

Aus dem Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. J. Pallauf

**Untersuchungen zum Einfluss von Selen und Vitamin E auf
differentielle Genexpression, antioxidative Schutzmechanismen
und Zellschädigungen bei der Ratte**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. oec. troph.)
am Fachbereich Agrarwissenschaften,
Ökotoxikologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Alexandra Fischer
aus Solms

Gießen 2002

Dissertation am Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökötrophologie und
Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen

- Dekan: Prof. Dr. P. M. Schmitz -

Vorsitzender: Prof. Dr. H. Boland
1. Gutachter: Prof. Dr. J. Pallauf
2. Gutachterin: Prof. Dr. K. Becker-Brandenburg
3. Gutachter: Prof. Dr. E. Weigand
Prüferin: Prof. Dr. I. Bitsch

Tag der mündlichen Prüfung: 01. August 2002

Wissenschaft in Dissertationen

Band 691

**Untersuchungen zum Einfluss von Selen
und Vitamin E auf differentielle Genexpression,
antioxidative Schutzmechanismen und
Zellschädigungen bei der Ratte**

von

Alexandra Fischer



Görich & Weiershäuser
Druckerei und Verlag
Marburg
2002

Verlag Görich & Weiershäuser, Marburg/L.

Zugl.: Gießen, Diss. 2002

Dieses Werk ist insgesamt wie auch in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt. Kein Teil dieses Werkes darf außerhalb der engen Grenzen des Urheberrechts ohne schriftliche Zustimmung des Autors in irgendeiner Form fotokopiert, vervielfältigt, übersetzt, mikroverfilmt, optisch oder elektronisch gespeichert, verarbeitet und verbreitet werden.

Druck: Görich & Weiershäuser GmbH, Marburg/L

Marburg, 2002

ISBN 3-89703-531-6

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen.....	IV
Verzeichnis der Tabellen	V
Verzeichnis der Anhangstabellen	VI
Verzeichnis der Abkürzungen.....	VII

1 Einleitung 1

2 Literaturübersicht 2

2.1 Selen.....	2
2.1.1 Historie	2
2.1.2 Chemische Eigenschaften.....	2
2.1.3 Selenhomöostase	4
2.1.4 Funktionelle Selenoenzyme	8
2.1.4.1 Glutathionperoxidasen.....	11
2.1.4.2 Jodthyronin-Dejodinasen (5'DI)	15
2.1.4.3 Thioredoxinreduktasen (TrxR).....	16
2.1.4.4 Selenophosphatsynthetase 2 (SPS2)	18
2.1.4.5 Weitere Selenoproteine	18
2.1.5 Seleneinbau in Selenoproteine	20
2.1.6 Regulation der Expression von Selenoproteinen.....	21
2.2 Vitamin E und Selen.....	23
2.2.1 Folgen eines Selen- und/oder Vitamin E-Mangels bei der Ratte.....	26
2.2.1.1 Auswirkungen auf antioxidative Schutzmechanismen	26
2.2.1.2 Zellschädigungen	29
2.2.1.3 Selen- und Vitamin E-Mangel assoziierte Folgereaktionen aus den Zellschädigungen	34
2.3 Messung differentieller Genexpression mittels Microarray-Technologie.....	43
2.3.1 Microarray-Technologie	43
2.3.2 Anwendungen	46
2.3.3 Grenzen der Microarray-Technologie	48

3 Experimenteller Teil..... 50

3.1 Ziel des Versuches und Versuchsplan.....	50
3.2 Beschreibung der Diäten und Versuchsdurchführung.....	52
3.3 Analytische Methoden	53

3.3.1	Rohnährstoffgehalte und Bruttoenergie der Versuchsdäten	53
3.3.2	Mineralstoffe in den Versuchsdäten	54
3.3.3	Selen-Konzentration in den Versuchsdäten und Leber	54
3.3.4	Vitamin E-Konzentration in den Versuchsdäten, Leber und Plasma.....	55
3.3.5	Hämoglobin-Konzentration und Hämatokrit-Wert.....	55
3.3.6	Selen-abhängige Enzyme	56
3.3.6.1	Zelluläre Glutathionperoxidase	56
3.3.6.2	Plasmatische Glutathionperoxidase.....	57
3.3.6.3	Thioredoxinreduktase	57
3.3.7	Antioxidative Schutzmechanismen.....	58
3.3.7.1	Glutathion	58
3.3.7.2	Glutathionreduktase	59
3.3.7.3	Glutathion-S-Transferase.....	60
3.3.7.4	Vitamin C	60
3.3.8	Parameter oxidativer Zellschädigung.....	61
3.3.8.1	Comet Assay	61
3.3.8.2	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen	62
3.3.8.3	γ -Glutaminsynthetase.....	63
3.3.8.4	Lactatdehydrogenase	64
3.3.8.5	Metallothionein	64
3.4	Differentielle Genexpressionsanalyse in der Leber	65
3.4.1	Aufbereitung und Markierung der Leberproben mit P ³²	66
3.4.2	Hybridisierung der cDNA mit dem Rat Toxicology Array II	67
3.4.3	Bildauswertung	68
3.5	Statistische Auswertung	69
4	Ergebnisse	71
4.1	Selen- und Vitamin E-Konzentrationen in den Versuchsdäten	71
4.2	Gehalt an Rohnährstoffen und ausgewählten Mengen- und Spurenelementen in den Versuchsdäten	72
4.3	Futteraufnahme, Lebendmasseentwicklung und Futtermittelverwertung.....	73
4.4	Vitamin E-Konzentrationen in Plasma und Leber.....	74
4.5	Selen-Konzentration und Selen-abhängige Enzyme in Plasma und Leber	75
4.6	Differentielle Genexpression in der Leber	77
4.7	Hämoglobin-Konzentration und Hämatokrit-Wert im Vollblut	81
4.8	Glutathionmetabolismus und Vitamin C-Konzentration in der Leber.....	81
4.9	DNA-Schäden in der Leber	83
4.10	Lipid- und Proteinschädigungen sowie Parameter einer Inflammation.....	84

5 Diskussion.....	86
5.1 Einfluss eines Selen- und/oder Vitamin E-Mangels auf Futteraufnahme, Lebendmasseentwicklung und Futtermittelverwertung.....	86
5.2 Einfluss eines Selen- und/oder Vitamin E-Mangels auf Selen- und Vitamin E-Konzentrationen in Plasma und Leber.....	88
5.3 Einfluss eines Se- und/oder VE-Mangels auf die differentielle Genexpression in der Leber	91
5.3.1 Vitamin E-Mangel assoziierte differentielle Genexpression	91
5.3.2 Selen-Mangel assoziierte differentielle Genexpression	93
5.3.3 Selen- und Vitamin E-Mangel assoziierte differentielle Genexpression	95
5.4 Einfluss eines Selen- und/oder Vitamin E-Mangels auf die Aktivität verschiedener Selenoenzyme und der Selen-unabhängigen Glutathionperoxidase	99
5.5 Einfluss eines Selen- und/oder Vitamin E-Mangels auf Hämoglobingehalt und Hämatokritwert im Vollblut.....	103
5.6 Einfluss eines Selen- und/oder Vitamin E-Mangels auf den Glutathion-metabolismus und Vitamin C-Konzentrationen in der Leber	104
5.7 Einfluss eines Selen- und/oder Vitamin E-Mangels auf DNA-Schäden in der Leber	106
5.8 Einfluss eines Selen- und/oder Vitamin E-Mangels auf Parameter einer Zellschädigung sowie Inflammation.....	109
6 Schlussfolgerung.....	113
7 Zusammenfassung.....	115
8 Literaturverzeichnis	119
9 Anhang	137

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1:	Intermediärer Selen-Metabolismus, modifiziert nach COMBS (1999).....	6
Abbildung 2:	Überblick über die Funktionen von Thioredoxin und Thioredoxinreduktase, modifiziert nach MUSTACICH und POWIS (2000)	17
Abbildung 3:	Modell für den cotranslationalen Einbau von Selenocystein in Selenoproteine bei Eukaryonten, modifiziert nach LOW und BERRY (1996), MANSELL und BERRY (2001)	20
Abbildung 4:	Interaktionen im antioxidativen Netzwerk zwischen Vitamin E, Vitamin C und Thiolredoxcyclen, modifiziert nach PACKER et al. (2001)	24
Abbildung 5:	Überblick über den Glutathionmetabolismus, modifiziert nach ANDERSON (1998).....	27
Abbildung 6:	Postulierter Mechanismus der Apoptoseinitiierung unter Beteiligung der Mitochondrien, modifiziert nach FINKEL (2001)	36
Abbildung 7:	Redoxregulation des Transkriptionsfaktors NFκB, modifiziert nach CHRISTMAN et al. (2000)	39
Abbildung 8:	Darstellung einer geschädigten DNA mit den im Comet Assay erhobenen Parametern.....	62
Abbildung 9:	Schematische Darstellung der Probenaufbereitung, Hybridisierung und Auswertung differentieller Genexpression mittels cDNA-Array	66
Abbildung 10:	Genexpressionsmuster von Ratten im Selen- und Vitamin E-Mangel (A), Selen-Mangel (B), Vitamin E-Mangel (C) und von Kontrolltieren (D)	77
Abbildung 11:	Lebendmasseentwicklung wachsender Ratten mit einem Selen- und/oder Vitamin E-Mangel im Vergleich zu Kontrolltieren	86
Abbildung 12:	Selen und Vitamin E-Konzentrationen in der Leber nach 7-wöchigem alimentären Selen- und/oder Vitamin E-Mangel	89
Abbildung 13:	Korrelationsanalyse zwischen Kontrolle und den Behandlungsgruppen Doppelmangel (A), Selen-Mangel (B) und Vitamin E-Mangel (C) von 271 bereinigten Intensitäten der exprimierten Gene in der Leber	92
Abbildung 14:	Einfluss eines Selen- und/oder Vitamin E-Mangels bei der Ratte auf DNA-Schäden in der Leber, anhand der Parameter „% DNA im Schweif“ (A) und „Tailmoment“ (B)	107

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1:	Übersicht über die verschiedenen Selenformen	3
Tabelle 2:	Bislang identifizierte, eukaryotische Selenoproteine und deren diskutierte Funktionen, nach GLADYSHEV und HATFIELD (1999), FLOHÉ et al. (2000).....	9
Tabelle 3:	Wichtige Ergebnisse in der experimentellen Vitamin E-Forschung.	25
Tabelle 4:	Auswahl verschiedener Microarray-Technologien und Anbieter	45
Tabelle 5:	Versuchsplan	50
Tabelle 6:	Versuchsparameter zum Einfluss eines Se- und/oder VE-Mangels auf Genexpression, Status- und Schädigungsparameter bei wachsenden Ratten	51
Tabelle 7:	Zusammensetzung der Basisdiät.....	52
Tabelle 8:	Selen- und Vitamin E-Konzentrationen in den Versuchsdiäten	71
Tabelle 9:	Gehalt an Rohnährstoffen sowie ausgewählten Mengen- und Spurenelementen in den Versuchsdiäten.....	72
Tabelle 10:	Wöchentliche Futtermittelaufnahme, Gesamtfuttermittelaufnahme und Futtermittelverwertung der Versuchstiere	73
Tabelle 11:	Lebendmasse und Lebendmassezunahme (LMZ) der Versuchstiere.....	74
Tabelle 12:	α -Tocopherol-Konzentrationen in Plasma und Leber nach 49-tägiger Versuchsdauer	75
Tabelle 13:	Selen-Statusparameter in Plasma und Leber nach 49-tägiger Versuchsdauer	76
Tabelle 14:	Darstellung der im Selen-Mangel differentiell exprimierten Gene in der Leber.....	78
Tabelle 15:	Darstellung der im Selen- und Vitamin E-Mangel differentiell exprimierten Gene in der Leber	80
Tabelle 16:	Hämoglobin-Konzentration und Hämatokrit-Wert im Vollblut nach 49-tägiger Versuchsdauer	81
Tabelle 17:	Glutathion- und Vitamin C-Konzentrationen sowie Aktivitäten der Glutathionreduktase und der Glutathion-S-Transferase in der Leber.....	83
Tabelle 18:	DNA-Schädigungen anhand der Parameter „% DNA im Schweif“ und „Tailmoment“ in Vitamin E- und/oder Selen-depletierten Leberzellen.....	84
Tabelle 19:	Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen und Metallothionein-Konzentrationen sowie Aktivitäten der γ -Glutamylsynthetase und Lactatdehydrogenase in der Leber	85
Tabelle 20:	Klassifikation eines Selen-Mangels bei der Ratte anhand des Schweregrades, nach BURK (1987)	100
Tabelle 21:	Zusammenstellung verschiedener Se-Mangelstudien an männlichen Ratten.....	102

Verzeichnis der Anhangstabellen

Anhangstabelle 1:	Wöchentliche Futterraufnahme, Gesamfutteraufnahme und Futtermittelnutzung der Ratten	138
Anhangstabelle 2:	Lebendmasse und Lebendmassezunahme (LMZ) der Ratten	139
Anhangstabelle 3:	α -Tocopherol-Konzentrationen in Plasma und Leber der Ratten ..	140
Anhangstabelle 4:	Aktivitäten der Selen-abhängigen Enzyme pGPx, cGPx und TrxR sowie hepatische Selen-Konzentrationen.....	141
Anhangstabelle 5:	Hämoglobin-Konzentration und Hämatokrit-Wert der Ratten	142
Anhangstabelle 6:	Glutathion- und Vitamin C-Konzentrationen sowie Aktivitäten der Glutathionreduktase und der Glutathion-S-Transferase in der Leber.....	143
Anhangstabelle 7:	DNA-Schädigungen anhand der Parameter „% DNA im Schweif“ und „Tailmoment“ in Leberzellen der Ratten.....	144
Anhangstabelle 8:	TBA-RS und Metallothionein-Konzentrationen sowie Aktivitäten der γ -Glutaminsynthetase und Lactatdehydrogenase in der Leber.....	145

Verzeichnis der Abkürzungen

γ -GCS	γ -Glutamylcysteinsynthetase
γ -GS	γ -Glutaminsynthetase
5'-DI	5'-Dejodinase
8OHdG	8-Hydroxydeoxyguanosin
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
ALOX12	Arachidonat 12-Lipoxygenase
CAIII	Carboanhydrase III
CCl ₄	Kohlenstofftetrachlorid
CCT	T-Complex Protein 1
cGPx	zelluläre Glutathionperoxidase
CycD1	G1/S-spezifisches Cyclin D1
cMOAT	kanalikulärer multispezifischer organischer Anionentransporter
d	Tag
DABS	Diazobenzolsulfonsäure
DAD1	Defender against Cell Death 1 Protein
ddH ₂ O	doppeltdestilliertes Wasser
DMBA	7,12-Dimethylbenzanthracen
DMH	1,2-Dimethylhydrazin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoat
eEFsec	tRNA ^{Sec} spezifischer Elongationsfaktor
FM	Frischmasse
FMO1	hepatische Flavin-enthaltende Monooxygenase 1
FV	Futterverwertung
GH	Wachstumshormon
GI-GPx	gastrointestinale Glutathionperoxidase
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hb	Hämoglobin
HDL	high density Lipoprotein
HIP	HSC70-Interacting Protein
Hk	Hämatokrit

LDH	Lactatdehydrogenase
LDL	low density Lipoprotein
LM	Lebendmasse
LMZ	Lebendmassezunahme
M	Gruppenmittelwert
M2VP	1-Methyl-2-Vinylpyridinium-Trifluoromethansulfonat
min	Minute
MT	Metallothionein
NPM	Nucleophosmin
pGPx	plasmatische Glutathionperoxidase
PHGPx	Phospholipidhydroperoxid Glutathionperoxidase
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäuren
ROO•	Peroxy-Radikal
ROOH	Hydroperoxid
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SBP2	SECIS-bindendes Protein 2
SD	Standardabweichung
SECIS	Selenocysteine Insertion Sequence
SelP	Selenoprotein P
SelW	Selenoprotein W
SPI-3	Serin Protease Inhibitor
SPS2	Selenophosphatsynthetase-2
T ₃	Trijodthyronin
T ₄	Thyroxin
TAP	Tocopherol-assoziiertes Protein
TBA-RS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TIMP1	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 Precursor
TNB	2-Nitro-5-thiobenzoat
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TM	Trockenmasse
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxinreduktase
TTP	Tocopheroltransferprotein
VE	Vitamin E
VK	Variationskoeffizient
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Seit der Entdeckung im Jahre 1973, dass Selen (Se) einen essentiellen Bestandteil der zellulären Glutathionperoxidase darstellt, wird eine antioxidative Wirkung des Se postuliert. Darüber hinaus scheinen Selenoproteine an der Modulation redox-sensitiver Enzymkaskaden, an anti-inflammatorischen Prozessen und am Zellwachstum beteiligt zu sein.

Zwischen Se und Vitamin E (VE) wurde eine synergistische Wirkung nachgewiesen. VE wird im allgemeinen als das wichtigste Antioxidanz im lipophilen Milieu der Biomembranen angesehen. Des weiteren konnte für α -Tocopherol eine von seiner antioxidativen Wirkung unabhängige Funktion aufgezeigt werden. So hemmt α -Tocopherol post-transkriptional die Proteinkinase C und scheint auf transkriptionaler Ebene verschiedene Gene (Collagen α I, α -Tocopheroltransferprotein, Collagenase) zu regulieren.

cDNA-Arrays stellen eine moderne und effiziente Methode zur simultanen Erfassung der Expression von mehreren hundert bis tausend Genen dar und eröffnen damit neue Möglichkeiten eines umfassenden Screenings molekularer Ereignisse. Um die molekularen Mechanismen in der Physiologie von Se und VE und der Pathophysiologie eines Se- und VE-Mangels zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe eines Atlas Rat Toxicology cDNA-Arrays ein Expressionsprofil von der Leber wachsender Ratten mit einem alimentären Se- und/oder VE-Mangel erstellt. Der verwendete Array beinhaltet Sequenzen von Genen, welche kritische Funktionen in DNA-Reparatur, Zellcyclus, Xenobiotica-Metabolismus, Apoptose, Inflammation und Stressantwort übernehmen. Zusätzlich wurde der Se- und VE-Status sowie verschiedene Zellschädigungsparameter auf Lipid- (Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen), Protein- (γ -Glutaminsynthetase) und DNA-Ebene (Comet Assay) erhoben, um eine Veränderung in der Genexpression mit Zellschädigungen und Abweichungen im antioxidativen Schutzsystem zu korrelieren.

2 Literaturübersicht

2.1 Selen

2.1.1 Historie

Das Element Selen (Se) wurde 1817 erstmals von dem schwedischen Chemiker Jakob J. Berzelius beschrieben. Die potenziell toxische Wirkung von Se war allerdings schon früher bekannt, da bereits im 13. Jahrhundert von Marco Polo Vergiftungssymptome geschildert wurden. 1957 entdeckten SCHWARZ und FOLTZ, dass Se einen Faktor zur Verhinderung der Vitamin E-Mangel-induzierten Lebernekrose darstellt. Der Beginn der biochemischen Se-Forschung wird auf das Jahr 1973 datiert, nachdem in Bakterien die beiden Enzyme Formatdehydrogenase und Glycinreduktase (ANDREESEN und LJUNGDAHL 1973) sowie in Säugetieren die zelluläre Glutathionperoxidase (FLOHÉ et al. 1973, ROTRUCK et al. 1973) als Selenoproteine identifiziert wurden. Seitdem gilt Se als essentielles Spurenelement. Bis heute sind 19 eukaryotische Selenoproteine bekannt, bei denen Se in Form der 21. Aminosäure Selenocystein vorkommt. Die Existenz weiterer Selenoproteine wird jedoch angenommen, da nach Verabreichung von Se^{75} und anschließender elektrophoretischer Auftrennung von Gewebeproteinen bislang noch nicht charakterisierte Banden auftreten (BEHNE et al. 1996b). Basierend auf diesen Experimenten wird die Anzahl der Selenoproteine in Säugetieren auf 30–50 geschätzt.

2.1.2 Chemische Eigenschaften

Se besitzt die Ordnungszahl 34 und gehört der Gruppe VIa im Periodensystem an. Demnach zählt es zu den Metalloiden mit sowohl metallischen als auch nicht-metallischen Eigenschaften. Elementares Se kommt in roter, dunkelroter bzw. schwarzer kristalliner Gestalt vor und kann zur Oxidationsstufe $-II$ (Selenid) reduziert oder zu den Oxidationsstufen $+IV$ (Selenit) oder $+VI$ (Selenat) oxidiert werden (Tabelle 1). Die methylierten Formen Selenmethylselenocystein, Dimethylselenid und Trimethylselenonium sind die am wenigsten toxischen Formen des Se (JONNALAGADDA und RAO 1993) und dienen dem Organismus als Ausscheidungsprodukte. Für den Einbau des

Se in funktionelle Selenoproteine stellt Hydrogenselenid den zentralen Metaboliten im Se-Stoffwechsel der Ratte dar (siehe Kapitel 2.1.3, Abbildung 1). Da jedoch bei Überschreitung der Methylierungskapazität Hydrogenselenid durch Autoxidation oxidativen Stress induzieren kann, ist es ebenfalls für die Toxizität des Se verantwortlich (GANTHER 1999).

Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen Selenformen

Selenform	Chemische Formel/Abk.	Oxidationsstufe
Selen	Se	±0
Natriumselenit	Na ₂ SeO ₃	+IV
Natriumselenat	Na ₂ SeO ₄	+VI
Natriumselenid	Na ₂ Se	-II
Hydrogenselenid	H ₂ Se	-II
Selenige Säure	H ₂ SeO ₃	+IV
Selensäure	H ₂ SeO ₄	+VI
Selenocystein	SeCys	-II
Selenomethionin	SeMet	-II
Selenodiglutathion	GSSeSG	±0
Selenmethylselenocystein	CH ₃ SeH	-II
Dimethylselenid	(CH ₃) ₂ Se	-II
Trimethylselenonium	(CH ₃) ₃ Se ⁺	-II

Da Se und Schwefel ähnliche Atomradien, Bindungslängen und Elektronegativitäten aufweisen, kann Se anstelle des Schwefels in Proteine eingebaut werden, wodurch eine Vielzahl verschiedener organischer Se-Verbindungen entstehen. Dennoch unterscheiden sich Se und Schwefel in einigen wichtigen chemischen Eigenschaften. Die Reduktionspotentiale der Selensäure bzw. selenigen Säure sind weitaus größer als diejenigen der entsprechenden Schwefel-Analoga, so dass bei Anwesenheit von Sulfiten und Seleniten, Selenit zu elementarem Se und Sulfit zu Sulfat oxidiert wird. Ebenso ist Hydrogenselenid eine weitaus stärkere Säure im Vergleich zu Schwefelwasserstoff. Selenocystein liegt bei physiologischem pH mit einem pK von 5,24 zum größten Teil deprotoniert vor, während Cystein mit einem pK von 8,25 vorwiegend protoniert

vorkommt (SUNDE 1997). Diese Eigenschaften machen das Selenol zu einem „besseren“ Nucleophil als das Thiol (BURK und HILL 1999).

In Selenoproteinen erscheint Se als Selenid in der Seitenkette des Selenocysteins. Aufgrund des höheren Redoxpotentials des Se gegenüber dem Schwefel unterscheiden sich die Selenoproteine von den entsprechenden Schwefelanaloga in der Struktur und in einer im allgemeinen höheren Reaktivität (AXLEY und STADTMAN 1989).

