kuan S.F., Zhang L., Yu J. *PUMA suppresses intestinal tumorigenesis in mice*. Cancer Res., 2009. 69 (12): 4999-5006.
316. Schwitalla, S., Fingerle A.A., Cammareri P., Nebelsiek T., Göktuna S.I., Ziegler P.K., Canli O., Heijmans J., Huels D.J., Moreaux G., Rupec R.A., Gerhard M., Schmid R., Barker N., Clevers H., Lang R., Neumann J., Kirchner T., Taketo M.M., van den Brink G.R., Sansom O.J., Arkan M.C., Greten F.R. *Intestinal Tumorigenesis Initiated by Dedifferentiation and Acquisition of Stem-Cell-like Properties*. Cell, 2013. 152 (1-2): 25-38.
317. Van Houdt, W.J., Emmink B.L., Pham T.V., Piersma S.R., Verheem A., Vries R.G., Fratantoni S.A., Pronk A., Clevers H., Borel Rinkes I.H.M., Jimenez C.R., Kranenburg O. *Comparative Proteomics of Colon Cancer Stem Cells and Differentiated Tumor Cells Identifies BIRC6 as a Potential Therapeutic Target*. Molecular & Cellular Proteomics, 2011. 10 (12): Epub doi:10.1074/mcp.M1111.011353.
318. Toyokuni, S., Okamoto K., Yodoi J., Hiai H. *Persistent oxidative stress in cancer*. FEBS Lett., 1995. 358 (1): 1-3.
319. Skrzydlewska, E., Stankiewicz A., Sulkowska M., Sulkowski S., Kasacka I. *Antioxidant status and lipid peroxidation in colorectal cancer*. J. Toxicol. Env. Heal. A, 2001. 64 (3): 213-222.

320. Dreher, D., Junod A.F. *Role of oxygen free radicals in cancer development*. Eur. J. Cancer, 1996. 32 (1): 30-38.
321. Pan, J., Hong M., Ren J. *Reactive oxygen species: a double-edged sword in oncogenesis*. World J. Gastroenterol., 2009. 15 (14): 1702-1707.
322. Kong, Q., Beel J.A., Lillehei K.O. *A threshold concept for cancer therapy*. Med. Hypotheses, 2000. 55 (1): 29-35.
323. Hail Jr, N., Cortes M., Drake E., Spallholz J. *Cancer chemoprevention: a radical perspective*. Free Radical Biol. Med., 2008. 45 (2): 97-110.
324. Trachootham, D., Alexandre J., Huang P. *Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?* Nature reviews. Drug discovery, 2009. 8 (7): 579-591.
325. Carlson, B.A., Yoo M.-H., Tobe R., Mueller C., Naranjo-Suarez S., Hoffmann V.J., Gladyshev V.N., Hatfield D.L. *Thioredoxin reductase 1 protects against chemically induced hepatocarcinogenesis via control of cellular redox homeostasis*. Carcinogenesis, 2012. 33 (9): 1806-1813.
326. Yoo, M.-H., Xu X.-M., Carlson B.A., Gladyshev V.N., Hatfield D.L. *Thioredoxin Reductase 1 Deficiency Reverses Tumor Phenotype and Tumorigenicity of Lung Carcinoma Cells*. J. Biol. Chem., 2006. 281 (19): 13005-13008.
327. Yoo, M.-H., Xu X.-M., Carlson B.A., Patterson A.D., Gladyshev V.N., Hatfield D.L. *Targeting Thioredoxin Reductase 1 Reduction in Cancer Cells Inhibits Self-Sufficient Growth and DNA Replication*. PLoS ONE, 2007. 2 (10): e1112 EP.
328. Liu, J., Hinkhouse M.M., Sun W., Weydert C.J., Ritchie J.M., Oberley L.W., Cullen J.J. *Redox regulation of pancreatic cancer cell growth: role of glutathione peroxidase in the suppression of the malignant phenotype*. Hum. Gene Ther., 2004. 15 (3): 239-250.
329. Lu, Y.P., Lou Y.R., Yen P., Newmark H.L., Mirochnitchenko O.I., Inouye M., Huang M.T. *Enhanced skin carcinogenesis in transgenic mice with high expression of glutathione peroxidase or both glutathione peroxidase and superoxide dismutase*. Cancer Res., 1997. 57 (8): 1468-1474.
330. Grivennikov, S.I., Greten F.R., Karin M. *Immunity, inflammation, and cancer*. Cell, 2010. 140 (6): 883-899.
331. Bi, M., Naczki C., Koritzinsky M., Fels D., Blais J., Hu N., Harding H., Novoa I., Varia M., Raleigh J. *ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth*. EMBO J., 2005. 24 (19): 3470-3481.
332. Brunelli, C., Amici C., Angelini M., Fracassi C., Belardo G., Santoro M. *The non-steroidal anti-inflammatory drug indomethacin activates the eIF2alpha kinase PKR, causing a translational block in human colorectal cancer cells*. Biochem. J., 2012. 443 (2): 379-386.
333. Mounir, Z., Krishnamoorthy J.L., Robertson G.P., Scheuner D., Kaufman R.J., Georgescu M.-M., Koromilas A.E. *Tumor Suppression by PTEN Requires the Activation of the PKR-eIF2 {alpha} Phosphorylation Pathway*. Sci. Signal., 2009. 2 (102): ra85.
334. Chen, L., Aktas B.H., Wang Y., He X., Sahoo R., Zhang N., Denoyelle S., Kabha E., Yang H., Freedman R. *Tumor suppression by small molecule inhibitors of translation initiation*. Oncotarget, 2012. 3 (8): 869-881.
335. Kundu, J.K., Surh Y.-J. *Emerging avenues linking inflammation and cancer*. Free Radical Biol. Med., 2012. 52 (9): 2013-2037.
336. Terzic, J., Grivennikov S., Karin E., Karin M. *Inflammation and Colon Cancer*. Gastroenterology, 2010. 138 (6): 2101-2114.e2105.
337. Cho, S.J., Kim J.S., Kim J.M., Lee J.Y., Jung H.C., Song I.S. *Simvastatin induces apoptosis in human colon cancer cells and in tumor xenografts, and attenuates colitis-associated colon cancer in mice*. Int. J. Cancer, 2008. 123 (4): 951-957.
338. Backlund, M.G., Mann J.R., DuBois R.N. *Mechanisms for the Prevention of Gastrointestinal Cancer: The Role of Prostaglandin E*. Oncology, 2005. 69 (Suppl. 1): 28-32.
339. Wang, D., DuBois R. *Pro-inflammatory prostaglandins and progression of colorectal cancer*. Cancer Lett., 2008. 267 (2): 197-203.
340. Balkwill, F. *Tumour necrosis factor and cancer*. Nat. Rev. Cancer, 2009. 9 (5): 361-371.