2.1.3 Selenhomöostase

Aufnahme

Die Absorption von Se aus ernährungsphysiologisch relevanten anorganischen und organischen Verbindungen – sowohl aus den für die Se-Supplementierung verwendeten als auch aus den in Futtermitteln natürlicherweise vorkommenden Formen - ist normalerweise recht hoch (70-95 %). Im Unterschied zu vielen anderen Spurenelementen scheint die Absorption nicht durch den Versorgungsstatus des Organismus beeinflusst zu werden (WOLFFRAM 2000). Daher wird die Regulation der Se-Homöostase nicht über die Absorption, sondern über die Urinausscheidung vermutet (SUNDE 1997). Die absorbierte Menge als auch der Transport selbst ist von der jeweiligen Se-Verbindung abhängig. So liegt die totale Absorptionsrate von Selenat nahezu 1,5-fach höher als die Selenitabsorption. WOLFFRAM et al. (1986) belegten, dass Selenat mittels Natrium-Cotransport über den gleichen Mechanismus wie Sulfat durch die Bürstensaummembran transportiert wird. Bei Verwendung umgestülpter Darmsäckchen wurde die mukosale Aufnahme von Se aus Selenat in Gegenwart von Natrium stimuliert, wobei dieser Transport weitestgehend auf das Ileum beschränkt war (ARDÜSER et al. 1985). Darüber hinaus existiert für den Selenattransport ein Anionenaustauscher, der Selenat sowie Sulfat im Austausch gegen Hydroxylanionen durch die Bürstensaummembran transportiert (WOLFFRAM et al. 1988). Die Absorption von Selenit dagegen ist Natrium-unabhängig und wird nicht durch Sulfat beeinflusst. Allerdings wurde eine Bindung des Selenits an die Oberfläche der Bürstensaummembran beschrieben (MYKKANEN und WASSERMAN 1989), welche durch eine Reaktion von Selenit mit

membranständigen Thiolgruppen (vermutlich Glutathion) erklärt wurde (MYKKANEN und WASSERMAN 1990). Ebenso wäre eine Reaktion des Selenits mit extrazellulär im Darmlumen vorliegenden Thiolen denkbar, wodurch aminosäureähnliche Reaktionsprodukte wie z.B. Selenodicystein oder Cysteinselenopersulfid entstehen und über einen Aminosäure-Transporter aufgenommen werden könnten (WÜRMLI et al. 1989).

Se in Form der Selenoaminosäuren wird unverändert in die Zellen der Bürstensaummembran transportiert. Für Selenomethionin wurde ein aktiver Natrium-abhängiger Transporter nachgewiesen, welcher zusammen mit Methionin genutzt wird (WOLFFRAM et al. 1989). Ein ähnlicher Mechanismus wird für Selenocystein vermutet, wobei in diesem Falle der Transport über den Transporter für basische Aminosäuren zu erfolgen scheint, da der Cysteintransport sowohl durch Selenocystein als auch kompetitiv durch Lysin und Arginin gehemmt wird (WOLFFRAM 2000).

Metabolismus

Der intermediäre Metabolismus des Se ist sehr komplex. Ein Teil der bis heute bekannten Reaktionen sind in Abbildung 1 zusammenfassend dargestellt. Eine Schlüsselrolle im Selenmetabolismus nimmt Hydrogenselenid ein, in dessen Form die meisten ankommenden Se-Metabolite überführt werden.

Der Mechanismus der Reduktion von Selenat zu Selenit wird analog zum Mechanismus der Schwefelreduktion angenommen (AXLEY und STADTMAN 1989). Selenit kann durch nicht-enzymatische, thiolabhängige Reduktion bis zur Oxidationsstufe ± 0 (Selenodiglutathion) und weiter durch NADPH-abhängige Reduktasen zu Selenid reduziert werden (GANTHER 1999). Se aus Selenocystein wird über eine Selenocysteinlyase-katalysierte Reaktion über die Bildung von elementarem Se zu Selenid umgewandelt. Im Prinzip könnte Selenocystein ebenso wie Cystein abgebaut und dabei Selenit freigesetzt werden, dennoch scheint die direkte Bildung von Selenid wahrscheinlicher. Selenomethionin kann unspezifisch anstelle der schwefelhaltigen analogen Aminosäure Methionin in Proteine eingebaut werden und wandert somit zunächst durch den generellen Proteinpool. Dieser Austausch von Methionin gegen

Selenomethionin findet vor allem bei hoher Zufuhr an Selenomethionin bei gleichzeitig geringem Angebot von Methionin statt (WHANGER und BUTLER 1988). Erst im Zuge der Protein- und Aminosäuredegradation wird Selenomethionin zu Selenocystein, entsprechend dem Abbau von Methionin zu Cystein, transseleniert (COMBS und COMBS 1986). Alternativ besteht die Möglichkeit mit Hilfe einer L-Methionin- γ -Lyase über eine α,γ -Eliminierungsreaktion direkt Selenmethylselenocystein freizusetzen (OKUNO et al. 2001), welches wiederum zu Hydrogenselenid demethyliert werden kann.

Hydrogenselenid stellt die Ausgangsform des Se zur Bildung der Selenoproteine dar (VERES et al. 1994). Dabei findet eine cotranslationale Synthese von Selenocystein aus Selenid nach dessen Aktivierung zum Selenophosphat und der Einbau von Selenocystein in die funktionellen Selenoproteine statt (siehe Kapitel 2.1.5).

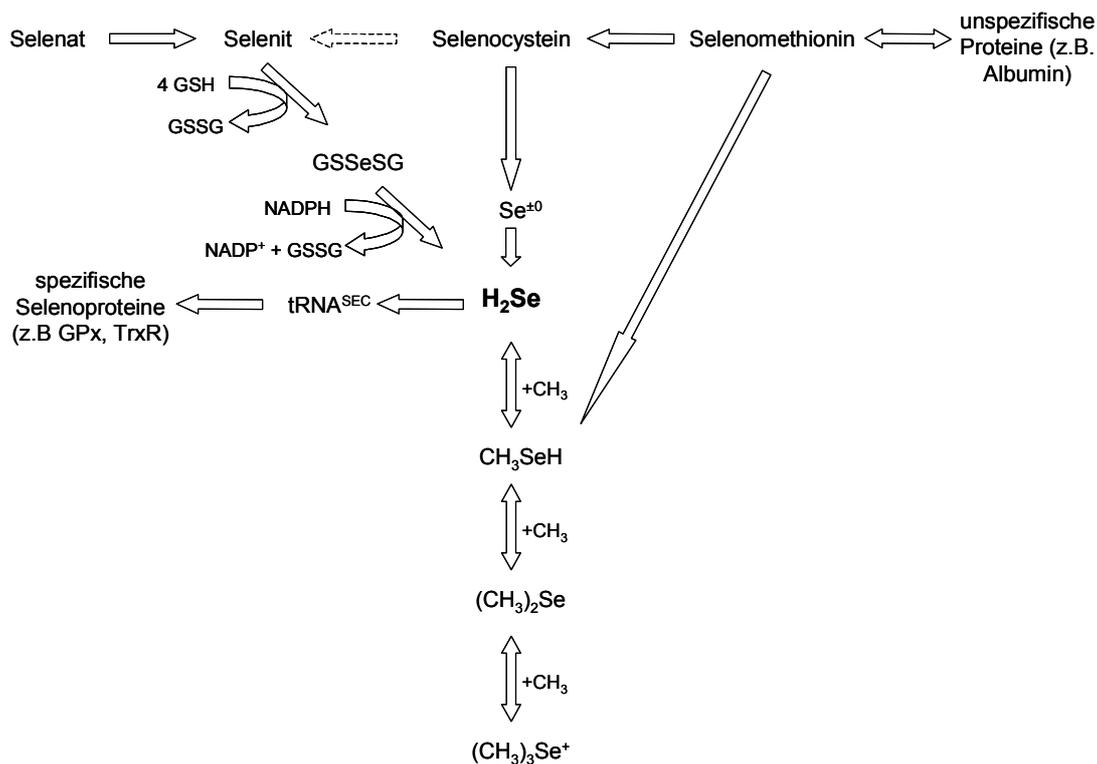


Abbildung 1: Intermediärer Selen-Metabolismus, modifiziert nach COMBS (1999)

Die Se-Verbindungen werden nach Aufnahme in die Darmepithelzellen auf der serosalen Seite ins Blut abgegeben. Der Transport der anorganischen Se-Verbindungen im Blut erfolgt nach Reduktion zu Selenid hauptsächlich über die Bindung an Plasmaproteine wie

z.B. Albumin (SHIOBARA und SUZUKI 1998). Selenomethionin dagegen taucht in hohem Maße im Hämoglobin der Erythrocyten auf (BEILSTEIN und WHANGER 1986b), wo es vermutlich anstelle von Methionin in das Protein inkorporiert wird. Selenoprotein P, welches aufgrund seines hohen Selenocysteingehaltes zu den funktionellen Selenoproteinen gezählt wird, stellt den größten Anteil (65 %) des Se im Plasma dar.

In adäquat versorgten weiblichen Ratten (300 μg Se/kg Diät) ergeben sich die höchsten Se-Konzentrationen in Niere und Leber (>1000 μg Se/kg FM), gefolgt von Nebennieren, Erythrocyten, Milz, Pankreas, Plasma, Lungen und Herz (370-770 μg Se/kg FM) (BEHNE und WOLTERS 1983). In den Testes von männlichen Ratten wurde eine Konzentration von 890 μg Se/kg FM ermittelt. Die niedrigsten Se-Konzentrationen befinden sich in Thymus, Muskel und Gehirn (<230 μg Se/kg FM). Das Muskelgewebe macht jedoch aufgrund seiner Masse, zusammen mit Leber, Blut, Niere und Testes 83 % des Gesamtkörperselens bei der Ratte aus (SUNDE 1997). Im Mangel dagegen zeigt sich eine rasche Se-Depletion der Leber, während hohe Spiegel in Testes, Hirn, Milz und Nieren aufrechterhalten werden (BURK et al. 1972). Weiterhin ist auffällig, dass bei der Distribution des Se auf die verschiedenen Organe die unterschiedlichen Se-Verbindungen ein differentielles Verhalten aufzeigen. Se in Form von Selenomethionin wird nach der Aufnahme zunächst unspezifisch in Proteine eingebaut (siehe oben). Somit ist der überwiegende Teil des Se bei mit Selenomethionin gefütterten Ratten zunächst in der Muskulatur zu finden, bevor es in Selenocystein-haltige, funktionelle Selenoproteine eingebaut werden kann (SUNDE 1997). Selenit dagegen ist bereits drei Tage nach Injektion zu 70 % in Selenoproteinen wiederzufinden (BEILSTEIN und WHANGER 1986a).

Exkretion

Se kann sowohl über die Lungen als auch über die Nieren nach Methylierung von Selenid zu Selenmethylselenocystein, Dimethylselenid bzw. Trimethylselenonium aus dem Organismus ausgeschieden werden. Das über die Faeces ausgeschiedene Se repräsentiert weitestgehend das im Gastrointestinaltrakt nicht absorbierte Se (BURK 1983). Se-Dosis

und Se-Status beeinflussen Höhe und Ausscheidungsform des Se. Bei Ratten, denen 16 μg Se/kg Körpergewicht oral verabreicht wurden, bestand ca. 10 % des im Urin exkretierten Se aus Trimethylselenonium, während es bei Tieren nach einer Verabreichung von 1500 μg Se/kg Körpergewicht die Hauptausscheidungsform (ca. 65 %) im Urin darstellte (NAHAPETIAN et al. 1983). Werden per Injektion pharmakologische Dosen (5 mg Se/kg Körpergewicht) an Ratten verabreicht, wird Se in den folgenden 24 Stunden über die Lungen als Dimethylselenid abgeatmet (HASSOUN et al. 1995).

2.1.4 Funktionelle Selenoenzyme

Die bislang bekannten biologischen Funktionen des Se werden durch Selenoproteine vermittelt, welche sowohl in Bakterien, Archaeobakterien als auch in Eukaryonten identifiziert werden konnten (LOW und BERRY 1996). Für Säugetiere sind Selenoproteine lebensnotwendig. Ein knock-out im tRNA^{Sec}-Gen, ohne das keines der Selenoproteine gebildet werden kann (siehe Kapitel 2.1.5), ist bei Mäusen frühembryonal letal (BÖSL et al. 1997). Es ist bis heute nicht sicher, welches der Selenoproteine für die Essentialität verantwortlich ist, es wird jedoch das Enzym Thioredoxinreduktase diskutiert, da ein knock-out des Thioredoxinreduktase-Gens im gleichen Stadium letal ist (MATSUI et al. 1996).

Se wird in die Selenoproteine in Form von Selenocystein eingebaut. Eine Substitution durch strukturell ähnliche Aminosäuren, wie Cystein, führt zwar zu funktionellen Enzymen, allerdings weisen diese einen signifikant verringerten K_{cat} auf.

Nachdem die prinzipiellen Mechanismen zur Selenoproteinsynthese bekannt wurden, stieg in den letzten Jahren die Zahl der neu identifizierten Selenoproteine stark an. In Eukaryonten sind bislang vier verschiedene Familien von Selenoenzymen beschrieben: Glutathionperoxidasen, Dejodinasen, Thioredoxinreduktasen und Selenophosphat-synthetasen (Tabelle 2). Darüber hinaus sind weitere als Selenoproteine identifizierte Proteine bekannt, welche jedoch funktionell noch nicht vollständig charakterisiert sind. Der größte Anteil der Selenoenzyme katalysiert Oxido-Reduktionen, bei denen der Selenocysteinrest im aktiven Zentrum an der Katalyse teilnimmt (BERRY et al. 1997).

Tabelle 2: Bislang identifizierte, eukaryotische Selenoproteine und deren diskutierte Funktionen, nach GLADYSHEV und HATFIELD (1999), FLOHÉ et al. (2000)

Trivialname	Abkürzungen	Molekulargewicht	Expression	Funktion
Glutathionperoxidasen				
Zelluläre GPx	cGPx, GPx1	Homotetramer Untereinheiten mit 22 kDa	Ubiquitär	Oxidationsschutz
Gastrointestinale GPx	GI-GPx, GPx2	Homotetramer Untereinheiten mit 22 kDa	Gastrointestinaltrakt	Lokaler Redoxschutz ?
Plasmatische GPx	pGPx, GPx3	Homotetramer Untereinheiten mit 23 kDa	Ubiquitär, vor allem Niere	Redoxpuffer ?, Regulation Prostanoidstoffwechsel ?
Phospholipidhydroperoxid GPx	PHGPx, GPx4	Monomer mit 19 kDa	Ubiquitär	Redoxregulation, Spermienreifung
Jodthyronin-Dejodinasen				
5'-Dejodinase Typ I	5'DI-I	Monomer mit 29 kDa	Schilddrüse, Leber, Niere, ZNS	T ₃ -Synthese durch Reduktion von T ₄ Abbau von T ₃ und T ₄
5'-Dejodinase Typ II	5'DI-II	Monomer mit 30,5 kDa	Schilddrüse, Hirnanhangsdrüse, Placenta, Herz, Skelettmuskel, ZNS, braunes Fettgewebe	T ₃ -Synthese durch Reduktion von T ₄
5'-Dejodinase Typ III	5'DI-III	Monomer mit 31,5 kDa	Placenta, ZNS, Haut	Abbau von T ₃ und T ₄
Thioredoxinreduktasen				
Thioredoxinreduktase	TR, TrxR, TrxR1, c-TrxR1	Homodimer Untereinheiten mit 55 kDa	Ubiquitär	Reduktion von Thioredoxin, DNA-Synthese, Thioldisulfid-Gleichgewicht
Mitochondriale Thioredoxinreduktase	TrxR2, mt-TrxR2		Ubiquitär	Unbekannt, Redoxschutz ?
Selenophosphat-synthetase 2				
15kDa-Selenoprotein	SPS2	Monomer mit 50 kDa	Ubiquitär	Selenoproteinsynthese
Selenoprotein P	Sep15	15 kDa	Ubiquitär	Unbekannt, Proteinfaltung ?
Selenoprotein P	SelP	Glycoprotein mit 57 kDa	Plasma	Unbekannt, Redoxschutz ?
Selenoprotein W	SelW	8 kDa	Ubiquitär	Unbekannt, Redoxschutz ?
Selenoprotein X	SelX	16 kDa ?	?	Unbekannt
Selenoprotein N	SelN	60 kDa ?	?	Unbekannt
Selenoprotein R	SelR	12,6 kDa ?	?	Unbekannt
Selenoprotein T	SelT	18,8 kDa ?	?	Unbekannt

In Se-Mangelsituationen hat sich gezeigt, dass Se vorzugsweise in bestimmte Selenoproteine eingebaut wird, während andere Proteine weniger gut versorgt werden. Daraus lässt sich eine „Hierarchie der Selenoproteine“ ableiten. Proteine, welche spät mit Aktivitätsverlust auf einen Se-Mangel reagieren, werden somit höher in dieser Hierarchie angesiedelt und scheinen gegenüber den anderen Selenoproteinen eine wichtigere physiologische Rolle im Organismus zu spielen.

Für die Aufrechterhaltung der Aktivität der Glutathionperoxidasen im fortschreitendem Se-Mangel wurde folgende Reihenfolge vorgeschlagen (BRIGELIUS-FLOHÉ 1999):

GI-GPx > PHGPx > pGPx = cGPx

Demzufolge reagieren pGPx und cGPx gleichermaßen auf einen Se-Mangel mit Aktivitätsverlust, wohingegen die Aktivitäten der PHGPx und in noch stärkerem Maße der GI-GPx weitestgehend aufrechterhalten werden.

Ferner verlieren im Se-Mangel Selenoproteine in bestimmten Geweben schneller an Aktivität als in anderen Geweben. So sinkt die Aktivität der cGPx bei Se-defizienten Ratten in der Leber auf 1 % im Vergleich zur Kontrolle, während in Herz, Niere und Lunge Aktivitäten von 4-9 % und in Testes von 50 % gemessen wurden (LEI et al. 1998). Bei Ratten in der zweiten Generation im Se-Mangel lag, im Vergleich zu den Kontrolltieren, die Gesamt-GPx-Aktivität bei <5 % in Leber, Niere, Lunge, Herz, Nebenniere, Pankreas und Muskel. Thymus und Testes der männlichen Tiere wiesen <10 % und Thymus und Eierstöcke der weiblichen Tiere 25 % der Aktivität auf. Im Gehirn dagegen fiel die Aktivität auf nur ca. 50 % der Aktivität der Kontrolltiere ab (THOMPSON et al. 1995). Aus diesen Ergebnissen kann auf einen Mechanismus geschlossen werden, der spezifisch zum Einbau von Se in die Selenoenzyme eines bestimmten Gewebes führt. Dieser Einbau könnte über eine Gewebe-spezifische Expression bzw. Gewebe-spezifische Regulation der mRNA-Stabilität erreicht werden.

Daraus abgeleitet lässt sich eine Hierarchie bezüglich der Unempfindlichkeit der Organe gegenüber einer Se-Mangelsituation aufstellen (BRIGELIUS-FLOHÉ 1999):

Gehirn >> Thymus > Schilddrüse > Herz > Leber = Niere = Lunge

cGPx- und PHGPx-Aktivitäten werden im Se-Mangel vorzugsweise im Gehirn, in den reproduzierenden Organen und den endokrinologischen Geweben aufrechterhalten, so dass hier eine besonders wichtige Funktion dieser Glutathionperoxidasen angenommen werden kann (ARTHUR 2000).

Im Folgenden werden einige der bekannten Selenoproteine näher beschrieben.

2.1.4.1 Glutathionperoxidasen

Zu den bis heute bekannten Glutathionperoxidasen zählen die zelluläre GPx (cGPx), die plasmatische GPx (pGPx), die Phospholipidhydroperoxid GPx (PHGPx) und die gastrointestinale GPx (GI-GPx), welche mit Ausnahme von PHGPx als Homotetramere vorliegen. PHGPx liegt als Monomer vor, dessen Molekulargewicht geringer ist als das der Untereinheiten der anderen Glutathionperoxidasen. Alle Glutathionperoxidasen reduzieren Hydrogen- und Alkylhydroperoxide zu Wasser bzw. Alkohol, dennoch variiert ihre Substratspezifität erheblich (BRIGELIUS-FLOHÉ 1999). Während die cGPx lösliche und einige organische Hydroperoxide zu reduzieren vermag, reduziert die PHGPx Hydroperoxide von komplexen Lipiden, Lipoproteinen, Cholesterinestern sowie in Membranen integrierte Hydroperoxide. Bei der Reaktion wird der Selenocysteinrest durch das Peroxid oxidiert und nimmt hierdurch die Oxidationsstufe der unterselenigen Säure (R-SeOH) an. Das oxidierte Enzym reagiert im Folgenden mit einem Thiol, typischerweise Glutathion, unter Bildung eines Selenodisulfides (R-Se-SG). Die Selenodisulfidbrücke dieser Zwischenstufe wird durch ein zweites Glutathion-Molekül gespalten, wodurch der Grundzustand des Enzyms (R-SeH bzw. dessen dissoziierte Form R-Se⁻) regeneriert und oxidiertes Glutathion gebildet wird. Das Selenocystein ist im aktiven Zentrum von einem Tryptophan- und einem Glutaminrest umgeben, wodurch der Iminostickstoff des Tryptophans und die Amidgruppe des Glutamins im Grundzustand Wasserstoffbrücken zum Se ausbilden können. Dies verhindert eine Protonierung des dissoziierten Selenocysteinrestes und aktiviert das Se für die Reaktion mit dem Peroxid (GANTHER und KRAUS 1984).

Da das antioxidativ wirksame Enzym cGPx das erste entdeckte Selenoenzym darstellt, wurden den Glutathionperoxidasen zunächst nur antioxidative Funktionen zugesprochen. Diese Betrachtungsweise wird jedoch zunehmend revidiert und es werden weitere Aufgaben der Glutathionperoxidasen diskutiert, wie im Folgenden beschrieben.

Zelluläre Glutathionperoxidase (cGPx)

Das nahezu ubiquitäre Vorkommen der cGPx, ihre cytosolische und mitochondriale Lokalisation sowie die hohe Konzentration von Glutathion in diesen Kompartimenten geben der cGPx die Möglichkeit, den zellulären Spiegel an Hydroperoxiden niedrig zu halten und somit als Schutzenzym zu fungieren. Dadurch können Schäden durch radikalische Kettenreaktionen verhindert werden (FLOHÉ 1997). Besonders hohe Aktivitäten sind in Geweben mit einer hohen Rate an Peroxiden zu finden, wie in Erythrocyten, Leber, Nieren und Lunge (GROMADZINSKA et al. 1988). Allerdings belegen Experimente mit knock-out Mäusen, dass die cGPx unter physiologischen Bedingungen nicht lebensnotwendig ist. Es kam zu keiner signifikanten Abweichung im Wachstum und Entwicklung der Mäuse sowie zu keinerlei histopathologischen Veränderungen bis zu einem Alter von 15 Monaten (DE HAAN et al. 1998). Die cGPx (-/-) Mäuse verstarben jedoch nach Paraquat-induziertem oxidativen Stress früher als die Kontrollen. Der Defekt im Oxidationsschutz der cGPx (-/-) Mäuse war etwa gleich ausgeprägt, ob nun die Mäuse auf einer Se-Mangeldiät (d.h. bei drastisch gesenkten Spiegeln aller anderen Selenoproteine) oder optimierter Se-Supplementation (d.h. bei Maximalaktivität aller Selenoproteine) gehalten wurden. Demnach scheint unter den Selenoproteinen nur die cGPx einen Schutz vor Paraquat-induziertem oxidativen Stress zu bieten. Da Vitamin E die beobachteten Effekte nicht abschwächen konnte, wird die cGPx-Schutzwirkung als spezifisch angesehen (CHENG et al. 1997b). Ebenso scheint die cGPx einen essentiellen Schutz vor viral-induzierter Myocarditis zu bieten (BECK et al. 1998).

Die cGPx zeigt eine schnelle Aktivitätsabnahme unter Se-Mangelbedingungen in Leber, Niere und Erythrocyten. Daher wird der cGPx neben ihrer Schutzfunktion eine Rolle als biologischer Se-Speicher zugesprochen (ARTHUR und BECKETT 1994). Ebenso wäre eine

Rolle als Se-Puffer denkbar, der unter normalen Zufuhrbedingungen die Konzentration an freiem Se niedrig hält, während im Mangel das Se an biologisch wichtigere Selenoproteine abgegeben wird (SUNDE 1997).

Plasmatische Glutathionperoxidase (pGPx)

TAKAHASHI et al. (1987) stellten fest, dass die GPx-Aktivität im Plasma nicht von der cGPx sondern von einer „neuen“ GPx ausgeht. Diese wurde als plasmatische GPx bezeichnet. Sie besitzt die Möglichkeit Thioredoxin (Trx) und Glutaredoxin anstelle von Glutathion als das reduzierende Substrat zu verwenden und kann somit trotz niedriger Glutathion-Spiegel im Plasma eine hohe Aktivität erlangen (BJÖRNSTEDT et al. 1994). Gebildet wird die pGPx hauptsächlich in den Epithelzellen des proximalen Tubulus der Niere; in Leber, Muskel, Pankreas, Gehirn, Lunge und Herz konnte jedoch ebenfalls pGPx-mRNA nachgewiesen werden. Von dort wird sie ins Plasma abgegeben, so dass dementsprechend die höchsten Aktivitäten im Plasma und in extrazellulären Flüssigkeiten (z.B. Milch) gefunden wurden. Da die pGPx zur Verbesserung der Stabilität glykosyliert vorkommt, wird auch ihr eine im Extrazellulärraum wirkende, antioxidative Rolle zugesprochen (ARTHUR 2000). Als weitere mögliche Funktion wird der Schutz von Plasmaproteinen vor Oxidation bzw. Nitrierung durch Peroxynitrit über eine direkte Reaktion mit dem Molekül diskutiert (ARTEEL et al. 1998).

Die pGPx reagiert bei Ratten sensitiv auf einen Se-Mangel mit Aktivitätsverlust und steigt ebenso schnell bei einer Resupplementation wieder an (CHOW und TAPPEL 1974). Darüber hinaus scheint sie den Se-Status in den Geweben gut wiederzuspiegeln (COHEN et al. 1985), so dass sie als ein wichtiger Parameter zur Einschätzung des Se-Status gilt.

Gastrointestinale Glutathionperoxidase (GI-GPx)

Die Expression der GI-GPx scheint bei Ratten auf das Epithelium des Gastrointestinaltraktes beschränkt zu sein (CHU und ESWORTHY 1995). Diese untypische Gewebsverteilung hat zu der Hypothese geführt, dass die GI-GPx in erster Linie als Schutz vor mit der Nahrung aufgenommenen Lipidhydroperoxiden fungiert. Bei

Ratten mit einem höheren Anteil an Hydroperoxiden in der Diät konnte im Vergleich zu den Kontrollen eine gesteigerte GI-GPx-Aktivität im Gastrointestinaltrakt festgestellt werden (REDDY und TAPPEL 1974). Eine scheinbar hohe biologische Relevanz wird durch die Beobachtung verdeutlicht, dass im Se-Mangel die Transkription des GI-GPx Gens im Vergleich zu den anderen Glutathionperoxidasen am längsten aufrechterhalten wird (WINGLER et al. 1999).

Phospholipidhydroperoxid Glutathionperoxidase (PHGPx)

Die PHGPx wird v.a. in endokrinen Geweben und in mit der Reproduktion assoziierten Organen exprimiert. Dementsprechend wurden bei Ratten in den Testes die höchsten PHGPx-Aktivitäten gemessen, welche um das 15-fache höher lagen als in Leber und Niere (LEI et al. 1998).

Die PHGPx kommt sowohl als lösliche als auch als membrangebundene Form vor (GLADYSHEV und HATFIELD 1999). Sie vermag Phospholipidhydroperoxide zu reduzieren und dadurch Lipidperoxidation in Biomembranen zu verhindern. Da die PHGPx ebenso Hydroperoxide in HDL und LDL reduziert, wird über eine Rolle bei der Entstehung der Arteriosklerose diskutiert. Die ungewöhnlich hohen PHGPx-Spiegel in den Testes lassen auf eine Funktion bei der männlichen Fertilität schließen. PHGPx wird postpuberal in Spermatisden exprimiert und ist dort als aktive Peroxidase nachweisbar. Gegen Ende der Spermienreifung verschwindet das Glutathion und jegliche PHGPx-Aktivität. PHGPx reagiert nun mit Protein-SH-Gruppen und polymerisiert mit sich selbst und anderen Proteinen zu dem keratinartigen Material der Kapsel. Gesteuert durch Gonadotropin und Testosteron verwandelt sich demnach PHGPx während der Spermatogenese in ein enzymatisch inaktives Strukturprotein. Im Mittelstück der Spermien macht diese Form der PHGPx mindestens 50 % des Kapselmaterials aus, so dass dadurch die mechanische Instabilität des Mittelstücks von Spermien im Se-Mangel erklärt werden kann (URSINI et al. 1999).

Die Aktivität der PHGPx wird in Leber, Herz, Lunge und Niere auch unter langanhaltendem Se-Mangel aufrechterhalten (WEITZEL et al. 1990). Da sich unter diesen Bedingungen die Aktivität der cGPx bereits auf minimalem Niveau befindet, ist die

zusätzliche Bestimmung der PHGPx-Aktivität zur adäquaten Charakterisierung des Se-Status nach einem längeranhaltenden Se-Mangel sinnvoll.

2.1.4.2 Jodthyronin-Dejodinasen (5'DI)

Durch die Dejodinasen I (5'DI-I) und II (5'DI-II) ist Se an der Aktivierung des Schilddrüsenhormons Thyroxin (T_4) zum biologisch aktiveren Trijodthyronin (T_3) beteiligt. Die enzymatische Inaktivierung von T_4 zu reversem T_3 (rT_3) erfolgt durch ein weiteres Isoenzym, die 5-Jodthyronin-Dejodinase, Typ III (5'DI-III). Dadurch wird die lokale Verfügbarkeit und Konzentration von T_3 durch die Dejodinasen kontrolliert (KÖHRLE et al. 2000). Alle drei Isoenzyme werden von unterschiedlichen Genen codiert und zeigen unterschiedliche gewebe- und entwicklungspezifische Expressionsmuster (KÖHRLE 2000).

Typ I der Dejodinasen ist vorwiegend in Schilddrüse, Leber, Niere und ZNS lokalisiert. Die Rolle der 5'DI-I wird in der Abgabe von T_3 ins Plasma und in der Inaktivierung von T_3 und T_4 angesehen. Typ II ist vorwiegend im Gehirn, ZNS, braunen Fettgewebe und Hirnanhangsdrüse zu finden und bildet in diesen Geweben lokal durch Dejodierung T_3 . Dadurch ist ein schnell reagierender sensitiver Mechanismus vorhanden, mit dem die Verfügbarkeit von T_3 für Wachstum, Differenzierung und Entwicklung auf Ebene der spezifischen Gewebe fein reguliert werden kann.

5'DI-III katalysiert eine Dejodierung im inneren Ring der Schilddrüsenhormone, so dass T_4 in die inaktive Form rT_3 bzw. T_3 zu inaktivem T_2 umgewandelt wird. 5'DI-III wird in der Haut, ZNS, Plazenta und in der fetalen und neonatalen Leber exprimiert, jedoch nicht in der adulten Leber, Niere und Schilddrüse (KÖHRLE 2000). Diese Distribution lässt auf eine Aufgabe in der Regulation der Schilddrüsenhormone in der fetalen Entwicklung schließen.

Ein Se-Mangel bei Ratten führt zu einem Abfall der 5'DI-I-Aktivität in Leber und Niere, welches einhergeht mit einem Abfall der T_3 - und einem Anstieg der T_4 -Konzentrationen im Plasma (ARTHUR und BECKETT 1999). Die Aktivität der 5'DI-I in der Schilddrüse dagegen zeigt nur eine schwache Antwort auf wechselnde Se-Spiegel (MEINHOLD et al. 1993). Für die Expression der 5'DI-II konnte bislang keine direkte Abhängigkeit vom Se-

Status ermittelt werden, wohingegen für die 5'DI-III im massiven Se-Mangel ein Abfall der Expression festgestellt wurde (KÖHRLE 2000). So lässt sich insgesamt nur ein geringer Effekt des Se auf die Aktivität der Dejodinasen ableiten, wodurch die 5'DI-I in der Hierarchie der Selenoproteine vor der cGPx, gleichauf mit der PHGPx angesiedelt wird.

2.1.4.3 Thioredoxinreduktasen (TrxR)

Zu den Selenoproteinen zählen weiterhin die TrxR, bei denen es sich um NADPH-abhängige, homodimere Flavoenzyme handelt. 1996 wurde von GLADYSHEV et al. gezeigt, dass in den TrxR der Säugetiere ein Selenocystein-Rest vorkommt, welcher für die katalytische Aktivität des Enzyms essentiell ist. Die TrxR der Bakterien hingegen zählen nicht zu den Selenoproteinen. Die Untereinheiten der bakteriellen Enzyme besitzen ein Molekulargewicht von 35 kDa und eine Flavin- sowie eine redox-aktive Thiol-Gruppe je Untereinheit. Sie sind substratspezifisch für Thioredoxin (Trx) mit einem geringen Molekulargewicht. Im Säugerorganismus dagegen sind die Untereinheiten der TrxR 55 kDa schwer und besitzen neben einer Flavin- und einer Thiol-Gruppe eine dritte redox-aktive Einheit, welche den Selenocystein-Rest beinhaltet. Die Einheit wirkt als eine Art "Shuttle" für den Transfer von reduzierenden Äquivalenten vom Inneren des Enzyms an die Aussenseite zur Übertragung auf das Substrat (WILLIAMS et al. 2000). Aufgrund dieser Eigenschaften besteht bei den TrxR der höheren Organismen eine hohe Substratvielfalt. So werden neben Trx z.B. Dehydroascorbinsäure (MAY et al. 1998), Selenodiglutathion, Selenit (BJÖRNSTEDT et al. 1995b), p53 (CASSO und BEACH 1996) und Lipidhydroperoxide (BJÖRNSTEDT et al. 1995a) reduziert. Dadurch sind die TrxR an den verschiedensten Stoffwechselwegen beteiligt (ARNÉR und HOLMGREN 2000).

Die Hauptaufgabe des Substrates Trx liegt in der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten für enzymatische Reaktionen, z.B. für die Thioredoxinperoxidase und die Ribonukleotidreduktase. Somit ist die TrxR indirekt an der Entgiftung von H_2O_2 und an der Synthese der Desoxynukleotide für die DNA-Synthese beteiligt. Dadurch werden die Trx als Stimulatoren des Zellwachstums angesehen. Durch Modulation von Thiolgruppen können darüber hinaus redox-sensitive Transkriptionsfaktoren reguliert und dadurch die Genexpression verändert werden (MUSTACICH und POWIS 2000).

In Abbildung 2 sind die Funktionen der TrxR und Trx zusammenfassend dargestellt.

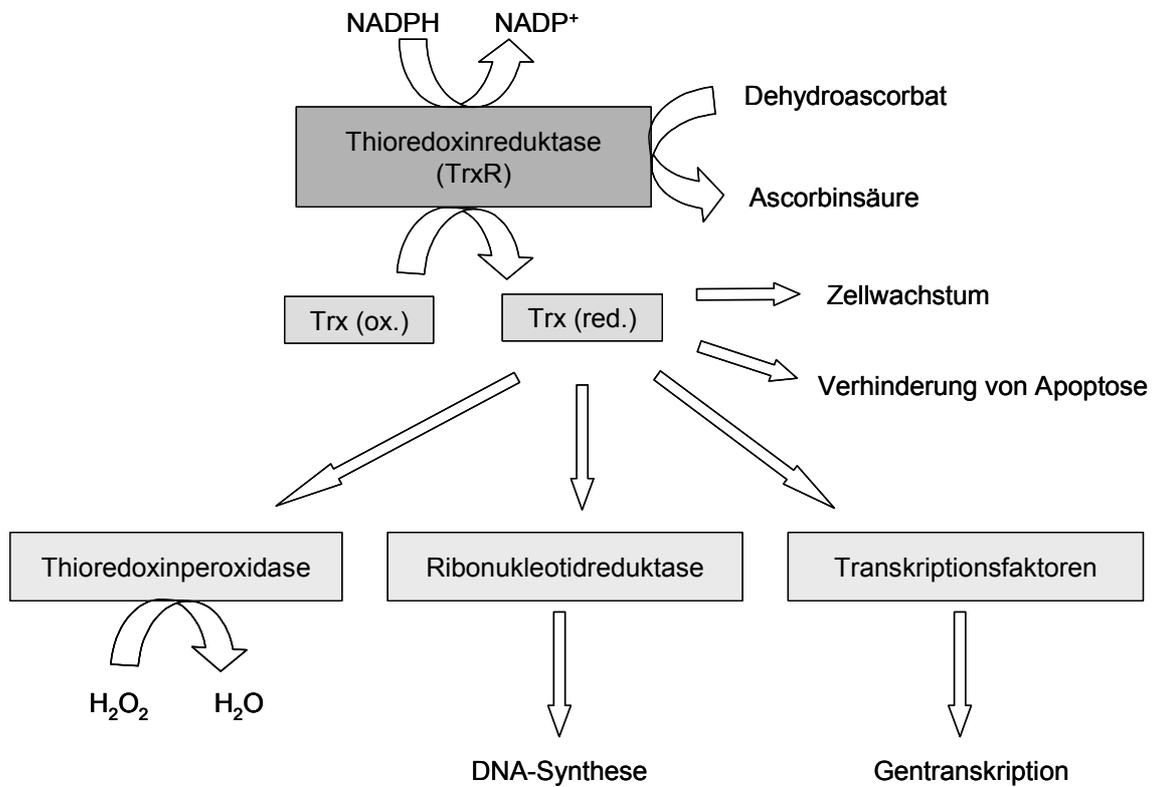


Abbildung 2: Überblick über die Funktionen von Thioredoxin und Thioredoxinreduktase, modifiziert nach MUSTACICH und POWIS (2000)

Die Zugabe von 1 μM Se zum Medium kultivierter MCF-7 Krebszellen erhöhte deren zelluläre TrxR-Aktivität um das 37-fache (GALLEGOS et al. 1997). *In vivo* Daten belegten, dass eine Se-Mangeldiät bei Ratten zu einer niedrigeren TrxR-Aktivität in Leber, Niere und Lunge führte, nicht jedoch im Gehirn (HILL et al. 1997). Steigende Se-Konzentrationen lassen die TrxR-Aktivitäten ansteigen, welche jedoch nicht mit einem Anstieg im Protein-Spiegel assoziiert sind (BERGGREN et al. 1999). Daher wird der Anstieg der Aktivität hauptsächlich auf eine höhere Inkorporation von Se und damit auf eine höhere spezifische Aktivität zurückgeführt.

Darüber hinaus wurden kürzlich weitere TrxR bei Ratte und Mensch entdeckt und als Selenoenzyme erkannt (GASDASKA et al. 1999; LEE et al. 1999, SUN et al. 1999), wobei ein Enzym (TrxR2) hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert zu sein scheint. Die Synthese aller TrxR hingegen findet im Cytosol statt.

2.1.4.4 Selenophosphatsynthetase 2 (SPS2)

Die SPS2 wurde 1996 als Selenoenzym entdeckt (GUIMARAES et al. 1996). Dieses ubiquitär vorkommende, 50 kDa schwere Enzym katalysiert die ATP-abhängige Aktivierung von Se zu dem für die Biosynthese der Selenoproteine essentiellen Selenophosphat (siehe Kapitel 2.1.5). SPS2 ist homolog zu der 1995 beschriebenen Selenophosphatsynthetase 1 (SPS1) (LOW et al. 1995), welche jedoch kein Selenoenzym darstellt. Somit existieren mindestens zwei Selenophosphat-bildende Enzyme, von denen SPS2 das aktivere zu sein scheint (GUIMARAES et al. 1996). Da SPS2 wahrscheinlich an seiner eigenen Biosynthese beteiligt ist, wäre ein autoregulatorischer Mechanismus denkbar, welcher im Se-Mangel die Synthese der Selenoproteine regulieren könnte (GLADYSHEV und HATFIELD 1999).

2.1.4.5 Weitere Selenoproteine

Selenoprotein P (SeLP)

SeLP ist bislang das einzige Selenoprotein, welches mehr als ein Selenatom pro Polypeptidkette enthält. Es wird in der Leber synthetisiert und als glykosyliertes Protein ins Plasma abgegeben (WOLFFRAM 2000). Somit stellt es neben der pGPx das zweite extrazelluläre Selenoprotein dar. Bei einer ausreichend mit Se versorgten Ratte entfallen ca. 60-70 % des gesamten Plasmaselens auf SeLP (READ et al. 1990).

Die genaue Funktion von SeLP ist nicht bekannt. Der Se-Gehalt, das Vorkommen im Plasma und eine hohe Umsatzrate deuten auf eine Transport- und Speicherfunktion für Se bei der Ratte hin. Da das Se jedoch kovalent gebunden im Protein vorliegt, müsste dieses zunächst abgebaut werden, um so das Se freizusetzen. In Studien mit radioaktiv markiertem SeLP konnte keine Se-Aufnahme in die Gewebe mit Ausnahme vom Gehirn nachgewiesen werden (MOSTERT 2000). Dies macht SeLP als Transportprotein weniger wahrscheinlich. Da pro-inflammatorische Cytokine und TNF α die Aktivität des SeLP Promoters und somit die Proteinexpression *in vitro* in Leberzellen herabsetzen, wäre SeLP als negatives Akute-Phase-Protein denkbar (DREHER et al. 1997a). Weiterhin wird es aufgrund einer hohen Anzahl an Histidin- und Cysteinresten als Chelator von

Schwermetallen (BURK und HILL 1994) bzw. aufgrund der Selenocysteinreste als Antioxidanz diskutiert (HILL und BURK 1997). Da SelP eine hohe Affinität zu Endothelialzellen besitzt, könnte der antioxidative Effekt im Besonderen im vaskulären System von Bedeutung sein (BURK et al. 1997). Unterstützt wird diese Hypothese durch den Befund, dass SelP das in Endothelialzellen häufig generierte Peroxynitrit und damit dessen schädigende Wirkung zu reduzieren vermag (ARTEEL et al. 1998). SelP kann darüber hinaus analog zur PHGPx Phospholipidhydroperoxide reduzieren, nicht jedoch Hydrogenperoxid, so dass es als extrazelluläre PHGPx funktionieren könnte (SAITO et al. 1999).

Bei einer Repletion Se-defizienter Ratten zeigte sich verglichen mit cGPx und pGPx, eine Präferenz im Se-Einbau in das SelP (YANG et al. 1989). Im Mangel dagegen fällt die SelP-Menge im Plasma analog zu den Aktivitäten der cGPx und pGPx ab.

Selenoprotein W (SelW)

Aus dem Muskelgewebe von Ratten wurde ein weiteres, als SelW bezeichnetes Selenoprotein isoliert (VENDELAND et al. 1993). Darüber hinaus wurde SelW auch in Gehirn, Testes und Milz nachgewiesen, wohingegen die Leber nur sehr geringe Konzentrationen aufweist (YEH et al. 1997).

Bislang ist die Funktion dieses Selenoproteins unbekannt. Die Tatsache, dass SelW an Glutathion gebunden vorkommt, lässt auf eine Redoxfunktion schliessen. GU et al. (2000) zeigten, dass in der Peptidkette von SelW eine Aminosäuresequenz auftaucht, die mit der Calcium-bindenden Sequenz von Calmodulin weitgehend übereinstimmt. Daher wird eine Funktion von SelW bei der Regulation des zellulären Calcium-Stoffwechsels vermutet.

Ein Se-Mangel führt zu einem Abfall der SelW-Konzentrationen in den Geweben. Dabei wird es zunächst im Muskel abgebaut, später in Milz und Testes, während im Gehirn die Konzentrationen aufrechterhalten werden.

2.1.5 Seleneinbau in Selenoproteine

Der Mechanismus des Se-Einbaus in die Selenoproteine wurde für die Prokaryonten bereits weitestgehend aufgeklärt (BÖCK et al. 1991). Es konnten vier für die bakterielle Selenoproteinsynthese essentielle Gene identifiziert werden (*selA-selD*). Bei Eukaryonten sind die entsprechenden Mechanismen komplizierter und nicht in allen Einzelheiten bekannt. Das Modell in Abbildung 3 fasst die bisherigen Ergebnisse zusammen.

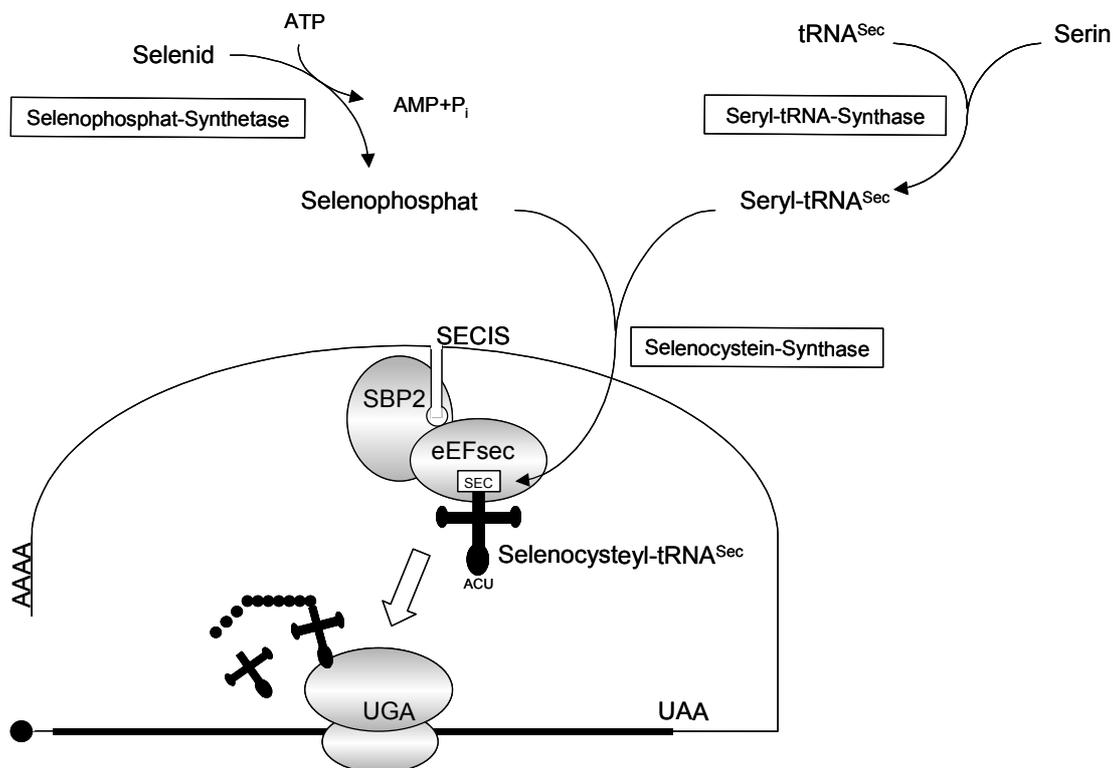


Abbildung 3: Modell für den cotranslationalen Einbau von Selenocystein in Selenoproteine bei Eukaryonten, modifiziert nach LOW und BERRY (1996), MANSELL und BERRY (2001).