341. Zins, K., Abraham D., Sioud M., Aharinejad S. *Colon Cancer Cell-Derived Tumor Necrosis Factor-alpha Mediates the Tumor Growth-Promoting Response in Macrophages by Up-regulating the Colony-Stimulating Factor-1 Pathway*. *Cancer Res.*, 2007. 67 (3): 1038-1045.
342. Oguma, K., Oshima H., Aoki M., Uchio R., Naka K., Nakamura S., Hirao A., Saya H., Taketo M., Oshima M. *Activated macrophages promote Wnt signalling through tumour necrosis factor-alpha in gastric tumour cells*. *EMBO J.*, 2008. 27 (12): 1671-1681.
343. Dandona, P., Aljada A., Bandyopadhyay A. *Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes*. *Trends Immunol.*, 2004. 25 (1): 4-7.
344. Flores, M.B.S., Rocha G.Z., Damas-Souza D.M., Osório-Costa F., Dias M.M., Ropelle E.R., Camargo J.A., de Carvalho R.B., Carvalho H.s.F., Saad M.J.A., Carvalheira J.B.C. *Obesity-Induced Increase in Tumor Necrosis Factor-alpha Leads to Development of Colon Cancer in Mice*. *Gastroenterology*, 2012. 143 (3): 741-753.e744.
345. Ishikawa, T.O., Herschman H.R. *Tumor formation in a mouse model of colitis-associated colon cancer does not require COX-1 or COX-2 expression*. *Carcinogenesis*, 2010. 31 (4): 729-736.
346. Igney, F.H., Krammer P.H. *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis*. *Nat. Rev. Cancer*, 2002. 2 (4): 277-288.
347. Um, H., Orenstein J., Wahl S. *Fas mediates apoptosis in human monocytes by a reactive oxygen intermediate dependent pathway*. *J. Immunol.*, 1996. 156 (9): 3469-3477.
348. Bauer, M.K.A., Vogt M., Los M., Siegel J., Wesselborg S., Schulze-Osthoff K. *Role of Reactive Oxygen Intermediates in Activation*. *J. Biol. Chem.*, 1998. 273 (14): 8048-8055.
349. Kwon, D., Choi C., Lee J., Kim K., Kim J., Kim S., Choi I. *Hydrogen peroxide triggers the expression of Fas/FasL in astrocytoma cell lines and augments apoptosis*. *J. Neuroimmunol.*, 2001. 113 (1): 1-9.
350. Gouazé, V., Andrieu-Abadie N., Cuvillier O., Malagarie-Cazenave S., Frisach M.-F., Mirault M.-E., Levade T. *Glutathione peroxidase-1 protects from CD95-induced apoptosis*. *J. Biol. Chem.*, 2002. 277 (45): 42867-42874.
351. Klintrup, K., Mäkinen J.M., Kauppila S., Väre P.O., Melkko J., Tuominen H., Tuppurainen K., Mäkelä J., Karttunen T.J., Mäkinen M.J. *Inflammation and prognosis in colorectal cancer*. *Eur. J. Cancer*, 2005. 41 (17): 2645-2654.
352. Hao, N.-B., Lü M.-H., Fan Y.-H., Cao Y.-L., Zhang Z.-R., Yang S.-M. *Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors*. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012. 2012 Epub doi:10.1155/2012/948098.
353. Pence, B., Buddingh F. *Effect of dietary selenium deficiency on incidence and size of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumors in rats*. *J. Nutr.*, 1985. 115 (9): 1196-1202.
354. Reddy, B., Hirose Y., Lubet R., Steele V., Kelloff G., Rao C. *Lack of chemopreventive efficacy of DL-selenomethionine in colon carcinogenesis*. *Int. J. Mol. Med.*, 2000. 5 (4): 327-330.
355. Ip, C., Thompson H., Zhu Z., Ganther H. *In vitro and in vivo studies of methylseleninic acid: evidence that a monomethylated selenium metabolite is critical for cancer chemoprevention*. *Cancer Res.*, 2000. 60 (11): 2882-2886.
356. Zhuo, P., Diamond A.M. *Molecular mechanisms by which selenoproteins affect cancer risk and progression*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009. 1790 (11): 1546-1554.
357. Steinbrenner, H., Sies H. *Protection against reactive oxygen species by selenoproteins*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 2009. 1790 (11): 1478-1485.
358. Lau, A., Villeneuve N.F., Sun Z., Wong P.K., Zhang D.D. *Dual roles of Nrf2 in cancer*. *Pharmacol. Res.*, 2008. 58 (5): 262-270.
359. Qiao, Y.-L., Dawsey S.M., Kamangar F., Fan J.-H., Abnet C.C., Sun X.-D., Johnson L.L., Gail M.H., Dong Z.-W., Yu B., Mark S.D., Taylor P.R. *Total and Cancer Mortality After Supplementation With Vitamins and Minerals: Follow-up of the Linxian General Population Nutrition Intervention Trial*. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2009. 101 (7): 507-518.
360. Gutscher, M., Pauleau A.-L., Marty L., Brach T., Wabnitz G.H., Samstag Y., Meyer A.J., Dick T.P. *Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential*. *Nat. Methods*, 2008. 5 (6): 553-559.