Se liegt in den Selenoproteinen in Form von Selenocystein vor. Es wird jedoch kein intaktes Selenocystein aus der Nahrung oder aus dem Abbau von Selenoproteinen in die Peptidkette eingebaut, sondern über eine cotranslationale Modifikation eines Seryl-Restes. Dazu steht eine spezifische tRNA (tRNA^{Sec}, homolog zu *selC* in Prokaryonten) zur Verfügung, die zunächst mit Serin beladen wird (LOW und BERRY 1996). Die Selenophosphatsynthetase (*selD* Homolog) katalysiert die Synthese von Selenophosphat

aus Selenid und ATP. Dadurch wird ein aktivierter Selendonator für die Umwandlung der Seryl-tRNA^{Sec} zur Selenocysteyl-tRNA^{Sec} geschaffen. Diese Reaktion wird durch die Selenocystein-Synthase (das Produkt des SELA-Gens, homolog zu *selA*) katalysiert. Da der Einbau von Selenocystein an der Stelle eines UGA Codons stattfindet, besitzt die tRNA ein zu UGA complementäres Anticodon. Das Recodieren des UGA Codons vom Stop-Codon zum Codon für Selenocystein wird durch die Präsenz einer spezifischen Stammschleifenstruktur in der Selenoprotein mRNA, das sog. SECIS-Element (Selenocysteine Insertion Sequence) determiniert. Dieses befindet sich bei Eukaryoten in der 3'-untranslatierten Region. Für den Einbau wird weiterhin ein für die tRNA^{Sec} spezifischer Elongationsfaktor (*eEFsec*, *selB* Homolog) benötigt. Kürzlich konnte ein weiteres Protein, das SBP2 (SECIS-bindendes Protein 2) aufgereinigt und charakterisiert werden (COPELAND und DRISCOLL 1999), welches ebenfalls für die Inkorporation von Selenocystein essentiell ist. Es wird vermutet, dass zunächst die Bindung von SBP2 an das SECIS-Element stattfindet, gefolgt von einer Bindung des tRNA^{Sec}-eEFsec-Komplexes an SBP2 (MANSELL und BERRY 2001). Dieser Komplex kann so mit den Ribosomen interagieren und den Einbau von Selenocystein am UGA-Codon bewirken.

2.1.6 Regulation der Expression von Selenoproteinen

Die Biosynthese der Selenoproteine hängt in erster Linie von der Verfügbarkeit von Se und damit der Bildung von tRNA^{Sec} ab. Im Se-Mangel wird das UGA-Codon als Stop-Codon interpretiert, was zu einem Abbruch der Synthese führt. Der Verlust der Aktivität ist jedoch nicht nur auf eine reduzierte Proteinbiosynthese zurückzuführen, sondern auch auf eine verminderte Stabilität der entsprechenden mRNA (CHRISTENSEN und BURGNER 1992, BERMANO et al. 1995). Wie in Kapitel 2.1.4 erwähnt, folgt im Se-Mangel der Se-Einbau in die Selenoproteine einer strikten Hierarchie. Dieses Phänomen, ebenso wie der unterschiedliche Aktivitätsverlust eines Enzyms in verschiedenen Organen, ist bis heute nicht geklärt. Es wird allerdings diskutiert, dass über das SECIS-Element die spezifischen Antworten der Selenoproteine auf einen Se-Mangel zustande kommen, da sich gezeigt hat, dass Proteine, welche in ähnlichen Positionen in der Hierarchie rangieren, auch ähnliche Strukturen in der SECIS-Region besitzen

(MUSTACICH und POWIS 2000). Weiterhin scheint die UGA-Umgebung sowie der Abstand von UGA zum SECIS-Element einen Einfluss zu haben (SUNDE 2001). Die Stabilität der mRNA wiederum könnte über RNA-bindende Proteine mit Se-reagierenden Elementen moduliert werden. Ebenso scheint Vitamin E einen stabilisierenden Effekt auf die mRNA der cGPx auszuüben (LI et al. 1996).

Neben Se-abhängigen Faktoren, welche die Expression der Selenoproteine beeinflussen, existieren auch Se-unabhängige Einflussfaktoren. So weisen die Selenoproteine z.B. eine unterschiedliche Verteilung in den Geweben auf; die cGPx wird ubiquitär exprimiert, während die Gi-GPx ausschließlich im Gastrointestinaltrakt zu finden ist. Diese z.T. ungewöhnlichen Expressionsmuster deuten auf spezialisierte Aufgaben in den entsprechenden Geweben hin. Bis heute konnte die molekulare Basis für diese gewebespezifische Expression nicht entschlüsselt werden (KÖHRLE et al. 2000). Darüber hinaus zeigen die Selenoproteine eine Hormon-abhängige Regulation. Die Expression von TrxR wird in Monocyten durch 1,25-Dihydroxycholecalciferol (SCHÜTZE et al. 1999) und in fetalen Osteoblasten-ähnlichen Zellen durch Cytokine und Wachstumsfaktoren moduliert (SCHÜTZE et al. 1998). Die Expression der Dejodinasen ist abhängig von Schilddrüsenhormonen, Retinoiden, Sexualhormonen, Gluco- und Corticosteroiden sowie Wachstumsfaktoren und Cytokinen (JAKOBS et al. 1997, SCHMUTZLER et al. 1998). Für PHGPx wird eine Sexualhormon-abhängige Expression vermutet (KÖHRLE et al. 2000). Eine Induktion der Selenoprotein-Gene durch oxidativen Stress konnte bisher *in vivo* nicht belegt werden, während *in vitro* von COWAN et al. (1993) für die cGPx ein Sauerstoff-sensibles Element entdeckt wurde.

2.2 Vitamin E und Selen

Vitamin E (VE) wurde von EVANS und BISHOP 1922 entdeckt. Es wird im allgemeinen als das wichtigste Antioxidanz im lipophilen Milieu der Biomembranen angesehen (BURTON und INGOLD 1989). VE ist der Sammelbegriff für alle Tocol- und Tocotrienol-Derivate, die qualitativ die biologische Aktivität von α -Tocopherol besitzen. Sie bestehen aus einem Chromanring, der eine unterschiedliche Anzahl an Methylgruppen und die für die antioxidative Wirkung unentbehrliche Hydroxylgruppe trägt. Weiterhin enthalten sie eine für die Lokalisation in der Biomembran essentielle lipophile Seitenkette aus drei Isoprenmolekülen (FARRELL und ROBERTS 1994).

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind eine Reihe verschiedener antioxidativer Wirkmechanismen des VE bekannt. VE scheint mit reaktiven Sauerstoff-Spezies direkt zu reagieren (SIES und STAHL 1995) und vermag so die Initiierung einer Lipidperoxidation oder die Oxidation von z.B. LDL zu verhindern. Weiterhin besitzt VE die Fähigkeit, die Lipidperoxidation zu unterbrechen, indem es auf die reaktiven Alkoxy- und Peroxyl-Radikale der Fettsäuren ein Wasserstoff-Atom überträgt und somit selbst zum Radikal wird. Diese α -Tocopheroxyl-Radikale können u.a. mittels Ascorbinsäure und Glutathion reduziert und dadurch regeneriert werden (PACKER und LANDVIK 1989). In Abbildung 4 ist das antioxidative Netzwerk mit den Interaktionen zwischen VE, Vitamin C und Glutathion dargestellt.

Darüber hinaus konnte 1991 erstmals gezeigt werden, dass α -Tocopherol eine von seiner Aufgabe als Antioxidanz bzw. Radikalfänger unabhängige Funktion besitzt (BOSCOBOINIK et al. 1991). So hemmt α -Tocopherol die Proteinkinase C post-transkriptional und nimmt dadurch indirekt Einfluss auf zelluläre Prozesse (Stressantwort, Zelladhäsion, Zellwachstum, Apoptose). β -Tocopherol, welches eine ähnliche antioxidative Kapazität wie α -Tocopherol besitzt, zeigt diesen Effekt nicht. Die Hemmung wird auf eine Dephosphorylierung der Proteinkinase C durch die Proteinphosphatase 2A zurückgeführt, deren Aktivität *in vitro* durch α -Tocopherol gesteigert wird (RICCIARELLI et al. 1998). Die katalytische Aktivität der Proteinkinase C wird zudem über den „Second-Messenger“ Diacylglycerol bestimmt, dessen Synthese ebenfalls durch α -Tocopherol über Aktivierung der Diacylglycerolkinase gehemmt wird. Weiterhin hemmt α -Tocopherol die Aktivität der cytosolischen Phospholipase A2 und der Cyclooxygenase, welche in der

Bildung der Eicosanoide eine wichtige Rolle spielen (WU et al. 2001). Darüber hinaus moduliert α -Tocopherol die transkriptionale Regulation der Gene von Collagen $\alpha 1$ (CHOJKIER et al. 1998), α -Tocopheroltransferprotein (TTP) (FECHNER et al. 1998), α -Tropomyosin (ARATRI et al. 1999) und Collagenase (RICCIARELLI et al. 1999). Kürzlich wurde ein Tocopherol-abhängiger Transkriptionsfaktor (Tocopherol-assoziiertes Protein, TAP) entdeckt (STOCKER et al. 1999).

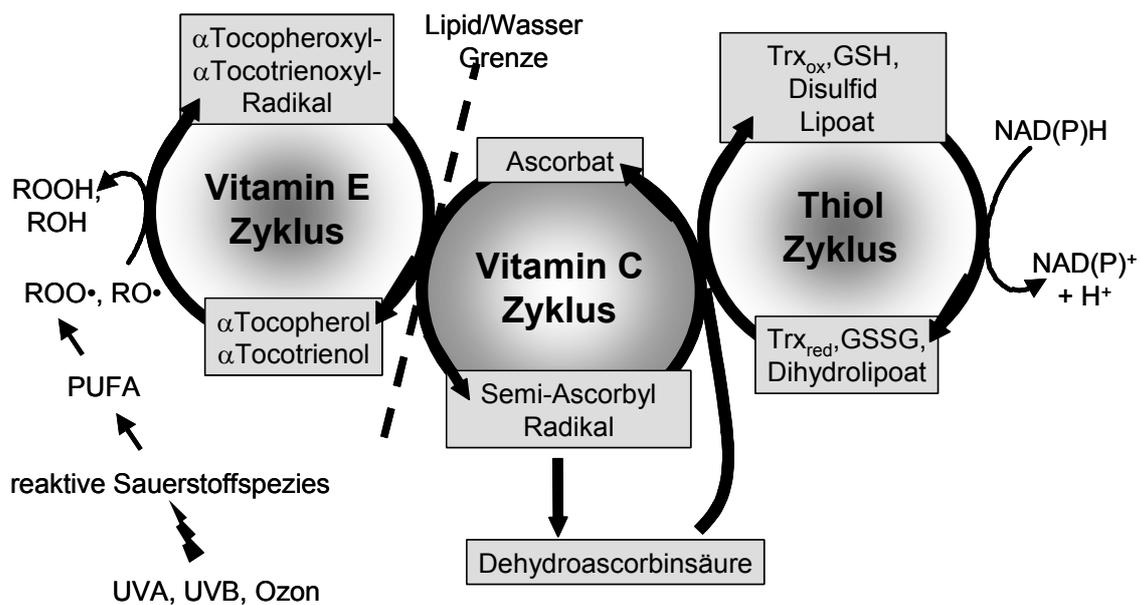


Abbildung 4: Interaktionen im antioxidativen Netzwerk zwischen Vitamin E, Vitamin C und Thiolredoxcyclen, modifiziert nach (PACKER et al. 2001).

Zusammenfassend sind in Tabelle 3 wichtige Ergebnisse in der VE-Forschung in einem historischen Überblick dargestellt.

Tabelle 3: Wichtige Ergebnisse in der experimentellen Vitamin E-Forschung.

Die Entdeckung von Vitamin E	
1922	Vitamin E wird erstmals von Evans und Bishop beschrieben als ein fettlöslicher Faktor (Faktor X), welcher für die normale Reproduktionsfähigkeit bei Ratten notwendig ist.
1924	Sure gibt dem Faktor X den Namen Vitamin E.
1925	Evans schlägt das Wort <i>Tocopherol</i> für die Benennung vor, abgeleitet aus dem griechischen "tos" für Geburt, „phero“ für Stärke bringend und „ol“ für die Alkoholgruppe des Moleküls.
Der Anfang der Vitamin E-Forschung (Darstellung von Struktur und Funktionen)	
1930	Charakterisierung von Vitamin E-Mangelsymptomen in verschiedenen Tierspezies (Hodenatrophie, Fetusresorption, Encephalomalazie, mit dystrophiertem Muskelgewebe assoziierte Lähmungen).
1938	Fernholz entschlüsselt die Struktur von Vitamin E.
1938	Synthese von Vitamin E durch Karrer .
1967	Studie von Bunyan et al. über den Einfluss von Vitamin E auf mehrfach ungesättigte Fettsäuren.
1968	Vitamin E wird erstmals als ein essentieller Faktor in der Humanernährung in die Empfehlungen des amerikanischen „Food and Nutrition Board“ aufgenommen.
Die Aktuelle Vitamin E-Forschung (Charakterisierung der antioxidativ-unabhängigen Funktion und Einfluss von Vitamin E auf die Genexpression)	
1991	Nachweis von Boscoboinik et al., dass die durch α -Tocopherol bedingte Hemmung der Proliferation von glatten Muskelzellen durch eine Modulation der Proteinkinase C erfolgt.
1998	Entdeckung von Fechner et al., dass die Expression von TTP in der Leber durch α - und δ -Tocopherol induziert wird.
1998	Nachweis eines Einflusses von α -Tocopherol auf die Transkription des Collagen α 1-Gens (Chojkier et al.).
1999	Nachweis von Aratri et al., dass α -Tocopherol die Transkription des α -Tropomyosin-Gens steigert.
2001	Vermutung, dass α -Tocopherol über den Transkriptionsfaktor TAP die Expression von Genen beeinflussen kann (Yamauchi et al.).

Synergistische Effekte zwischen VE und Se sind bereits seit der Entdeckung bekannt, dass Se eine VE-Mangel-induzierte Lebernekrose bei Ratten zu verhindern vermag (SCHWARZ und FOLTZ 1957). Eine Erklärung für diesen Effekt lieferte allerdings erst die Entdeckung der Se-abhängigen PHGPx (MAIORINO et al. 1989). Die PHGPx fängt ebenso wie VE Peroxyl- und Alkoxy-Radikale ab und führt somit zum Abbruch der Kettenreaktion im Rahmen einer Autoxidation von ungesättigten Membranlipiden. Weiterhin wurde gezeigt, dass die TrxR Dehydroascorbinsäure und Ascorbyl-Radikale zu Ascorbat regeneriert (MAY et al. 1997). Da Ascorbat wiederum Tocopheryloxylradikale *in vitro* zu Tocopherol reduzieren kann, ist damit ein weiterer hypothetischer Ansatz zur Erklärung der Verbindung zwischen Se und VE gegeben (BURK und HILL 1999).

2.2.1 Folgen eines Selen- und/oder Vitamin E-Mangels bei der Ratte

Durch Erzeugung eines Se- und/oder VE-Mangels bei der Ratte nehmen die Aktivitäten der Selenoproteine nach der bereits beschriebenen Hierarchie (siehe Kapitel 2.1.4) sowie die Konzentrationen an α -Tocopherol in den Organen ab. Aufgrund des weiten Funktionsspektrums der Selenoproteine und des α -Tocopherols kann es durch den Mangel zu verschiedenen Folgereaktionen und -schäden kommen, welche nachfolgend näher beschrieben werden.

2.2.1.1 Auswirkungen auf antioxidative Schutzmechanismen

Glutathionmetabolismus

Glutathion (L- γ -Glutamyl-L-Cysteinylglycin, GSH) ist das vorherrschende Thiol in Säugetierzellen mit intrazellulären Konzentrationen von 0,5-10 mM (SHAN et al. 1990). GSH spielt eine herausragende Rolle im zellulären Schutz vor oxidativem Stress (GRIFFITH 1999), in dem es schnell und nicht-enzymatisch mit Hydroxylradikalen, Peroxynitrit und dem Superoxid-Anion reagiert (KALYANARAMAN et al. 1996, LUPERCHIO et al. 1996, BRIVIBA et al. 1999). Weitere physiologische Funktionen von GSH, wie Speicherung und Transport von Cystein, Regulation des zellulären

Redoxgleichgewichts, Leukotrien- und Prostaglandin-Metabolismus, Immunfunktion und Zellwachstum wurden beschrieben (SIES 1999). Über die Reaktion der Glutathionperoxidasen nimmt GSH darüber hinaus an der Detoxifikation von Hydrogenperoxiden und Lipidperoxiden teil. All diese Reaktionen führen direkt oder indirekt zu der Bildung von Glutathiondisulfid (GSSG), welches wiederum mit Hilfe der Glutathionreduktase (GR) NADPH-abhängig zu GSH reduziert werden kann (Abbildung. 5).

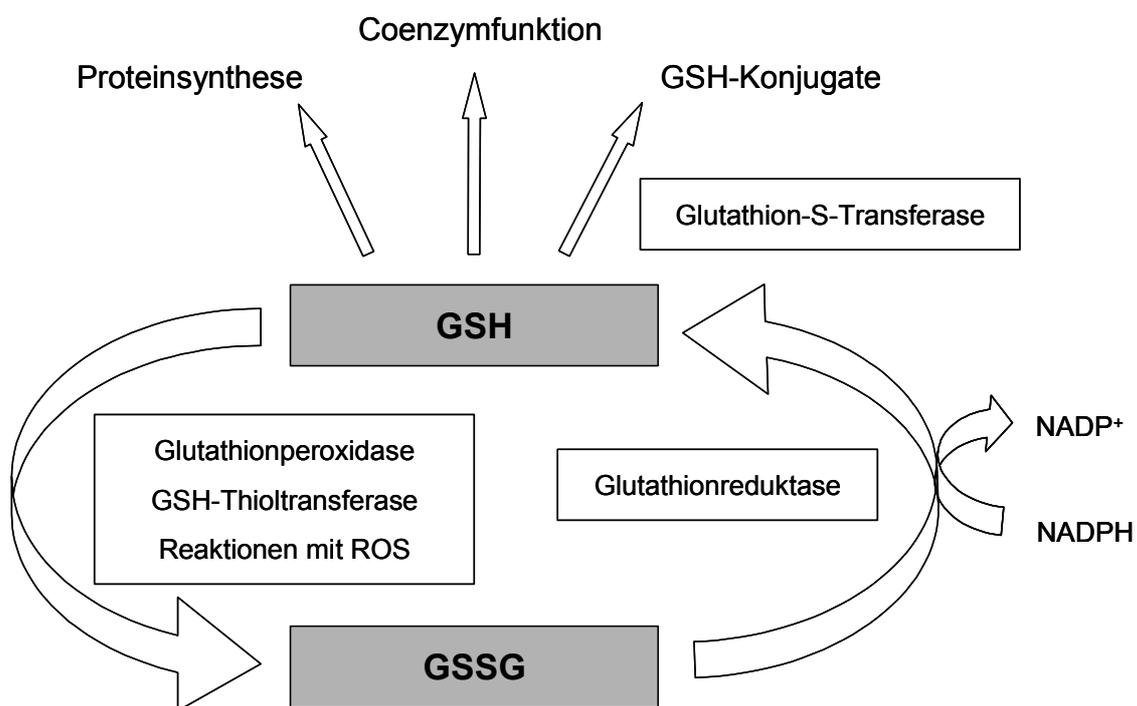


Abbildung 5: Überblick über den Glutathionmetabolismus, modifiziert nach ANDERSON (1998)

Unter Normalbedingungen kann mit Hilfe der GR ein Verhältnis von GSH zu GSSG von >100 aufrechterhalten werden. Im Falle eines erhöhten oxidativen Stresses, wie er z.B. im Se- oder VE-Mangel auftritt, bzw. einer insuffizienten GR-Aktivität (z.B. ausgelöst durch eine NADPH-Depletion) kann GSSG akkumulieren. Dies führt zu einer Veränderung des Thiol-Redoxstatus der Zelle und kann dadurch die Aktivierung redox-abhängiger Transkriptionsfaktoren auslösen (SEN und PACKER 1996). Des weiteren

kommt es zu einer erhöhten *de novo* Synthese von GSH (GRIFFITH 1999) und zu einer Abgabe von GSSG ins Blut (BRAY und TAYLOR 1993).

Durch den Abfall der Aktivität der Glutathionperoxidasen im Se-Mangel wäre einerseits eine verminderte Produktion an GSSG (JENKINSON et al. 1987), andererseits durch den erhöhten oxidativen Stress eine Anreicherung an GSSG möglich. HILL und BURK (1982) konnten zwar keine Unterschiede in der GSH-Konzentration in der Leber von Se- bzw. VE-depletierten Ratten feststellen, jedoch zeigten die Se-depletierten Hepatocyten eine Verdopplung der Glutathionsynthese und eine Abgabe der zweifachen Menge an GSH ins Plasma. Dies führte analog zu einer Zunahme der GSH-Eliminierung aus dem Plasma durch die Nieren (HILL und BURK 1985).

GSH dient nicht nur den Se-abhängigen GPx als Substrat, sondern auch den Glutathion-S-Transferasen (GST) (BRAY und TAYLOR 1993). Die GST katalysieren in der Leber die GSH-Konjugation auf elektrophile Gruppen (z.B. Xenobiotica). Die dabei entstehenden Verbindungen können über die Galle ausgeschieden und somit detoxifiziert werden. Daher zählen die GST zu den „Phase II“-Enzymen (SUNDE 1997). LAWRENCE et al. (1978) erhielten in Chromatogrammen von Leberhomogenaten von Ratten zwei Peaks mit Glutathionperoxidase-Aktivität, von denen der eine Peak auch im Se-Mangel bestehen blieb. Dieser Peak zeigte Aktivität bei organischen Hydroperoxiden, dagegen nicht bei Hydrogenperoxid. Diese Se-unabhängige Glutathionperoxidase-Aktivität wurde der GST zugesprochen. Im Se-Mangel steigt bei Ratten diese Aktivität in der Leber an (HILL et al. 1987), so dass vermutet wird, dass die GST zum Teil kompensatorisch für die Se-abhängige GPx eintreten kann.

Auch durch den VE-Status wird eine Modulation der GSH-Synthese und/oder GSH-Oxidation angenommen, nachdem bei VE-defizienten Ratten in Erythrocyten (CHOW 1979), bzw. im Vollblut (CHEN und THACKER 1986) eine verminderte Konzentration an GSH festgestellt wurde. In Muskel und Leber dagegen konnte bei Ratten im VE-Mangel ein Anstieg des GSH-Spiegels gemessen werden, welcher als eine kompensatorische Antwort auf die VE-Depletion und damit verbundene Lipidperoxidation gewertet wurde (RAFIQUE et al. 2001). Ein weiterer Zusammenhang zwischen VE und GSH wird in der Reduktion und somit Regenerierung des VE-Radikals durch GSH gesehen (SIES 1989).

Vitamin C

Ascorbinsäure schützt als Antioxidanz Zellen vor oxidativem Stress, in dem es Radikale abfängt und dabei in die oxidierte Form (Dehydroascorbinsäure und Ascorbyl-Radikal) übergeht. Die Bestimmung der oxidierten Formen gilt als wichtiger Indikator für oxidativen Stress (BECKER et al. 2000). Für den Erhalt der Ascorbat-Spiegel ist das „Recycling“ von verbrauchtem Ascorbat durch Reduktion der Dehydroascorbinsäure und des Ascorbyl-Radikals essentiell. Da dies durch die TrxR bewirkt werden kann (MAY et al. 1998), vermag Se über die TrxR die zellulären Ascorbat-Speicher aufrecht zu halten. Dementsprechend wurden bei Ratten im Se-Mangel verminderte Ascorbat-Konzentrationen in der Leber festgestellt (MAY et al. 1997).

Die Regenerierung des Tocopheryl-Radikals durch Vitamin C nach Abstraktion eines Hydrogenatoms konnte *in vitro* belegt werden (HO und CHAN 1992). Dennoch wird der Charakter der Interaktionen zwischen VE und Vitamin C *in vivo* kontrovers diskutiert. Vitamin C könnte sowohl das α -Tocopheroxyl-Radikal reduzieren und damit die antioxidative Kapazität des VE wieder herstellen, als auch den Erhalt an VE bewirken, indem es entstandene Radikale abfängt, welche ansonsten VE verbraucht hätten. Studien von HALPNER et al. (1998) an kultivierten Rattenhepatocyten belegen, dass Vitamin C einen Verlust von VE unterbinden kann. Die Autoren vermuten, dass beide Formen der Interaktionen zwischen VE und Vitamin C existieren. TANAKA et al. (1997) konnten *in vivo* den verminderten Verbrauch von VE durch Vitamin C-Gaben bei Ratten in Plasma, Herz, Lunge, Leber und Niere bestätigen. Auf der anderen Seite wurde jedoch ebenfalls ein verminderter Verbrauch von Vitamin C durch VE-Supplementationen festgestellt. Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass ein durch einen VE-Mangel ausgelöster erhöhter oxidativer Stress in der Membran in die hydrophile Region der Zelle übertragen wird, wodurch es zu einem Abfall an Vitamin C als starkes hydrophiles Antioxidanz kommt.

2.2.1.2 Zellschädigungen

Durch die vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffintermediate und den Verlust antioxidativer Kapazitäten im Se- und VE-Mangel kann es zur Schädigung zellulärer

Kohlenhydrate, Proteine, Lipide und Nucleinsäuren kommen. Im Folgenden soll dieser Effekt näher beschrieben werden.

Lipidschädigung

Lipidperoxidation, eine oxidative Schädigung ungesättigter Fettsäuren, ist ein autokatalytischer, unkontrollierter Prozess, welcher zur Bildung von Hydroperoxiden und hochreaktiven Sekundär- bzw. Tertiärprodukten führt (SEVANI und HOCHSTEIN 1985). Dabei wird ein Wasserstoffatom vom Kohlenstoffatom einer ungesättigten Fettsäure abgetrennt, was zur Entstehung eines Lipid-Radikals führt. Die nachfolgende Addition von Sauerstoff resultiert in der Bildung von Peroxyl-Radikalen, welche Endoperoxide oder über Wasserstoffabstraktion von weiteren Fettsäuren Lipidperoxide formieren und so die Reaktionsfolge fortsetzen können (BUEGE und AUST 1978). Im Zuge dessen können eine Vielzahl von Folgeprodukten (Alkohole, Ketone, Aldehyde und Etherverbindungen) entstehen. Zellmembranen und Lipoproteine werden aufgrund ihres Gehalts an Polyenfettsäuren (z.B. Linol- und Linolensäure) zum häufigen Angriffspunkt der Lipidperoxidation (CHEESEMAN 1993).

Zur Erfassung des Ausmaßes der Lipidschädigung wurden zahlreiche Methoden entwickelt, welche auf der Bestimmung eines der Abbauprodukte der Lipidperoxidation beruhen. Der sog. Thiobarbitursäure-Test dient als Nachweis tertiärer Abbauprodukte ungesättigter Fettsäuren (insbesondere Malondialdehyd), die gemeinsam mit Thiobarbitursäure reagieren. Diese photometrische Bestimmung gilt durch die relativ unspezifischen Reaktionen nur als indirektes Maß für die Lipidperoxidation (FRAGA et al. 1988). Weiterhin wird die Bestimmung von F_2 -Isoprostanen, entstanden aus der Peroxidation von Arachidonsäure (AWAD et al. 1994), die Exhalation von Ethan (HAFEMAN und HOEKSTRA 1977) sowie die Konzentration an Hexanal (FRANKEL et al. 1989) und 4-Hydroxynonenal (LAURENT et al. 2000) im Plasma und in den geschädigten Geweben als Maß für die Lipidperoxidation herangezogen.

Die Lipidperoxidation stellt für die Zelle ein großes Problem dar. Auf der einen Seite können Lipidperoxide mit Metallionen interagieren, wobei neue Lipidperoxyl- bzw. Alkoxy-Radikale entstehen und es so zu einer Propagation der Lipidperoxidation kommt

(CHRISTMAN et al. 2000). Auf der anderen Seite führt die Lipidperoxidation zu einer Verschlechterung der Membranfunktion, Herabsetzung der Fluidität, Modifikation der Aktivität bzw. Hydrolyse membrangebundener Enzyme und Rezeptoren sowie zu einer unspezifischen Steigerung der Permeabilität der Ionenkanäle (MÜLLER et al. 1986). Die Sekundärprodukte der Lipidperoxidation, z.B. Malondialdehyd und 4-Hydroxynonenal, können bereits in mikromolaren Konzentrationen die Zelle schädigen, da sie mit Nukleinsäuren und Proteinen (insbesondere mit deren Thiol- und Amino-Gruppen) reagieren und diese somit in ihrer Funktion verändern (HALLIWELL und GUTTERIDGE 1989). Durch die Lipidperoxide kann es weiterhin zu inflammatorischen Prozessen durch Aktivierung der Cyclooxygenase- und Lipoxygenase-Aktivität und dadurch zur Stimulierung der Prostaglandin- und Leukotrien-Produktion kommen (siehe Kapitel 2.2.1.3).

Daher ist es entscheidend für die Zelle, Lipid-Radikale abzufangen. Dies geschieht am effektivsten durch VE, da VE auf die Alkoxy- und Peroxy-Radikale ein Wasserstoff-Atom übertragen kann und es so zu einem Abbruch der Kette kommt. Se bewirkt über die Aktivität der PHGPx eine Reduktion der Lipidhydroperoxid-Konzentration. Die GI-GPx scheint als Barriere gegen die Absorption von mit der Nahrung aufgenommenen Hydroperoxiden zu fungieren. Ein bei Caco-Zellen induzierter Se-Mangel führte zu einer Abnahme der GI-GPx-Aktivität, Verlust der transepithelialen Resistenz und Detektion von Hydroperoxiden auf der basolateralen Seite, während eine Se-Supplementation diese Effekte vollständig aufhob (WINGLER et al. 2000). Untersuchungen zum Effekt eines Se- und/oder VE-Mangels auf die Lipidperoxidation *in vivo* ergaben bei Ratten in den untersuchten Organen (Leber, Niere, Lunge, Muskel, Herz) im Doppelmangel die höchsten Konzentrationen an F₂-Isoprostanen (AWAD et al. 1994). Ein geringerer Anstieg konnte in der VE-Mangelgruppe verzeichnet werden, während ein alleiniger Se-Mangel nicht mit einer erhöhten Lipidperoxidation assoziiert war. Im Gehirn traten insgesamt keine Lipidschädigungen auf. Studien von BURK et al. (1995) zeigten einen durch Se-Injektion hervorgerufenen Effekt auf die Diquat-induzierte Lipidperoxidation in Leber und Plasma von Se-Mangelratten, gemessen anhand verminderter F₂-Isoprostan-Bildung. Dies war assoziiert mit einer steigenden Selp-Bildung, aber unveränderten cGPx- und pGPx-Aktivitäten, so dass Selp als Mediator dieses Se-Effekts angesehen wurde.

Proteinschädigung

Werden Proteine Ziel eines radikalischen Angriffes, kann dies zu einer Oxidation der Aminosäuren führen. Dabei können prinzipiell alle Aminosäurereste betroffen sein, bestimmte Aminosäuren sind jedoch besonders gefährdet. Dazu gehören die schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein, die cyclischen Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin, Tyrosin und Histidin und darüber hinaus Arginin, Lysin, Prolin und Threonin (BERLETT und STADTMAN 1997). Die Oxidation der Aminosäuren führt zur Veränderung von Proteinen und damit bei Enzymen zum Aktivitätsverlust. Die γ -Glutaminsynthetase (γ -GS), welche insgesamt 16 Histidinreste enthält, reagiert sensitiv auf radikalische Angriffe und daher wird ihre Aktivitätsbestimmung oft als Maß für eine Proteinschädigung herangezogen (LIU et al. 2000). Die γ -GS katalysiert die ATP-abhängige Fixierung von Ammoniak auf L-Glutamat und stellt somit ein Schlüsselenzym im zellulären Stickstoffmetabolismus dar. Allerdings fördert sie auch die Aufnahme des Neurotransmitters Glutamat und wird durch Stresshormone wie Glucocorticoide induziert, so dass eine erhöhte Aktivität als eine Stressantwort angesehen werden kann (LIU et al. 2000). Die Oxidation von Aminosäuren in Proteinen führt zu inter- und intramolekularen Umlagerungen, in deren Verlauf es zur Bildung von Proteincarbonylen kommen kann. Die photometrische Bestimmung dieser Proteincarbonyle nach Inkubation mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin zählt weiterhin als ein Maß für die oxidative Proteinschädigung (REZNICK und PACKER 1994).

Die Bestimmung von oxidierten Proteinen reflektiert jedoch nicht nur das Ausmaß der Proteinoxidation, sondern ebenso die Rate des Abbaus der geschädigten Proteine durch Proteasen (BERLETT und STADTMAN 1997). Eine Veränderung der proteinabbauenden Systeme, wie dies über Modulation der Proteasen-Konzentration, Inhibitoren und regulatorische Proteine möglich ist, führt ebenfalls zu einer Anhäufung funktionsunfähiger Proteine. Dies wird mit der Ätiologie von verschiedenen klinischen Syndromen wie Katarakt, Altern, neurologische Degeneration und rheumatische Krankheiten in Verbindung gebracht (CHANG et al. 2000).

CHENG et al. (1999a) konnten zeigen, dass cGPx die durch Paraquat ausgelöste Oxidation von Proteinen *in vivo* zu verhindern vermag. Mäuse mit einem knock-out des cGPx-Gens wiesen nach Paraquat-Injektion im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen

signifikant erhöhte Proteincarbonyl-Spiegel in der Leber auf. Dieser Effekt konnte weder durch VE-Gaben noch durch andere Selenoproteine ersetzt werden (LEI 2001). Dennoch scheint VE ebenfalls einen hemmenden Effekt auf die Proteinschädigung auszuüben. Nach Verabreichung des radikalproduzierenden Agens Dehydroepiandrosteron an Ratten konnte in Lebermikrosomen ein protektiver Effekt durch VE-Supplementation auf die Bildung von Proteincarbonylen erzielt werden (SWIERCZYNSKI und MAYER 1998).

DNA-Schädigung

Nukleinsäuren können durch Sauerstoffradikale auf vielfältige Weise geschädigt werden. Veränderungen an den Basen bilden aufgrund falscher Basenpaarung eine Gefahr für die Entstehung von Mutationen und können somit das Verhalten von Zellen tiefgreifend verändern (POULSEN et al. 2000). Ist der Deoxyriboseanteil betroffen, kann dies Strang- oder Chromosomenbrüche sowie DNA-DNA- bzw. DNA-Protein-Quervernetzungen verursachen (DIZDAROGLU 1991). Oxidative Veränderungen an den Basen können zu Basenaustausch, Insertionen und Abspaltung der Basen und damit zu Lücken in der doppelsträngigen DNA (sog. Apurin/Apyrimidin-Stellen, „AP-Sites“) führen. Sofern diese nicht effektiv repariert werden, kann dies ebenso DNA-Strangbrüche und Leserasterverschiebungen zur Folge haben. Eine der am häufigsten auftretenden Modifikationen ist die C8-Hydroxylierung des Guanins unter Bildung von 8-Hydroxyguanin bzw. des korrespondierenden Nukleosids 8-Hydroxydeoxyguanosin (8OHdG). 8OHdG selbst kann durch Induktion von Transversionen (im besonderen G nach T) mutagen wirken, daher existieren multiple Mechanismen, um 8OHdG und andere geschädigte Basen zu reparieren bzw. aus der DNA zu entfernen (FLOYD 1990). Die Messung von 8OHdG mittels HPLC mit elektrochemischer Detektion stellt eine sensitive Methode zur Bestimmung von DNA-Schäden dar (AMES 1989). Eine erhöhte Konzentration an 8OHdG kann jedoch sowohl durch erhöhte Bildung als auch durch verstärkte Reparaturaktivität zustande kommen. Während die Bestimmung im Urin die durchschnittliche im Organismus entstandene DNA-Oxidation widerspiegelt, stellt die Isolierung von 8OHdG aus Geweben ein Maß für die lokal entstandene Schädigung dar (LOFT et al. 1998).

Der Comet Assay (Einzelzellmikrogelelektrophorese) ist eine weitere Methode zur Messung von DNA-Schäden. Hierbei können Einzel- und Doppelstrangbrüche in der DNA nachgewiesen werden. Die DNA wird in Agarose eingebettet und einem alkalischen Milieu ausgesetzt, was zum Aufbruch der Wasserstoffbrücken führt. Im elektrischen Feld wandern Bruchstücke der DNA in Richtung Anode und bilden einen Schweif aus, während intakte DNA im Kern verbleibt. Nach Anfärbung der DNA kann ein Maß für die Höhe der Schädigung (Tailmoment) aus dem Produkt aus % DNA im Schweif und Lauflänge ermittelt werden, welches mit der Anzahl der Strangbrüche korreliert (SINGH et al. 1988).

Eine protektive Wirkung von VE und Se auf die Entstehung von DNA-Schäden wird in der Literatur kontrovers diskutiert. *In vitro* zeigten kultivierte Zellen nach Se-Supplementation im Medium und dadurch Induktion der cGPx eine niedrigere Rate an Strangbrüchen in mit H₂O₂ inkubierten Zellen (BOUZYK et al. 1997). Ähnliche Ergebnisse wurden bei mit UV-Strahlung gestressten Zellen nach Se-Supplementation ermittelt (EMONET-PICCARDI et al. 1998). *In vivo* Untersuchungen in Leukocyten von Se- bzw. VE-supplementierten Rauchern bzw. Nichtrauchern konnten dagegen keine Veränderungen in den DNA-Schädigungsparametern mit Hilfe des Comet Assays und einer 8OHdG-Bestimmung aufzeigen (WELCH et al. 1999). Bei Mäusen verringerte eine orale VE-Administration jedoch eine durch Zigarettenrauch induzierte DNA-Schädigung in Lungen-, Leber- und Magenmucosazellen signifikant (TSUDA et al. 2000).

2.2.1.3 Selen- und Vitamin E-Mangel assoziierte Folgereaktionen aus den Zellschädigungen

Aus den im VE- und Se-Mangel entstandenen Zellschädigungen können Folgereaktionen hervorgehen, wie z.B Inflammation, nekrotischer und apoptotischer Zelluntergang bzw. Entartung von Zellen. Diese sollen nachfolgend näher beschrieben werden.

Apoptose und Nekrose

Das Absterben von Zellen kann sowohl durch nekrotische als auch durch apoptotische Prozesse eingeleitet werden. Ein nekrotischer Zelltod ist charakterisiert durch eine Ruptur der Plasmamembran und nachfolgendem Austritt von zellulären Bestandteilen, wodurch es zu einer Aktivierung von Makrophagen und inflammatorischen Prozessen kommt. Zunächst entsteht eine charakteristische Blasenformation der Plasmamembran. Bricht diese auf, kommt es zu einem Verlust der intrazellulären Ionenhomöostase, zu einer Zerstörung des mitochondrialen Membranpotentials und dadurch zu einer Abkopplung der Atmungskette mit der ATP-Produktion. Darüber hinaus werden abbauende Hydrolasen (Proteasen, Phospholipasen und Endonukleasen) aktiviert (ROSSER und GORES 1995). Zu den Auslösern zählen Schäden auf Lipid-, Protein- und DNA-Ebene. Werden Ionenpumpen beschädigt, kann daraus die Freisetzung von Calcium-Ionen resultieren, was zu einer Verstärkung der nekrotischen Prozesse führt. In der Ätiologie des Zusammenbruchs des mitochondrialen Membranpotentials scheint die Öffnung einer Proteinpore in der inneren Mitochondrienmembran, assoziiert mit einer unkontrollierten Permeabilität von Stoffen, eine wichtige Rolle zu spielen (SALDEEN 2000). Diese Pore wird durch BCL2 reguliert (VOEHRINGER 1999). Im weiteren Verlauf einer Lebernekrose kommt es zu einer chronischen inflammatorischen Antwort und schließlich zur Zirrhose der Leberzellen (WU und ZERN 1999).

Der programmierte Zelltod (Apoptose) dagegen ist gekennzeichnet durch ein kontrolliertes Absterben von geschädigten bzw. nicht mehr benötigten Zellen und kann über eine Reihe von Stimuli (z.B. Aktivierung von sog. Todesrezeptoren durch $\text{TNF}\alpha$) eingeleitet werden. Dabei kommt es allerdings auch zur Öffnung der BCL2 regulierten Pore in der Mitochondrienmembran und dadurch zu einer Änderung des mitochondrialen Membranpotentials sowie Austritt von Cytochrom C und „Apoptosis initiating Factor“ aus den Mitochondrien (Abbildung 6). Dies wiederum führt zur Aktivierung von Caspasen, welche eine Reihe von proteolytischen Prozessen durchführen, die letztendlich im Tod der Zelle enden. Im Gegensatz zur Nekrose führt eine apoptotische Zelle nach Ingestion durch Phagozytose nicht zu inflammatorischen Prozessen, während jedoch die Auslöser (Zellschäden auf Lipid-, Protein- und DNA-Ebene) die gleichen sein können. TERAMOTO et al. (1999) demonstrierten an humanen

Lungenfibroblasten die Induktion von Apoptose bei niedrigen H_2O_2 -Konzentrationen (10-100 μM), während bei Konzentrationen von 1-10 mM vorwiegend nekrotische Zellen auftraten. Eine Supplementation mit GSH führte zu einer Verringerung der Nekrose- bzw. Apoptose-Rate. Ein paralleler Ablauf beider Prozesse konnte von SALDEEN (2000) bei pankreatischen β -Zellen demonstriert werden. Unter dem Einfluss von Cytokinen zeigten 17 % der Zellen nekrotische und 5 % der Zellen apoptotische Charakteristika.

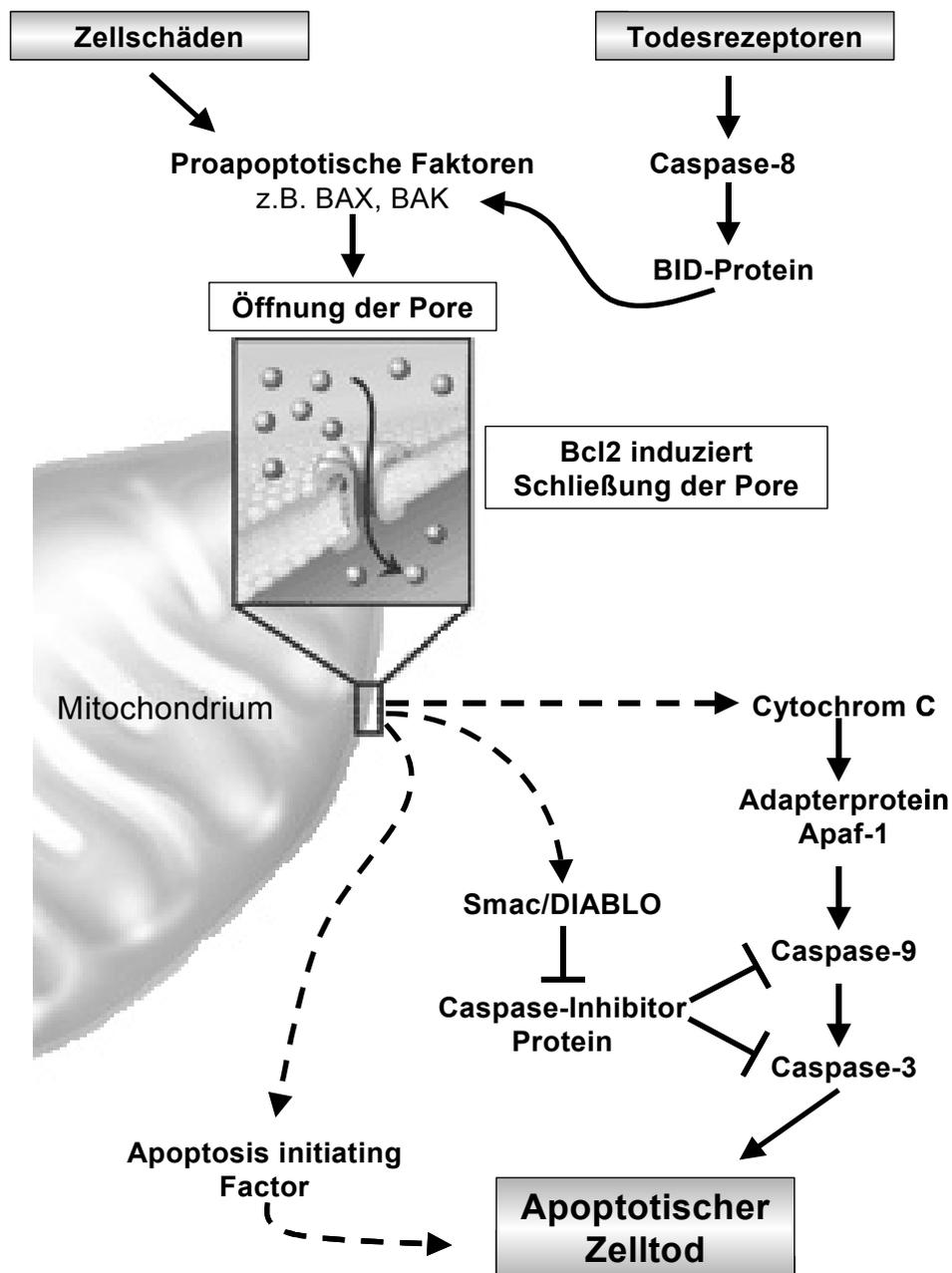


Abbildung 6: Postulierter Mechanismus der Apoptoseinitiierung unter Beteiligung der Mitochondrien, modifiziert nach FINKEL (2001).

1957 zeigten SCHWARZ und FOLTZ, dass Ratten im VE-Mangel Lebernekrosen entwickelten, welche durch Se-Gaben verhindert werden konnten. Bei Studien von FRAGA et al. (1987) führte ein Mangel an Se und VE bei Ratten nach 21 Tagen zu einer Lebernekrose, während der Mangel an nur einem der beiden Nährstoffe keine nekrotischen Veränderungen erzeugte. Da die Leber der Tiere im Doppelmangel 60-100 % erhöhte Chemilumineszwerte aufwies, wurde eine Beteiligung von Radikalen an der Entstehung der Lebernekrose im Se- und VE-Mangel vermutet. Ebenso konnten Leberschäden, welche durch reaktive Sauerstoffspezies nach Injektion von CCl₄ bei Mäusen induziert wurden, durch Vorbehandlung der Tiere mit α -Tocopherol verhindert werden (LIU et al. 1995).

Die Inhibierung von Apoptose konnte *in vitro* durch gesteigerte GPx-Aktivitäten, ausgelöst durch Se-Supplementation (KAYANOKI et al. 1996) bzw. Überexpression von cGPx (PACKHAM et al. 1996) demonstriert werden. Diese Befunde stehen im Einklang mit der Beobachtung, dass die apoptotische Kaskade durch Hydroperoxide stimuliert werden kann (FLOHÉ et al. 2000). Mit HIV-infizierte T-Zellen zeigten eine reduzierte GPx-Aktivität, welche assoziiert war mit einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Lipidhydroperoxid- (SANDSTROM et al. 1994) bzw. H₂O₂-induzierter Apoptose (SANDSTROM et al. 1993). Eine VE-Supplementierung des Mediums führte dagegen zu einer höheren Überlebensrate im Vergleich zu den nicht-supplementierten Zellen. Bei UV-gestressten Zellen konnte durch Selenit die Überlebensrate signifikant gesteigert werden, während bei 80 % der nicht-supplementierten Zellen nach 24 Stunden Apoptose eingeleitet wurde. Diese anti-apoptotische Funktion des Selenits wurde auf die Hemmung von Caspase-3, vermutlich über die Modulierung von Cysteinresten, zurückgeführt (PARK et al. 2000).