361. Xu, X., von Löhneysen K., Soldau K., Noack D., Vu A., Friedman J.S. *A novel approach for in vivo measurement of mouse red cell redox status*. *Blood*, 2011. 118 (13): 3694-3697.
362. Malinouski, M., Zhou Y., Belousov V.V., Hatfield D.L., Gladyshev V.N. *Hydrogen Peroxide Probes Directed to Different Cellular Compartments*. *PLoS ONE*, 2011. 6 (1): e14564 EP.

7 Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Allen voran danke ich Prof. Dr. Regina Brigelius-Flohé, die mir diese Promotion ermöglicht und mich in allen Phasen unterstützt hat.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Anna Kipp und Stefanie Deubel, mit denen ich sehr gerne zusammengearbeitet habe. Anna Kipp danke ich für die engagierte Betreuung, die vielen hilfreichen Diskussionen und Ratschläge sowie natürlich für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Stefanie Deubel danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung, ihre stetige Hilfsbereitschaft in den praktischen Fragen des Laboralltags und die vielen guten Ideen, die mir geholfen haben viele experimentelle Hürden zu überwinden.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei Dr. Simone Florian bedanken, die sich viel Zeit genommen hat, um mich in die Grundlagen der Histologie und Immunhistochemie einzuarbeiten und mir immer mit Rat und konstruktiven Diskussionen zur Seite gestanden hat. Auch danke ich Elisabeth Meyer für die gute Zusammenarbeit und Hilfe mit der Histologie und Immunhistochemie.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Diplomandin Ursula Bachlechner bedanken, deren Ergebnisse teilweise in diese Arbeit eingeflossen sind. Ich möchte allen Doktoranden der Abteilung „Biochemie der Mikronährstoffe“, Doris Lippmann, Carsten Lehmann, Martin Bertz und Franziska Hiller für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die hilfreichen Diskussionen danken. Weiterhin danke ich Karolin Besselt, Stefanie Pommer und Elvira Krohn für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor sowie Elke Thom und dem ganzen MRL-Team für die Unterstützung bei den Tierexperimenten. Hier gilt mein besonderer Dank Swetlana Kohse und Astrid Wagner-Hopf, die mir bei der Betreuung meiner Mäuse geholfen haben. Martin Osterhoff danke ich für die Hilfe bei den SPSS-Analysen.

Ich danke den Gutachtern für die Übernahme der Gutachtertätigkeit.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Anna Kipp, Martin Bertz, Doris Müller und André Wittkopf.

Meinem Freund möchte ich nicht nur für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die Bändigung meines Computers danken, sondern vor allem dafür, dass er immer für mich da war und mir viel Kraft gegeben hat.

Schließlich möchte ich noch meiner Großmutter Helga Müller und meiner Mutter Doris Müller für ihre ständige Unterstützung und Motivation danken. Ich möchte diese Arbeit meinem Großvater Kurt Müller widmen, der die Abgabe leider nicht mehr erleben kann.

Potsdam, im März 2013

8 Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen, als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet. Die von mir vorgelegte Dissertation wurde bisher nicht im In- oder Ausland in dieser oder ähnlicher Form in einem anderen Promotionsverfahren vorgelegt.

Potsdam, 2. April 2013

Ort, Datum

Unterschrift