Neben der Bewertung morphologischer Veränderungen bei apoptotischen (Chromatinkondensation, Kernfragmentierung, apoptotische Körperchen) und nekrotischen Zellen (Verdickung der Organellen, Verdichtung des Kernmaterials ohne Fragmentierung, Plasmamembranausstülpungen), lassen sich nekrotische Prozesse über die Bestimmung von cytosolisch lokalisierten Enzymen im Blutplasma nachweisen, da Zellschäden zu einem Austritt der Enzyme führen. Zu diesen Enzymen zählt die Lactatdehydrogenase (LDH), welche die Umsetzung von Pyruvat zu Lactat katalysiert. Erhöhte LDH-Aktivitäten im Blutplasma stellen einen Indikator dar, u.a. für

Skelettmuskelschäden durch erhöhte Muskelbeanspruchung (GISSEL und CLAUSEN 2001), Myokardschäden (FRANKEN et al. 2000) sowie Mikroschäden in der Lunge (BEHNIA et al. 1996). Da die LDH prinzipiell aus jeder geschädigten Zelle austreten kann, gilt die Messung als nicht gewebspezifisch (DRENT et al. 1996). Die LDH im Plasma besteht jedoch aus fünf Isoenzymen, deren Verteilung in den einzelnen Organen voneinander abweicht, so dass durch den Einsatz verschiedener Substrate die Bestimmung spezifiziert werden kann. Während die leberspezifischen Isoenzyme Pyruvat besonders schnell umsetzen, bevorzugt die herztypische LDH α -Ketobutyrat als Substrat. Eine im kombinierten Se- und VE-Mangel beobachtete Lebernekrose bei Ratten hatte einen Anstieg der LDH-Spiegel im Plasma zur Folge (FRAGA et al. 1987), während ein alleiniger Se- bzw. VE-Mangel keine erhöhte LDH-Konzentration im Plasma hervorrief. Ebenso führte bei Schafen ein Doppelmangel zu einem Anstieg der gemessenen LDH-Aktivitäten im Plasma, eine VE-Supplementation dagegen ergab, unabhängig vom Se-Status, die niedrigsten LDH-Aktivitäten (WHANGER et al. 1977).

Inflammation

Die Induktion von pro-inflammatorischen Cytokinen (z.B. Interleukin-1, $\text{TNF}\alpha$) durch reaktive Sauerstoffspezies und die Modulation von redox-sensitiven Proteinkinasen (z.B. MAP-Kinasen) konnte als zentraler und früher Prozess in der Induktion inflammatorischer Reaktionen aufgezeigt werden (FUCHS et al. 2001). Dies hat die Aktivierung von Antioxidantien (VILCEK und LEE 1991), verschiedenen Transkriptionsfaktoren und dadurch eine Verstärkung der Immunantwort zur Folge. $\text{NF}\kappa\text{B}$ ist ein in allen eukaryotischen Zellen vorkommender Transkriptionsfaktor, welcher im Cytoplasma als inaktive Form, gebunden an $\text{I}\kappa\text{B}$, vorliegt (Abbildung 7). Nach Empfang eines entsprechenden Signals wird $\text{I}\kappa\text{B}$ phosphoryliert, dadurch zum Abbau markiert und $\text{NF}\kappa\text{B}$ aktiviert. Für die Phosphorylierung ist die Aktivierung einer $\text{I}\kappa\text{B}$ -Kinase notwendig, was neben Interleukin-1 und $\text{TNF}\alpha$ sehr wahrscheinlich auch direkt über reaktive Sauerstoffspezies erfolgen kann (CHRISTMAN et al. 2000). Da Hydroperoxide *in vitro* ohne weitere Stimuli zu einer Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ führen (SCHRECK et al. 1991) und eine große Anzahl chemisch verschiedener Antioxidantien die Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ zu

hemmen vermögen (FLOHÉ et al. 1997), wird eine Aktivierung durch den Redoxstatus der Zelle angenommen. Nach dem Abbau von I κ B erfolgt eine Reduktion von Cysteinresten im NF κ B-Komplex (HAYASHI et al. 1993), welcher anschließend zum Nucleus wandert und dort nach Bindung an die DNA die Transkription spezifischer inflammatorischer Gene (z.B. Akute-Phase-Proteine, Adhäsionsmoleküle, Immunorezeptoren, Cytokine) bewirkt. Da NF κ B durch die Cytokine Interleukin-1 und TNF α induziert wird, jedoch auch deren Expression erhöht, besteht eine positive Rückkopplung (KUDRIN 2000).

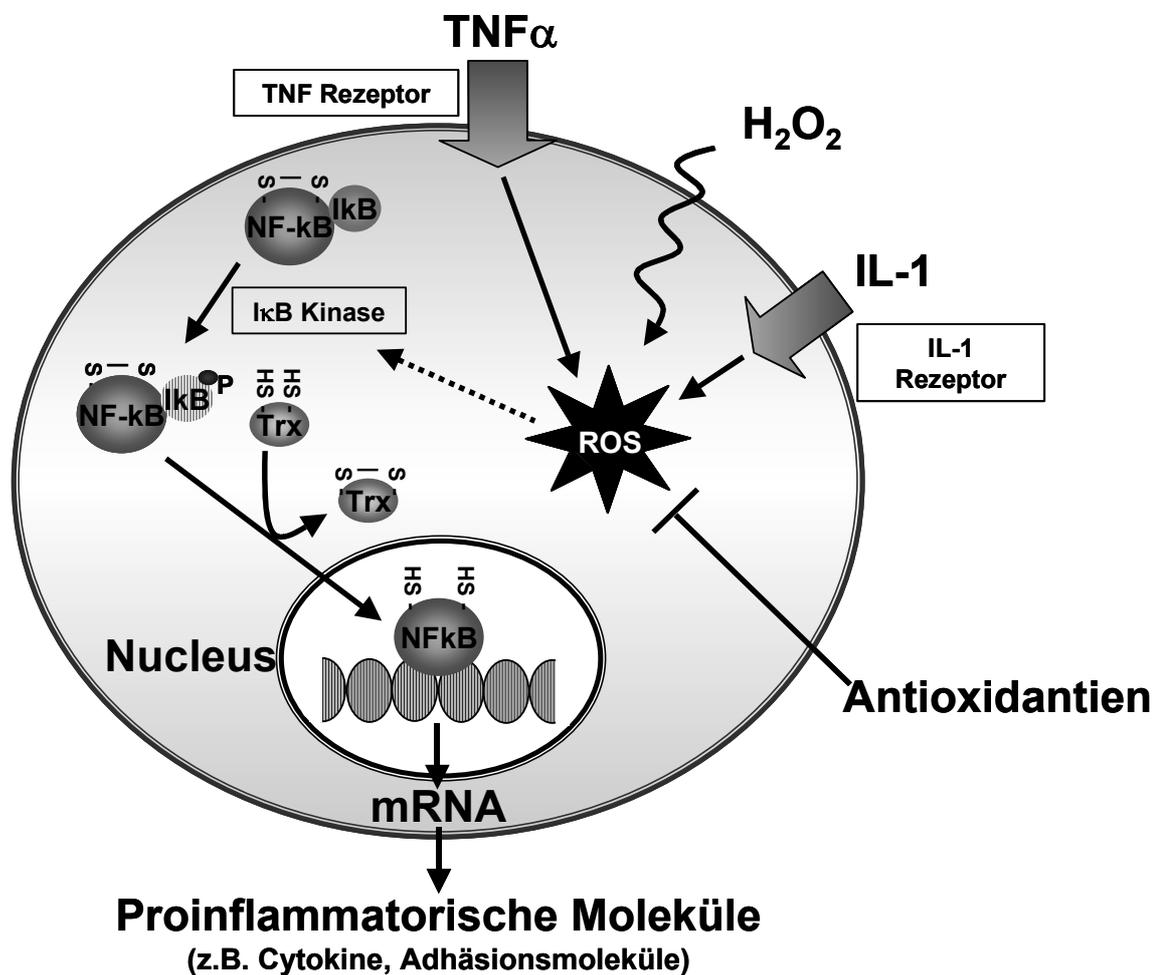


Abbildung 7: Redoxregulation des Transkriptionsfaktors NF- κ B, modifiziert nach CHRISTMAN et al. (2000)

Se und VE werden eine anti-inflammatorische Wirkung zugesprochen. Durch eine Überexpression von cGPx (KRETZ-REMY et al. 1996) und PHGPx in ECV 304-Zellen

(BRIGELIUS-FLOHÉ et al. 1997) wurde die Interleukin-1- bzw. TNF α -abhängige NF κ B-Aktivierung vollständig aufgehoben. Ebenso wurde die PAF (Platelet Activating Factor)-induzierte Aktivierung von NF κ B durch VE-Gaben unterbunden (CHOI et al. 2000). Darüber hinaus induziert das Abbauprodukt der Lipidperoxidation 4-Hydroxynonenal die Phosphorylierung von I κ B in glatten Muskelzellen (RUEF et al. 2001), so dass VE und Se indirekt die NF κ B-vermittelte Immunantwort beeinflussen können.

Trx, das Hauptsubstrat der Se-abhängigen TrxR, führte bislang zu unterschiedlichen Beobachtungen in Bezug auf die NF κ B-Aktivierung. Auf der einen Seite scheint eine Überexpression von Trx in Zellen die NF κ B-Aktivierung zu inhibieren (SCHENK et al. 1994). Auf der anderen Seite bewirkt Trx die Reduktion von Cysteinresten, welche für die Bindung von NF κ B an die DNA essentiell sind (HAYASHI et al. 1993). Neuere Studien belegen, dass eine Aktivierung von NF κ B durch Zigarettenrauch von dem Vorhandensein von Trx in der reduzierten Form und von einem Anstieg an TrxR-mRNA abhängt (GEBEL und MÜLLER 2001). Dies führt zu dem Schluss, dass Trx zunächst die Phosphorylierung von I κ B und somit die Aktivierung von NF κ B hemmt, für die Bindung von aktiviertem NF κ B an die DNA aber notwendig ist (FLOHÉ et al. 1997).

Weiterhin besteht über die Modulation der Schlüsselenzyme der Prostaglandin- und Leukotrienbiosynthese ein Zusammenhang zwischen GPx-Aktivität und Immunantwort. Es konnte nachgewiesen werden, dass PHGPx zusammen mit Glutathion die Aktivität der Lipoxygenase (SCHNURR et al. 1996) und der Cyclooxygenase (SMITH und LANDS 1972) *in vitro* hemmt. Darüber hinaus werden die Endprodukte der Lipoxygenase- und Cyclooxygenase-Reaktion (Hydroperoxide der Arachidon- und Eicosatetraensäure) durch die GPx-Aktivität reduziert (HUANG et al. 1999). Da Lipoxygenase und Cyclooxygenase zur katalytischen Aktivität einen gewissen Peroxidtonus benötigen (FLOHÉ et al. 1997), wird davon ausgegangen, dass die Reduktion der Hydroperoxide durch die GPx zu der Abnahme der Aktivität dieser Enzyme führt. Diese Senkung des Peroxidtonus hat wiederum eine verminderte Aktivierung von NF κ B zur Folge (VIITA et al. 1999).

Darüber hinaus scheint Se auf ganz unterschiedlichen Wegen die Immunfunktion zu beeinflussen. Eine Supplementation führt zu einer Hochregulation der Interleukin-2-Rezeptoren in T-Lymphocyten und somit zu einer erhöhten Immunantwort auf Signale, welche über den Interleukin-2-Rezeptor vermittelt werden (ROY et al. 1994). SeIP scheint an Endothelzellen zu binden, um diese vermutlich vor proinflammatorischen

Hydroperoxiden und Peroxynitrit zu schützen (HILL und BURK 1997). Da die Zelle mit Hilfe reaktiver Sauerstoffspezies Infektionen und geschädigtes Gewebe beseitigt, stellt die inflammatorische Antwort selbst eine potentielle Gefahr für oxidativen Stress dar. Daher kommt dem Eigenschutz der Wirtszelle eine große Bedeutung zu, welcher über die Aktivitäten der GPx erfolgen kann (MCKENZIE et al. 1998).

α -Tocopherol gilt als Inhibitor der Proteinkinase C. Diese reguliert eine Vielzahl von inflammatorischen Prozessen, u.a. die Biosynthese von Cytokinen, Superoxidanionen und die Aktivierung von Phospholipase A2, welche Arachidonsäure aus den Phospholipiden freisetzt.

Eine Folge von Inflammation ist die Induktion von „Akute-Phase-Proteinen“, deren Gene einer hohen Transkriptionsrate unterliegen. Akut-Phase-Proteine spielen eine wichtige Rolle in der antioxidativen Schutzantwort. Zu diesen Proteinen zählen die Metallothioneine (MT) (MANUEL et al. 1992), eine Gruppe niedermolekularer, Metall- und Schwefel-haltiger Proteine, welche in hohen Konzentrationen in Leber und Niere vorkommen (ZELAZOWSKI und PIOTROWSKI 1977). Sie werden durch Interleukin-1, Interleukin-6 und TNF α induziert (SATO et al. 1995), scheinen aufgrund der SH-Gruppen mit Hydroxyl-Radikalen zu reagieren und so vor oxidativen Schäden in der DNA (CHUBATSU und MENEHINI 1993) und in Lipiden (MARKANT und PALLAUF 1996) zu schützen. STANGL et al. (2000) konnten in der Leber von Ratten unter VE-Mangel einen 50-80 %igen Anstieg der MT-Spiegel, einhergehend mit erhöhter Lipidperoxidation, verzeichnen. Ebenso reduzierte eine VE-Supplementation bei durch Futterentzug gestressten Tieren die MT-Spiegel in der Leber (HIDALGO et al. 1988). Inwieweit sich ein Se-Mangel auf die MT-Spiegel auswirkt, wurde bislang in der Literatur nicht beschrieben.

Krebs

Die Carcinogenese ist ein mehrere Phasen umfassender Prozess, welcher klassischerweise in die drei Stadien der Initiation, Promotion und Progression untergliedert wird. Die Initiation beinhaltet eine angeborene oder chemisch, viral bzw. physikalisch erworbene, irreversible Schädigung der DNA und macht die Zelle zu einer sog. latenten Tumorzelle (JANSSEN et al. 1993). Die Promotion stellt einen Selektionsprozess für die mutierten

Zellen dar, der auf einer stärkeren Antwort der entarteten Zellen auf äußere Signale (z.B. Wachstumsfaktoren) beruht. Das letzte Stadium, die Progression, ist gekennzeichnet durch Verlust der Wachstumskontrolle und der daraus resultierenden raschen Verbreitung der Krebszellen (ORRENIUS 1993).

Ein protektiver Effekt von Se auf die Krebsentstehung wurde postuliert, nachdem epidemiologische Studien eine inverse Korrelation zwischen Krebsinzidenz und Se-Aufnahme aufwiesen (CLARK 1985, IP 1998). Ein Se-Effekt ist sowohl in der Initiations-, Promotions- als auch in der Progressions-Phase denkbar. In der frühen Phase der Krebsentstehung spielen oxidative Schäden an der DNA durch reaktive Sauerstoffspezies eine wichtige Rolle. Zellen, die adäquat mit Se und VE versorgt sind, scheinen durch die antioxidative Funktion (Entgiftung von Hydroperoxiden und Verhinderung carcinogener Abbauprodukte der Lipidperoxidation wie Malondialdehyd) weniger anfällig gegenüber carcinogenen Einflüssen zu sein (HALLIWELL 2000). Dementsprechend korreliert die UV-induzierte Hauttumorgenese invers mit der GPx-Aktivität in Se-supplementierten Nacktmäusen (PENCE et al. 1994). Inkubation von Zellen mit Selenit oder α -Tocopherol 24 Stunden vor UV-Bestrahlung bzw. Zugabe der Carcinogene Benzoapyren oder Tryptophanpyrolysat führte in allen Fällen zu einer Inhibierung der Zelltransformation, wobei die gleichzeitige Supplementation beider Nährstoffe den größten Effekt zeigte. Die Se-Inkubation ging einher mit einem Anstieg der GPx-Aktivität und einer Abnahme an Peroxiden (BOREK et al. 1986). Ebenso erwies sich bei Mäusen nach DMH-induziertem Colonkrebs der stärkste protektive Effekt von Se in der Initiationsphase (TEMPLE und BASU 1987).

Allerdings können nicht alle anti-carcinogenen Effekte von Se über die Enzymaktivitäten erklärt werden. So wurde bei Ratten ein protektiver Effekt nach DMBA-induziertem Brustkrebs bei einer Zulage von >1 mg Se/kg Diät beschrieben, was um das 10-fache höher liegt als die Zulagen zur Verhinderung von Se-Mangelsymptomen (THOMPSON et al. 1982). Die bis heute bekannten Selenoproteine scheinen ihre maximale Aktivität bei Spiegeln von nicht mehr als 0,5 mg Se/kg Diät zu erreichen, so dass es als unwahrscheinlich erscheint, dass dieser anti-carcinogene Effekt auf die bekannten Selenoproteine zurückzuführen ist. Vielmehr scheinen bestimmte Se-Metabolite wirksam zu werden, die in signifikanten Mengen nur bei relativ hoher Se-Aufnahme produziert werden (COMBS 1999). Zu diesen Metaboliten zählen die reduzierten

(Selenodiglutathion, Selenomethionin, Selenocystein) und die methylierten Se-Formen (z.B. Selenmethylselenocystein), welche *in vitro* chemopräventive Effekte (Apoptose und Zellcyclusarrest) in transformierten Zellen auslösen können und somit in der Promotions- und Progressionsphase des Tumors wirken (SINHA und MEDINA 1997). Darüber hinaus wird der Effekt von Se auf die Krebsprävention in einer Steigerung der Immunantwort, in Modifikation des Carcinogenmetabolismus und dadurch verminderter DNA-Adduktformation (MILNER 1986) sowie in einer erhöhten DNA-Reparaturkapazität angesiedelt (LAWSON und BIRT 1983).

Abschließend ist jedoch erwähnenswert, dass bei bereits bestehenden Tumoren Se auch einen negativen Effekt ausüben kann (BECKER et al. 2000), da das schnelle Wachstum von Tumorzellen von der Zufuhr an Deoxyribonucleotiden und damit von einem aktiven Trx/TrxR-System abhängt. Dementsprechend sind in Tumorzellen hohe TrxR-Spiegel zu finden.

2.3 Messung differentieller Genexpression mittels Microarray-Technologie

Traditionelle Methoden zur Messung differentieller Genexpression (z.B. Northern-Blot, PCR) bezogen sich bislang auf die Untersuchung einzelner weniger Gene. Unter diesen Bedingungen konnte jedoch kein Gesamtbild der zellulären Genexpression erstellt werden. Eine in jüngster Zeit erstmalig eingesetzte Technik, der sog. DNA- oder Microarray (SCHENA et al. 1995), ermöglicht dagegen die simultane Messung der Expression von einigen hundert bis zu mehreren tausend Genen.

2.3.1 Microarray-Technologie

SOUTHERN entdeckte 1975, dass immobilisierte einzelsträngige DNA mit ihrer komplementären Sequenz hybridisiert werden kann. Bei der von ihm entwickelte Methode ("Southern Blot") wird die zu untersuchende DNA auf einer Membran immobilisiert und mit einer markierten DNA-Sonde hybridisiert. Ebenso ist die

Microarray-Technologie eine auf komplementärer Basenpaarung beruhende spezifische Hybridisierung von DNA- oder RNA-Molekülen (MORADPOUR und BLUM 1999). Allerdings wird hierbei die Sonde auf dem Array immobilisiert und mit den markierten Genfragmenten der Probe hybridisiert. Als Festphase dienen sowohl Nylonmembranen, als auch nicht-poröse Oberflächen (z.B. Glas oder Silikon). Dabei können auf einer fingernagelgroßen Fläche mehrere hundert (Filter-Array) bzw. mehrere tausend Sonden (High-density Glass- oder Silikon-Array) nebeneinander mit Hilfe von Hochgeschwindigkeitsrobotern synthetisiert werden. Nach Hybridisierung mit den Genfragmenten der Probe kann somit ein globales Expressionsprofil vieler Gene gleichzeitig erstellt werden.

Die Microarray-Technologien unterscheiden sich in der Art und Größe der aufgetragenen („gespotteten“) Genfragmente, in der Art des Auftragens, in der Chemie der reaktiven Gruppen, mit denen die DNA auf dem Array immobilisiert wird und in den Hybridisierungs- und Detektions-Verfahren (Tabelle 4). Bei den sog. Oligonukleotid-Arrays bestehen die gespotteten Genfragmente aus 20-25 b langen Oligonukleotiden. Bei den cDNA-Arrays werden Exon-Anteile von Gensequenzen (500-2 000 b lang), vollständige cDNA oder genomische DNA als Sonden verwendet. Die Amplifikation der cDNA zur Herstellung der Arrays kann entweder mittels PCR oder durch Subklonierung in Bakterien erfolgen (ROCKETT und DIX 2000).

Die Filter-Arrays haben den Vorteil, dass sie relativ kostengünstig sind und keine speziellen Gerätschaften zur Auswertung erfordern. Bei den von der Firma Clontech vertriebenen Arrays werden jeweils 10 ng der ausgewählten cDNA (ca. 200-600 b lang) computergesteuert auf eine Nylonmembran (0,8 x 1,2 cm) gespottet. Auf den kleineren angebotenen Nylonmembranen (bis zu 500 Gene) wird jedes Gen durch zwei Spots, auf den größeren Arrays (bis zu 1200 Gene) durch einen Spot repräsentiert. Die Probe wird als P³²-markierte cDNA mit den Membranen hybridisiert und mit Hilfe eines Phosphorimagers ausgewertet. Um Daten von verschiedenen Arrays miteinander vergleichen zu können, werden die Signalintensitäten mit Hilfe eines Faktors normalisiert. Dabei kann sowohl auf die Housekeeping-Gene als auch global über alle Gene auf der Membran normalisiert werden.

Tabelle 4: Auswahl verschiedener Microarray-Technologien und Anbieter

Filter (Membran)-Array				
	Clontech	Research Genetics GeneFilter®	Hyseq	
Sonde und Festphase	PCR-amplifizierte 200-600 b große cDNA auf Nylon gespottet	ca. 1 kb große, gereinigte DNA auf Nylon gespottet	0,5-2 kb große DNA auf Nylon gespottet	
Dichte und Grösse der Arrays	500–1200 cDNA Spots auf 0,8 x 1,2 cm	5 000 cDNA Spots auf 5x7 cm	64 cDNA Spots bzw. 55 000 cDNA Spots auf 0,6 cm ² bzw. 18 cm ²	
Art der zu hybridisierenden Probe	Radioisotop-markierte cDNA	Radioisotop-markierte cDNA	8 000 bzw. 300 Radioisotop-markierte 7 mer große Oligonukleotide	
Visualisierung	Phosphorimager	Phosphorimager	Phosphorimager	
Anwendungen	Expressionsprofile, Diagnostik	Expressionsprofile, Diagnostik	Expressionsprofile, Suche nach neuen Genen, Diagnostik	
High-density Microarray				
	Clontech	Affymetrix GeneChip®	Incyte/Synteni	Hyseq HyChip™
Sonde und Festphase	PCR-amplifizierte 200-500 b große cDNA auf Glas, 80 mer große Oligonukleotide auf Plastik	Photolithographie <i>in situ</i> , ca. 20-25 mer große Oligonukleotide auf Siliconfläche	Piezoelektrisches Drucken von PCR-Fragmenten 500-5 000 b groß auf Glas	vorgefertigte 5 mer große Oligonukleotide auf Glas gespottet
Dichte und Grösse der Arrays	500–1200 cDNA auf 1,2 cm ² , 4000-8000 Oligonukleotide auf 8x12 cm	10 000-260 000 Oligonukleotide auf 1,25 oder 5,25 cm ²	1000-10 000 cDNA auf 3,6 cm ²	Universelle 1024 Oligonukleotide auf 1,15 cm ²
Art der zu hybridisierenden Probe	Fluoreszenz-, bzw. Radioisotop-markierte cDNA	Fluoreszenz-markierte 30-40 b große cDNA oder cRNA	Fluoreszenz-markierte RNA, unterschiedliche Markierung von Kontrolle und Probe	Fluoreszenz-markierte 10 kb große cDNA, 5 mer lange Oligonukleotide und Ligase
Visualisierung	Fluoreszenz-detektor, Phosphorimager	Fluoreszenz-detektor	Fluoreszenz-detektor	Fluoreszenz-detektor
Anwendungen	Expressionsprofile, Diagnostik	Expressionsprofile, Polymorphismen, Diagnostik	Expressionsprofile, Polymorphismen, Diagnostik	Expressionsprofile, Identifikation von neuen Genen, Polymorphismen,

High-density Microarrays dagegen zählen zu den weiterentwickelten Arrays (BOWTELL 1999). Bei dem sog. GeneChip® von Affymetrix werden ca. 65 000-400 000 Oligonukleotide in einer Größe von 20-25 b mittels Photolithographie auf einer Glasfläche von 1,6 cm² *in situ* synthetisiert. Diese repräsentieren bis zu 9 000 Gene, wobei jedes Gen von 20 DNA-Spots abgedeckt wird. 20 „Mismatch“-Spots dienen der Ermittlung des Hintergrundes. Die Probe wird als Biotin-markierte und fragmentierte cRNA mit dem Array hybridisiert, mit Laser angeregt und mittels Fluoreszenzdetektor ausgewertet (GERHOLD et al. 1999).

2.3.2 Anwendungen

Typische Anwendungen der Microarray-Technologie umfassen vergleichende Expressionsstudien sowie die Analyse von DNA-Polymorphismen oder Mutationen auf genomischer Ebene.

Für die Untersuchung von Polymorphismen und Mutationen werden spezielle Arrays verwendet, welche die verschiedenen Mutationen (z.B. die des p53-Tumorsuppressor-Gens) oder Polymorphismen (z.B. die Isoformen des Cytochroms P450) beinhalten. In der Literatur sind verschiedene Anwendungsbeispiele zu finden. So wurde von AHRENDT et al. (1999) ein Mutationsscreening im p53-Gen in primären Lungenkrebszellen bei 100 Patienten sowie von WEN et al. (2000) in 108 Eierstocktumoren mit Hilfe des p53 GeneChip® von Affymetrix durchgeführt.

Im Rahmen von vergleichenden Expressionsstudien werden die mRNA-Spiegel der auf dem Array befindlichen Gene unter den experimentellen Bedingungen sowohl in Zellkultur als auch im Gewebe untersucht. Dafür sind Microarrays für eine Auswahl von Bakterien (*E. coli.*), Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*), Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*), Insekten (*Drosophila melanogaster*), Säugetieren (Ratte, Maus) und Mensch kommerziell zu erwerben. Für bestimmte Fragestellungen sind allerdings auch Arrays mit Genfragmenten verfügbar, welche nach den Wünschen des Kunden zusammengestellt werden. Veränderungen des Genexpressionsmusters während der malignen Transformation im Vergleich zu nicht-entarteten Zellen wurden in Zellkultur bei humanen Eierstockzellen (WANG et al. 1999) und Colonzellen (ALON et al. 1999) mittels

Genechip® sowie bei nasopharyngealen Zellen mittels cDNA-Array (XIE et al. 2000) dargestellt. Ebenso sind in der Literatur Expressionsstudien an kultivierten Zellen nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* (COHEN et al. 2000), mit HIV-1-Viren (GEISS et al. 2000) und mit Cytomegalo-Viren (ZHU et al. 1998) beschrieben. Für *Saccharomyces cerevisiae* besteht die Möglichkeit, ein Screening des vollständigen Genoms durchzuführen, wie dies z.B. nach Glucoseentzug (DERISI et al. 1997) und nach NaCl-induziertem Stress (POSAS et al. 2000) beschrieben wurde. LEE et al. (1999) stellten bei 1,8 % der 6347 untersuchten Gene eine differentielle Expression im Muskelgewebe von alten im Vergleich zu jungen Mäusen fest. Eine kalorische Restriktion konnte diesen Effekt teilweise aufheben. Untersuchungen zum Einfluss von *Ginkgo biloba* auf die mRNA-Spiegel in Cortex und Hippocampus von Mäusen ergaben signifikant veränderte Expressionsmuster von neurobiologisch bedeutenden Genen in Abhängigkeit von der *Ginkgo biloba*-Fütterung (WATANABE et al. 2001).

Inwieweit sich veränderte Spurenelement- bzw. Vitamin-Konzentrationen auf die Expression von multiplen Genen auswirken, wurde mit Hilfe von Microarrays bereits für einige ausgewählte Elemente beschrieben. ALCANTARA et al. (2001) untersuchten in Eisen-depletierten HL-60 Promonocyten die Expression der am Zellcyclusarrest und an der Apoptose beteiligten Gene. Die Autoren konnten zeigen, dass von 43 Genen 11 differentiiell exprimiert wurden. In der Hefe wurde bei Kupfer-Mangel und -Überladung (GROSS et al. 2000) sowie nach knock-out des Frataxin-Gens, welches beim Eisenmetabolismus eine wichtige Rolle spielt, ein Genom-weites Screening durchgeführt (FOURY und TALIBI 2001). Die Auswirkung einer Arsen-Überladung auf die Genexpression in der Leber untersuchten LU et al. (2001) in Leberbiopsieproben von Arsen-exponierten Probanden im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. Die molekularen Mechanismen des hemmenden Einflusses von 1,25-Dihydroxycholecalciferol auf die Proliferation von Krebszellen wurde in SCC4-Zellen mit Hilfe von cDNA-Arrays an insgesamt 4500 Genen untersucht (AKUTSU et al. 2001).

Die Effekte eines Se- bzw. VE-Mangels bei der Ratte auf differentielle Genexpression wurden bislang noch nicht mittels Microarray geprüft. Allerdings sind Untersuchungen zur differentiellen Genexpression mit Hilfe des "differential Display" in der Literatur beschrieben. Bei dieser Methode werden nach reverser Transkription und anschließender PCR unter Verwendung kurzer universeller Primer die abgelesenen Gene amplifiziert, auf

einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die Konzentration von differentiellen Banden ermittelt. KENDALL und CHRISTENSEN (1997) fanden dabei eine Abnahme der Expressionsrate für Transthyretin und für das Citrattransporterprotein in der Leber von Se-defizienten Ratten. Ebenso konnte mittels „differential Display“ die Modulation der Genexpression von α -Tropomyosin durch α -Tocopherol, nicht aber durch β -Tocopherol, in glatten Muskelzellen ermittelt werden (ARATRI et al. 1999).

2.3.3 Grenzen der Microarray-Technologie

Die Microarray-Technologie kann als semi-quantitative Auswertungsform angesehen werden. Um die Aussagekraft der gewonnenen Ergebnisse zu erhöhen, sollten diese daher mit Hilfe von anderen Technologien wie z.B. Northern-Blot, real-time PCR oder Immunofärbung verifiziert werden (CELIS et al. 2000).

Ebenso wie bei den herkömmlichen auf Basenpaarung beruhenden Methoden können auch bei der Microarray-Technologie Probleme durch intra- und intermolekulare Strukturen (z.B. Haarnadelstrukturen) sowohl in der Sonde als auch in der Probe auftreten und dadurch den Hybridisierungserfolg mindern. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass cDNA Klone durch T1-Phagen infiziert werden. ROCKETT und DIX (2000) ermittelten dadurch eine bis zu 20 %ige Fehlerquote in der Sequenzabfolge der DNA Klone, d.h. in ca. 20 % der Fälle stimmt die Sequenz in der Datenbank nicht mit der Sequenz der Klone überein. Die Autoren empfehlen daher eine Sequenz-Verifizierung der Klone, wodurch die Fehlerquote auf ca. 2 % gesenkt werden kann.

Zum Teil kann es schwierig sein, an nur aus einem Zelltypus bestehende Proben zu gelangen, insbesondere, wenn das zu untersuchende Material inhomogenes Gewebe (z.B. Testes, Tumorbiopsien) darstellt. Eventuell wird daher eine Mikrosektion notwendig, um gezielt Zellen eines Zelltypus zu gewinnen (HACIA 1999). Experimentelle Einflussgrößen sollten kontrolliert werden, da Änderungen in der Transkription von Genen als Antwort auf veränderte Umwelteinflüsse (z.B. die Position der Zellkulturschale im Inkubator, Zeitpunkt der Probenentnahme) ein potentiell Risiko zur Fehlinterpretation von Ergebnissen bergen.

Die Aussagekraft der Microarray-Technologie ist ferner abhängig von der Anzahl der gespotteten cDNA. Bislang sind von vermutlich 10 000–50 000 in einer Säugetierzelle exprimierten Genen maximal 15 000 als cDNA erhältlich (KURIAN et al. 1999).

Letztendlich sollte wie bei allen Ergebnissen über das Expressionsverhalten von Genen auch bei der Microarray-Technologie berücksichtigt werden, dass mRNA-Spiegel nicht unbedingt Protein-Spiegel reflektieren und die stärkere Expression eines Gens nicht immer eine physiologische Konsequenz haben muss.

3 Experimenteller Teil

3.1 Ziel des Versuches und Versuchsplan

Der Einfluss eines alimentären Se- und/oder VE-Mangels auf die Genexpression in der Leber sollte am Modelltier Ratte untersucht werden. Dazu wurde eine Se- und VE-arme Basisdiät konzipiert, welche ansonsten die Anforderungen des „American Institute of Nutrition“ (AIN-93) (REEVES et al. 1993) an wachsende männliche Ratten erfüllen sollte. Im Austausch gegen Maisstärke wurde Se (200 μg Se/kg) als Natriumselenat und/oder VE (75 IU/kg) als α -Tocopherylacetat zugelegt (Tabelle 5). Zur Erzeugung des Se- und/oder VE-Mangels sollten vier Versuchsgruppen zu je acht männlichen Albinoratten mit einem möglichst geringen Anfangsgewicht die Diät über sieben Wochen erhalten, unter Erfassung der zootecnischen Parameter Futteraufnahme, Lebendmasseentwicklung und Futtermittelverwertung.

Tabelle 5: Versuchsplan

Gruppe	n	Se-Zulage ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Diät)	VE-Zulage (IU/kg Diät)
I (-Se, -VE)	8	—	—
II (-Se, +VE)	8	—	75
III (+Se, -VE)	8	200	—
IV (+Se, +VE)	8	200	75

Darüber hinaus galt es, anhand verschiedener Se- und VE-Statusparameter den Mangel zu beschreiben. Dazu sollten die Se- und VE-Konzentrationen in Leber und Plasma sowie die Aktivitäten der Se-abhängigen Enzyme cGPx, pGPx und TrxR bestimmt werden. Ein weiteres Ziel war die Charakterisierung der Effekte auf hämatologische Parameter sowie Glutathionmetabolismus, Vitamin C-Konzentrationen, Inflammation (LDH, MT), DNA-Schäden (Comet Assay) und Lipidperoxidation (TBA-RS) in der Leber.

Die dafür zu erfassenden Versuchsparameter sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Versuchsparemeter zum Einfluss eines Se- und/oder VE-Mangels auf Genexpression, Status- und Schädigungsparameter bei wachsenden Ratten

Parameter	Bestimmung
<i>Diät</i>	
Selen- und Vitamin E-Konzentration	Hydrid-AAS, HPLC
Rohnährstoffe	VDLUFA-Methode
Mineralstoffanalyse	ICP
<i>Versuchsverlauf, Tiergesundheit, Mortalität</i>	
<i>Zootechnische Parameter</i>	
Futteraufnahme	
Lebendmasseentwicklung	
Futterverwertung	
<i>Selen-Status</i>	
Selen-Konzentration in Leber	Hydrid-AAS
Selen-abhängige Enzyme (cGPx, pGPx, TrxR)	Photometrie
<i>Vitamin E-Status</i>	
Vitamin E-Konzentration in Leber und Plasma	HPLC
<i>Blutparameter</i>	
Hämoglobin (Hb)	Photometrie
Hämatokrit (Hk)	Hämatokrit-Kapillare
<i>Antioxidative Schutzmechanismen in der Leber</i>	
Glutathionmetabolismus (GSH, GSSG, GR, GST)	Photometrie
Vitamin C	HPLC
<i>Schädigungsparameter in der Leber</i>	
Lipidschädigung (TBA-RS)	Fluorometrie
Proteinschädigung (γ -Glutaminsynthetase)	Photometrie
DNA-Schädigung	Comet Assay
<i>Parameter für Inflammation</i>	
Metallothionein	Cadmium ¹⁰⁹ -Bindungsassay
LDH	Photometrie
<i>Differentielle Genexpressionsanalyse in der Leber</i>	
cDNA-Array	Phosphorimaging

3.2 Beschreibung der Diäten und Versuchsdurchführung

Die Diät wurde auf Basis von Torula-Hefe als Se-armer Proteinträger und VE-entzogenem Maiskeimöl (VE-stripped Cornoil) als VE-arme Fettkomponente erstellt (Tabelle 7). Die Mineralstoff- und Vitaminvormischungen wurden unter Berücksichtigung der analysierten, natürlichen Gehalte der Hefe an Calcium (6,5 g/kg), Kalium (13 g/kg), Phosphor (14 g/kg) und Magnesium (1,2 g/kg) an den Empfehlungen nach AIN-93 angelehnt. Zur Vorbeugung etwaiger Aminosäureimbilanzen erfolgte eine Ergänzung der Diät mit DL-Methionin.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Basisdiät

Komponente	g/100 g Diät
Torula-Hefe ^a	30
Cellulose ^b	5
Saccharose	10
VE-entzogenes Maiskeimöl ^c	5
Mineralstoffvormischung ^d	3,5
Vitaminvormischung ^e	1
DL-Methionin	0,3
Cholinchlorid	0,2
Maisstärke ^f	45
Summe	100

^a Attisholz *Torula utilis* Hefe, Cellulose Attisholz, Luterbach, Schweiz.

^b Vitacel[®] L600-30, Rettenmaier & Söhne, Rosenberg.

^c ICN Biomedicals GmbH (#901415), Eschwege.

^d Mineralstoffzusatz (in mg pro kg Diät) CaCO₃, 7490; Kaliumcitrat, 1940; MgSO₄·7H₂O, 2310; NaCl, 2590; Eisencitrat, 153; MnSO₄·H₂O, 31; ZnSO₄·7H₂O, 132; CuSO₄·5H₂O, 24; KI, 0,26; Ammoniumheptamolybdat, 0,28; KCr(SO₄)₂·12H₂O, 9,6; NaF, 2,2; Na₂SiO₃·9H₂O, 51; LiCl, 0,61; H₃BO₃, 2,9; NiSO₄·6H₂O, 2,2; NH₄VO₃, 0,23.

^e Vitaminzusatz (in mg pro kg Diät) Nicotinsäure, 30; Ca-Pantothemat, 15; Pyridoxin-Hydrochlorid, 6; Thiamin-Hydrochlorid, 5; Riboflavin, 6; Folsäure, 2; Menadion, 0,9; Biotin, 0,2; Vitamin B₁₂, 0,025; Retinol, 1,2 (4000 IU); Cholecalciferol, 0,025 (1000 IU).

^f Roquette, Roquette Frères, Lestrem, Frankreich.

In einem Edelmischer wurden zunächst die pulverförmigen Bestandteile der Se-armen Diäten der Gruppen I und II für 12 Minuten vorgemischt. Nach Zugabe von VE-entzogenem Maiskeimöl wurde für weitere 12 Minuten gemischt und so die VE- und Se-arme Basisdiät hergestellt, welche gleichzeitig die Versuchsdiät I darstellte. Durch Zugabe des an Maisstärke angemischten α -Tocopherylacetats (75 IU) und Mischung der Diät für 12 Minuten entstand die Versuchsdiät II. Für die Se-supplementierten Gruppen III und IV wurde eine neue Basisdiät (Versuchsdiät III) hergestellt, bei der bereits ein Gehalt von 200 μg Se/kg Diät eingestellt wurde. Für Versuchsdiät IV (Kontrolldiät) mit beiden Supplementen erfolgte im Austausch gegen Maisstärke eine Anhebung des VE-Gehalts auf 75 IU und eine Mischung der Diät für weitere 12 Minuten.

In den Versuch wurden insgesamt 32 männliche Albinoratten (Wistar, Unilever, Harlan/Winkelmann) mit einem durchschnittlichen Anfangsgewicht von $35,0 \pm 0,05$ g aufgenommen und anhand ihres Gewichtes auf die vier Gruppen verteilt. Die Zuteilung der halbsynthetischen Diäten sowie des entmineralisierten Wassers erfolgte *ad libitum*. Die Tiere wurden einzeln in Stoffwechselläufigen unter standardisierten Bedingungen (22 °C, 55 % Luftfeuchte, 12-h Hell-Dunkel-Rhythmus) gehalten. Die Kontrolle von Futteraufnahme und Lebendmasseentwicklung erfolgte wöchentlich nach vorhergehender 12-h Nüchternung.

Nach sieben Wochen wurden die Ratten nach Kohlendioxidbetäubung dekapitiert, das Blut aufgefangen, die Organe entnommen, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

3.3 Analytische Methoden

3.3.1 Rohnährstoffgehalte und Bruttoenergie der Versuchsdiäten

Die Bestimmung der Rohnährstoffe in den Versuchsdiäten wurde nach den VDLUFA-Methoden ausgeführt (NAUMANN und BASSLER 1997).

Die Extraktion des Rohfetts erfolgte nach HCl-Aufschluß mittels n-Hexan. Die Stickstoffanalyse wurde nach Kjeldahl mit Hilfe eines Kjeldahl-Automaten (Foss Electric) durchgeführt. Der Gehalt an Rohfaser wurde als der Rückstand nach dem Kochen mit

Schwefelsäure und Kalilauge definiert, wobei bei der Aufarbeitung an Stelle von Asbest mit Aluminiumoxid filtriert wurde. Die Bestimmung der Bruttoenergie wurde in einem adiabatischen Bombenkalorimeter (IKA-Kalorimeter C400) durchgeführt.

3.3.2 Mineralstoffe in den Versuchsdiäten

Um die Anforderungen an die Versuchsdiät nach AIN-93 in Bezug auf ausgewählte Mineralstoffe zu überprüfen und um eine Kontrolle über das Einmischen der Mineralstoffe in die Diäten zu erhalten, wurden die Konzentrationen von Ca, Cu, Fe, Mg, Mn und Zn im ICP-AES-System (Typ 701, Fa. Unicam) gemessen. Dafür wurden die Proben für 15 Stunden bei 450 °C trockenverascht und mit 0,3 N HNO₃ aufgeschlossen.

3.3.3 Selen-Konzentration in den Versuchsdiäten und Leber

Die Se-Konzentration in den Versuchsdiäten und Lebern wurden im Hydrid-AAS-System (PU 9400, Philips) mit kontinuierlicher Fließinjektion bestimmt (WELZ und MELCHER 1985). Um das vorhandene Se in die Oxidationsstufe +VI zu überführen, wurden die Proben zunächst mit 65 %iger HNO₃ und 30 %igem H₂O₂ im Mikrowellenofen aufgeschlossen. Als Probeneinwaage wurden für die Diäten ca. 600 mg, für die Leber der Gruppen III und IV ca. 500 mg und für die Leber der Se-Mangeltiere (Gruppe I und II) ca. 1 g gewählt. Danach folgte eine Reduktion des Se in die Oxidationsstufe +IV mittels 37 %iger Salzsäure unter Zusatz von 1,4 M Amidoschwefelsäure durch Erhitzen bei 70 °C für 1 Stunde. Eine weitere Reduktion in die Oxidationsstufe +II fand unmittelbar vor der Messung im vorgeschalteten Injektionssystem der AAS statt, indem die Probelösung automatisch mit 0,2 %igem Natriumborhydrid in 0,05 %iger NaOH versetzt wurde. Anschließend wurde das gebildete gasförmige Selenhydrid in einer auf mindestens 700 °C beheizten Quarzküvette atomisiert. Die Absorptionsmessung des Se erfolgte bei 196 nm.

3.3.4 Vitamin E-Konzentration in den Versuchsdiäten, Leber und Plasma

Die Messung der α -Tocopherol-Konzentrationen in Versuchsdiäten, Leber und Plasma wurde modifiziert nach CORT et al. (1983) durchgeführt. Plasma wurde mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) 1:2 verdünnt, und nach Zugabe von 400 μ L Ethanol zu 100 μ L Plasma das Protein ausgefällt. Für die Bestimmung der α -Tocopherol-Konzentration in der Leber und den Versuchsdiäten wurden 1 g Diät bzw. 250 mg Leber mit Natriumphosphatpuffer (50 mM NaH_2PO_4 , 0,5 mM EDTA, 0,5 % [w/v] Ascorbinsäure, pH 7,0) 1:10 verdünnt und homogenisiert. Danach erfolgte die Zugabe von Ethanol mit 1 % Ascorbinsäure in einem Verhältnis von 1:1,5. Anschließend wurde Hexan als Extraktionsmittel mit den Proben vermischt. Nach Zentrifugation wurde ein Äquivalent der Hexanfraktion abgenommen, bei 40 °C unter Stickstoff eingedampft und danach in Methanol mit 0,05 % BHT aufgenommen. Die Messung der so aufgearbeiteten Futter-, Plasma- und Leberproben erfolgte mittels C18-Reversed-Phase-HPLC (Merck 50983) mit Fluoreszenz-Detektion (Merck/Hitachi F100).

Die Gehalte an α -Tocopherol bzw. α -Tocopherylacetat wurden über externe α -Tocopherol- bzw. α -Tocopherylacetat-Eichkurven ermittelt. Bei den Leber- bzw. Plasmaproben wurden zusätzlich 40 μ L Tocol in Ethanol (20 μ g/mL bei den Gruppen II und IV sowie 5 μ g/mL bei den Gruppen I und III) als interner Standard zugesetzt, welcher der Wiederfindung und Qualitätskontrolle diene.

3.3.5 Hämoglobin-Konzentration und Hämatokrit-Wert

Zur Bestimmung des Hämatokrit (Hk)-Wertes wurde pro Tier unmittelbar nach der Blutentnahme Vollblut in jeweils zwei heparinisierten Hk-Kapillaren aufgezogen, für zehn Minuten zentrifugiert und der Hk-Wert mit Hilfe einer Ableseschablone ermittelt. Das restliche Blut wurde in heparinisierten Röhrchen aufgefangen. Davon diene ein Teil zur Bestimmung der Hämoglobin (Hb)-Konzentration unter Verwendung eines Testsatzes (Merckotest Hämoglobin, Merck #3317) nach der Hämiglobincyanid-Methode im Photometer bei 546 nm. Das verbleibende Blut wurde bei 3500 U/min (=2540 g) für zehn Minuten zentrifugiert und das Plasma gewonnen.

3.3.6 Selen-abhängige Enzyme

Zur Bestimmung der Se-abhängigen Enzymaktivitäten im Plasma und in der Leber wurde nach Einwaage von ca. 0,5 g Leberfrischmasse und des entsprechenden Puffers in ein Zentrifugenröhrchen mit Hilfe eines Dispergiergeräts (Micra RT) ein 1:10 Homogenat hergestellt und bei 4 °C für zehn Minuten bei 10 000 U/min (=13 000 g) (Sorvall) zentrifugiert. Der Überstand wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder bis zur Messung bei –80 °C gelagert. Das Plasma wurde ohne weitere Aufbereitung für die Enzymbestimmung verwendet. Zur Berechnung der spezifischen Enzymaktivitäten wurden die Aktivitäten auf den Protein-Gehalt bezogen, welcher mittels der Lowry-Folin-Methode bestimmt wurde.

3.3.6.1 Zelluläre Glutathionperoxidase

Die Aktivitätsbestimmung der Se-abhängigen, zellulären Glutathionperoxidase (cGPx) erfolgte nach einer von LAWRENCE und BURK (1976) entwickelten Methode. Die cGPx katalysiert die Reduktion von Hydrogenperoxid zu zwei Molekülen Wasser. Dabei wird reduziertes Glutathion (GSH) zu GSSG oxidiert. Mittels Glutathionreduktase (GR) im Reaktionsansatz wird GSSG unter Verbrauch von NADPH erneut reduziert. Die Extinktionsabnahme von NADPH, welche proportional zur cGPx-Aktivität verläuft, kann bei 340 nm im Photometer gemessen werden.

Für die cGPx-Bestimmung in der Leber wurde zunächst eine Reaktionslösung aus 1,0 mM GSH, 0,1 mM NADPH und 1,0 U/mL GR in Kaliumphosphatpuffer (50 mM Kaliumphosphat, 1,5 mM EDTA, 1 mM NaN₃) hergestellt. Die Leberhomogenate (1:10 in 10 mM Tris, pH 7,4) wurden auf eine Endverdünnung von 1:20 für die Gruppen I und II bzw. von 1:50 für die Gruppen III und IV gebracht. Nach Zugabe von 50 µL der Probe zu 900 µL Reaktionslösung wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µL H₂O₂ (5 mM) gestartet und eine Minute lang alle 15 Sekunden gemessen. Für den Blindwert wurde anstelle der Probe 0,9 %ige NaCl eingesetzt.

Mit Hilfe eines cGPx-Standards aus Rindererythrocyten wurde in einem Bereich von 0-160 mU eine Eichkurve (r=0,999) erstellt. Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde

anhand einer 10-fach Bestimmung in einem Homogenat überprüft. Der Variationskoeffizient (VK) lag dabei bei 6,4 %, der VK in 8 verschiedenen Homogenaten einer Leberprobe bei 10,1 %. Die Berechnung der Aktivitäten fand anhand der folgenden allgemeinen Formel statt, wobei 1 Unit 1 μmol NADPH-Umsatz/min entspricht ($\epsilon_{\text{NADPH},340\text{nm}} = 6,22$). Die Ergebnisse wurden in mU/mg Protein angegeben.

$$\text{mU/mg Protein} = \frac{(\Delta E * \text{Gesamtvolumen} * \text{Verdünnung})}{(\epsilon * d * \text{Probenvolumen})} * 1000 / \text{Protein in mg}$$

3.3.6.2 Plasmatische Glutathionperoxidase

Die Bestimmung der Glutathionperoxidase-Aktivität im Plasma (pGPx) erfolgte analog zur cGPx-Bestimmung in der Leber. 50 μL der Plasmaproben wurden ohne Verdünnung zum Reaktionsansatz gegeben und die Extinktionsabnahme nach Zugabe von 50 μL H_2O_2 (5 mM) eine Minute lang gemessen.

3.3.6.3 Thioredoxinreduktase

Die Aktivität der Thioredoxinreduktase (TrxR) wurde modifiziert nach HILL et al. (1997) und GROMER et al. (1998) durchgeführt. TrxR ist eine starke Proteindisulfidreduktase und besitzt somit auch die Fähigkeit das artifizielle Disulfid 5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoat (DTNB) NADPH-abhängig zu 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB) zu reduzieren.

Zunächst wurden Leberhomogenate (1:10 in PBS) hergestellt und diese über Nacht bei 4 °C unter Rühren gegen PBS dialysiert (MWCO: 3500) um endogenes GSH zu entfernen. Da TrxR hitzestabil ist, folgte anschließend eine Erwärmung der Proben auf 55 °C für zehn Minuten im Wasserbad. Nach Herunterkühlen und Zentrifugation des bei dieser Temperatur ausgefällten Proteins wurden 100 μL des Überstandes, welcher die TrxR-Aktivität enthält, mit 845 μL Puffer (100 mM Kaliumphosphatpuffer, 2 mM EDTA, pH 7,4) und 30 μL DTNB (100 mM in DMSO) vermischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 μL NADPH (4 mM) gestartet und über zwei Minuten bei 412 nm die

Extinktionszunahme durch das gebildete TNB gemessen. Für den Blindwert wurde NADPH durch Kaliumphosphatpuffer ersetzt.

Der VK der Messwerte aus 8 unabhängigen Aufarbeitungen eines Homogenates belief sich auf 3,67 %. Die Errechnung der Aktivität erfolgte über folgende allgemeine Formel ($\epsilon_{\text{TNB},412 \text{ nm}} = 13,6$).

$$\text{mU/mg Protein} = \frac{(\Delta E * \text{Gesamtvolumen} * \text{Verdünnung})}{(2 * \epsilon * d * \text{Probenvolumen})} * 1000 / \text{Protein in mg}$$

Da die Aktivität rechnerisch auf den NADPH-Verbrauch bezogen wird und pro NADPH zwei TNB entstehen, wird in der Formelgleichung zusätzlich durch zwei dividiert.

3.3.7 Antioxidative Schutzmechanismen

3.3.7.1 Glutathion

Die Sulfhydrylform (GSH) und die Disulfidform (GSSG) des Glutathions wurden mit Hilfe eines GSH/GSSG-412TM-Kits (Oxis #21040) bestimmt. Dabei ist besondere Vorsicht bei der Messung der GSSG-Konzentration geboten, da GSSG nur in geringen Konzentrationen vorkommt und GSH bei der Aufarbeitung bereits zu GSSG umgewandelt wird und somit das Ergebnis verfälschen kann. 1-Methyl-2-Vinylpyridinium-Trifluoromethansulfonat (M2VP), welches an SH-Gruppen bindet, wird zum Schutz der Thiolgruppen im GSH-Molekül eingesetzt. Das Prinzip der Messung der GSH-Konzentration beruht auf der GSH-abhängigen Reduktion von DTNB zu TNB, welches bei 412 nm absorbiert. Um die Menge an GSSG zu bestimmen, wird zunächst durch die GR nach Zugabe von NADPH GSSG zu GSH reduziert. Im nächsten Schritt wiederum reduziert GSH DTNB zu TNB, welches photometrisch bestimmt wird.

Für die GSSG-Bestimmung wurden 10 μL M2VP in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt, 100 μL Leberhomogenat (1:10 in PBS) hinzu pipettiert, gemischt und bei Raumtemperatur für zehn Minuten inkubiert. Mittels Zugabe von 290 μL 5%iger Phosphorsäure wurde das Protein ausgefällt und anschließend abzentrifugiert. 50 μL des Überstandes wurden zu 600 μL GSSG Puffer (100 mM Natriumphosphat, 5mM EDTA,

pH 10,05) pipettiert und auf Eis gestellt. Für die GSH-Bestimmung wurden 50 μL des Leberhomogenates mit 350 μL Phosphorsäure gemischt, zentrifugiert und 50 μL des Überstandes zu 1 mL Assay Puffer (100 mM Natriumphosphat, 5 mM EDTA, pH 7,5) pipettiert und auf Eis gestellt. Jeweils 200 μL DTNB-Lösung (1,262 mM DTNB, 100 mM Natriumphosphat, 5 mM EDTA, 5 % Ethanol), GR (15 U/mL in 100 mM Natriumphosphat, 5 mM EDTA) und Probe wurden gemischt, bei Raumtemperatur für fünf Minuten inkubiert und nach Zugabe von 200 μL NADPH (3,8 μM in 10 μM Tris, 10 mg Mannitol) über drei Minuten im Photometer bei 412 nm gemessen. Die Errechnung der Konzentrationen an GSH und GSSG erfolgte über externe Eichkurven mit Hilfe eines Standards (0-1,5 μM GSSG, bzw. 0-3 μM GSH in 125 mM Kaliumphosphat, 2,5 mM EDTA). Der Korrelationskoeffizient beider Kurven belief sich auf $r=0,999$. Bei der Errechnung der GSSG-Konzentration wurde berücksichtigt, dass aus einem GSSG-Molekül zwei GSH-Moleküle entstehen. Um das Verhältnis von GSH zu GSSG zu ermitteln, wird die Differenz aus GSH und $2 \cdot \text{GSSG}$ gebildet (entspricht dem reduzierten GSH) dividiert durch die GSSG-Konzentration.

3.3.7.2 Glutathionreduktase

Die Aktivitätsbestimmung der Glutathionreduktase (GR) erfolgte nach einer von COHEN und DUVEL (1988) entwickelten Methode. GR katalysiert die Reduktion von GSSG zu GSH unter Verbrauch von NADPH. Aufgrund der unterschiedlichen Absorptionsmaxima von NADPH und des entstehenden NADP bei 340 nm kann die Extinktionsabnahme von NADPH bestimmt und somit auf die Aktivität der GR geschlossen werden.

In einer 1,5 mL Mikroküvette wurde durch Zugabe von 50 μL Leberhomogenat (1:10 in 10 mM Tris, pH 7,4) zu 850 μL GSSG-Lösung (1,18 mM GSSG in 100 mM Natriumphosphat, 1,5 mM EDTA) und 100 μL NADPH-Lösung (1 mM) die Reaktion gestartet und die Extinktionsänderung über eine Minute im Photometer gemessen. Parallel zu jeder Probe wurde ein Blindwert angesetzt, der anstelle der Probe 50 μL ddH₂O enthielt.

Mittels eines GR-Standards aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde in einem Bereich von 0-75 mU eine Eichkurve ($r=0,999$) erstellt. Bei der 10-fach Bestimmung in einem

Homogenat lag der VK bei dieser Methode bei 2,68 % und in 10 verschiedenen Homogenaten einer Leberprobe bei 5,81 %. Die Berechnung der spezifischen Aktivitäten fand anhand der folgenden allgemeinen Formel statt, wobei 1 Unit 1 μmol NADPH-Umsatz/min entspricht ($\epsilon_{\text{NADPH},340 \text{ nm}} = 6,22$).

$$\text{U/mg Protein} = \frac{(\Delta E * \text{Verdünnung})}{(\epsilon * 0.05)} \Bigg/ \text{Protein in mg}$$

3.3.7.3 Glutathion-S-Transferase

Die Aktivität der Glutathion-S-Transferase (GST) wurde nach einer Methode von HABIG und JAKOBY (1981) bestimmt. Die GST katalysiert eine Vielzahl von Reaktionen, in denen Glutathion als Nucleophil reagiert. Das Messprinzip der Methode beruht auf einer Änderung der Extinktion des verwendeten Substrates (1-Chloro-2,4-dinitrobenzol) nach Konjugation mit Glutathion.

Für die Bestimmung wurde das Leberhomogenat (1:10 in 10 mM Tris, pH 7,4) mit Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,5) auf eine Endverdünnung von 1:500 gebracht. Im Reaktionsansatz wurden 10 μL 1-Chloro-2,4,-dinitrobenzol (100 mM in 99 %igem Ethanol) mit 790 μL Kaliumphosphatpuffer und 100 μL GSH (10 mM) vermischt und auf 25 °C temperiert. Durch Zusatz von 100 μL Probe wurde die Reaktion gestartet und bei 25 °C über eine Minute bei 340 nm gemessen. Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde anhand von 8 Messungen eines Homogenates überprüft (VK=4,12 %). Der VK in 8 verschiedenen Homogenaten einer Leberprobe lag bei 13,4 %. Die Aktivität der GST wurde über eine Eichkurve mit Hilfe eines GST-Standards aus Rattenleber (0-500 mU GST-Aktivität im Reaktionsansatz, $r=0,997$) errechnet und in mU/mg Protein angegeben.

3.3.7.4 Vitamin C

Zur Messung der Vitamin C-Konzentration nach WEBER et al. (1999) wurden die Leberproben in 940 μL eiskaltem PBS/EDTA-Puffer (1 mM EDTA) aufgenommen, 60 μL BHT (10 mg/mL) zugegeben und für zwei Minuten kräftig geschüttelt. Nach Filtration

wurde der Vitamin C-Gehalt sofort mittels C18-Reversed-Phase-HPLC (Shimadzu) mit Fluoreszenz-Detektion gemessen. Die Bestimmung der Vitamin C-Konzentration erfolgte mit Hilfe eines Ascorbat-Standards, welcher täglich frisch hergestellt wurde.

3.3.8 Parameter oxidativer Zellschädigung

3.3.8.1 Comet Assay

Der Comet Assay als eine Methode zur Bestimmung von DNA-Schäden wurde mit Hilfe von vorgefertigten CometSlides™ (Trevigen, #4250-50-K) durchgeführt. Im elektrischen Feld wandern DNA-Fragmente, welche durch Einfach- oder Doppelstrangbrüche der DNA entstanden sind, aus dem Kern. Ungeschädigte DNA dagegen verbleibt innerhalb des Kerns. Das entstandene Bild gleicht einem Cometen, daher der Name „Comet Assay“. Nach Anfärben der DNA mit Fluoreszenzfarbstoff kann anhand der Länge und Intensität des Schweifes das Ausmaß der DNA-Schädigung ermittelt werden.

Um Schäden durch UV-Licht zu verhindern, erfolgte die Aufarbeitung der Proben unter Rot- bzw. Grünlicht. 100 mg Leber wurden in 1 mL eiskaltem PBS/EDTA-Puffer (20 mM EDTA, pH 7,4) mit einer Schere in Stücke geschnitten, der blutreiche Überstand verworfen und die Leber abermals in 300 μ L PBS/EDTA zerkleinert. Nach Durchstreichen durch ein Sieb wurden die Zellen 1:20 mit PBS verdünnt, mit flüssiger (42 °C) Agarose in einem Verhältnis von 1:10 gemischt und von der Zellsuspension jeweils 50 μ L auf den CometSlide mit einer Pipettenspitze verteilt. Pro Objektträger konnten zwei Proben aufgetragen werden. Nach Antrocknen der Agarose für zehn Minuten bei 4 °C folgte die Lyse der Zellen durch Inkubation in „Lysis“-Lösung (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trizma Base, 1 % Natriumlaurylsarcosinat, 0,01 % Triton X-100, pH 10) für 30 Minuten auf Eis. Anschließend wurde die DNA mittels Alkalilösung (0,3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) bei Raumtemperatur durch Inkubation für 60 Minuten denaturiert. Nach zwei Waschschritten in 1x TBE-Puffer (90 mM Tris-Borat, 2 mM EDTA) wurden die CometSlides für zehn Minuten einer Elektrophorese (BIORAD, Sub-Cell GT) bei einer Stromstärke von 30 V ausgesetzt. Die Proben wurden anschließend mittels eiskaltem Methanol und Ethanol getrocknet und bis zum Anfärben bei Raumtemperatur trocken gelagert.

Nach Anfärben der DNA mit 50 μL 2x SYBR Green erfolgte die Auswertung der DNA-Schäden unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Olympus Provis, AX70) nach Blauanregung (425-500 nm) bei einer Vergrößerung von 200x. Pro Leber wurden mindestens 50 Aufnahmen gespeichert und mit Hilfe einer Software (EuclidComet Analysis) ausgewertet.

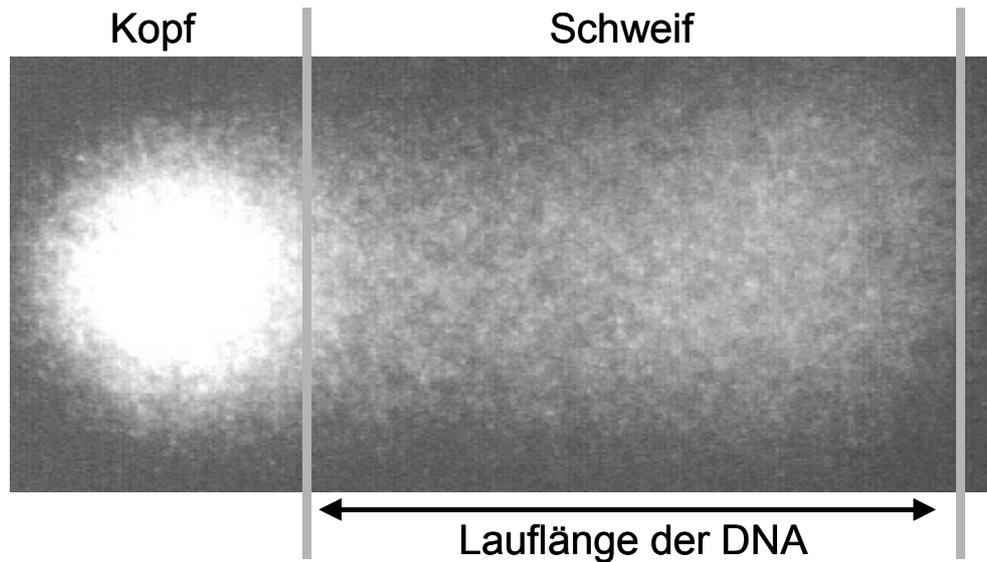


Abbildung 8: Darstellung einer geschädigten DNA mit den im Comet Assay erhobenen Parametern

Der Grad der Schädigung wurde anhand der Parameter „% DNA im Schweif“ und „Tailmoment“ (% DNA im Schweif x Lauflänge) angegeben (Abbildung 8).

Für die Erstellung von Positiv-Kontrollen wurden Leberzellen vor der Lyse mit 100 mM H_2O_2 -Lösung für 20 Minuten auf Eis behandelt. In dem Bereich von 0-200 mM wurde mit H_2O_2 und dem Parameter % DNA im Schweif eine Eichkurve ($r=0,953$) erstellt. Der VK von 8 unabhängig aufgearbeiteten Leberproben lag für den Parameter % DNA im Schweif bei 17,8 %.

3.3.8.2 Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen

Zur Erfassung des Ausmaßes an Lipidschädigung wurden die Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBA-RS) fluorometrisch nach GÜNTHER et al. (1994) bestimmt. Tertiäre

Abbauprodukte ungesättigter Fettsäuren wie Aldehyde und Ketone bilden zusammen mit TBA einen rosafarbenen Trimethin-Farbstoff, welcher in Butanol extrahiert und im Fluorometer gemessen werden kann.

Zunächst wurde das Protein in den Leberhomogenaten (1:10 in 10 mM Tris, pH 7,4, bzw. 1:20 bei den Gruppen I und III) mittels 5 %iger Trichloressigsäure ausgefällt und abzentrifugiert. 500 μL des Überstandes wurden mit 500 μL 1 %iger TBA und 50 μL 0,5 %igem BHT-SDS in zuvor mit TBA und Phosphorsäure ausgekochten Reagenzgläsern für 15 Minuten im 100 °C Wasserbad erhitzt und danach auf Eis abgekühlt. Nach Extraktion des Farbstoffes in 3 mL Butanol und Trennung der Phasen durch Zentrifugation wurde die Butanolphase abgenommen und im Fluorometer gemessen (Extinktion: 532 nm, Emission: 553 nm).

Die Messung von 10 unabhängigen Aufarbeitungen aus einem Leberhomogenat ergab einen VK von 3,4 %. Die Errechnung der TBA-RS-Konzentration erfolgte mit Hilfe einer 1,2,3,3-Tetraethoxypropan-Eichkurve (0-2,64 μM , $r=0,998$) und wurde in nmol/g Frischmasse angegeben.

3.3.8.3 γ -Glutaminsynthetase

Die γ -Glutaminsynthetase (γ -GS) katalysiert im Organismus die ATP-abhängige Fixierung von Ammoniak auf Glutamat. Bei der durchgeführten indirekten Bestimmung nach MILLER et al. (1978) wird eine weitere von der γ -GS katalysierte Reaktion herangezogen, welche jedoch unter physiologischen Bedingungen nicht stattfindet. Dabei wird Hydroxylamin auf Glutaminsäure übertragen, wobei γ -Glutamin-Hydroxamat entsteht, welches in Anwesenheit von Eisen-(III)-Ionen rotbraune Komplexe bildet. Diese sind photometrisch bei 505 nm messbar.

Zu 400 μL Imidazol-HCl (125 mM, pH 6,8) wurden jeweils 100 μL Hydroxylamin (0,5 M), L-Glutamin (1 M), Kaliumarsenat (0,25 M), ADP (2 mM) und Manganchlorid (5 mM) hinzupipettiert. Durch Zugabe von 100 μL der Leberhomogenate (1:10 in 10 mM Tris, pH 7,4) wurde die Reaktion gestartet, gemischt und bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf von 15 Minuten führte die Zugabe einer Eisen/TCA-Lösung (0,37 M FeCl_3 , 0,3 M TCA, 0,6 M

HCl) durch Ausfällung des Proteins zum Abbruch der Enzymreaktion. Nach Zentrifugation konnte der Farbkomplex im Überstand gemessen werden.

Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde anhand der Messung von 8 unabhängigen Aufarbeitungen eines Leberhomogenates überprüft (VK=5,58 %). Die Enzymaktivität wurde mit Hilfe einer Eichkurve mit einer definierten Konzentration an Glutamin-Hydroxamat (0-1000 μM , $r=0,999$) errechnet, wobei 1 Unit Enzymaktivität 1 μM Substratumsatz entsprechen. Die Ergebnisse wurden in U/mg Protein angegeben.

3.3.8.4 Lactatdehydrogenase

Die Lactatdehydrogenase (LDH) katalysiert die Umsetzung von Pyruvat zu Lactat unter NADH-Verbrauch. Die Abnahme von NADH kann photometrisch bei 365 nm verfolgt werden.

Für die Bestimmung wurde zunächst Plasma 1:3 mit 0,9 %iger NaCl verdünnt. Danach wurden 3 mL Phosphatpuffer (0,05 M Kaliumphosphat, 0,63 mM NaPyruvat, pH 7,5), welcher zuvor auf 25 °C temperiert wurde, mit 0,05 mL NADH (11,34 mM) vermischt und die Enzymreaktion durch Zugabe von 100 μL Plasma gestartet. Nach einminütiger Inkubation bei 25 °C erfolgte eine fünfminütige Messung des Extinktionsverlaufes. Die Aktivität wurde anhand der folgenden allgemeinen Formel errechnet ($\epsilon_{\text{NADH},365 \text{ nm}} = 3,4$) und das Ergebnis in U/L angegeben.

$$\text{U/L} = \frac{(\Delta E * 1000 * \text{Gesamtvolumen} * \text{Verdünnung})}{(\epsilon * d * \text{Probenvolumen})}$$

3.3.8.5 Metallothionein

Zur Bestimmung des Gesamt-Metallothioneins (MT) wurde auf die Cadmium-Bindungsmethode nach EATON und TOAL (1982) zurückgegriffen. Radioaktives Cadmium (Cd^{109}) bindet an Metallothionein und verdrängt dabei aufgrund höherer Affinität im Vergleich zu anderen Schwermetallen diese aus ihren Bindungsstellen. Überschüssiges Cadmium wird durch Hämoglobin gebunden, anschließend durch

Erhitzen denaturiert und abzentrifugiert. Im Überstand wird die Radioaktivität gemessen und daraus die MT-Konzentration berechnet.

250 μL Leberhomogenat (1:10 in 10 mM Tris, pH 7,4) wurde mit 200 μL Cd-Gebrauchslösung (1,5 μg Cd/mL, 1,15 μCi Cd¹⁰⁹/mL) gemischt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 100 μL 2 %iger Hämoglobinlösung wurden die Proben erneut gemischt, für zwei Minuten bei 100 °C erhitzt, auf Eis gekühlt und das überschüssige Cd mit dem denaturierten Hämoglobin abzentrifugiert. Das hitzestabile MT verbleibt dabei im Überstand. Nach Wiederholung dieses Vorganges wurde im Überstand die an MT gebundene Radioaktivität der Proben ($\text{Cts}_{(P)}$) im Gammacounter gemessen. Neben einer Doppelbestimmung der Proben wurde weiterhin ein Blindwert mit Tris-HCl ($\text{Cts}_{(B)}$) sowie die Totalaktivität ($\text{Cts}_{(T)}$) gemessen.

Die Berechnung der MT-Konzentration erfolgte nach der Formel:

$$\text{ng MT/mg Protein} = \frac{(\text{Cts}_{(P)} - \text{Cts}_{(B)}) * \frac{10,68}{\text{Cts}_{(T)}} * \text{Verdünnung}}{\text{Protein in mg}}$$

3.4 Differentielle Genexpressionsanalyse in der Leber

Eine eventuelle, durch VE und/oder Se-Mangel induzierte differentielle Genexpression in der Leber wurde mit Hilfe des Atlas Rat Toxicology Arrays II (Clontech, Heidelberg #7732-1) ermittelt. Auf dem Array befanden sich cDNA-Bereiche von 450 Rattengenen sowie von neun „Housekeeping“-Genen, deren Expression von der Behandlung nicht beeinflusst werden sollte. Zur internen Kontrolle der Expression im Se-Mangel befand sich das Gen der Se-abhängigen cGPx auf dem Array. Plasmid- und Bacteriophagen-cDNA dienen als Negativ-Kontrollen. Jedes Gen ist jeweils durch zwei Spots repräsentiert, wobei jeder Spot 10 ng eines PCR-amplifizierten Fragments enthält. Die Aufreinigung der RNA, Markierung, Hybridisierung und Auswertung erfolgte bei der Firma Artus GmbH (Hamburg). Der Ablauf über die Probenaufbereitung und –auswertung ist in Abbildung 9 zusammenfassend dargestellt.

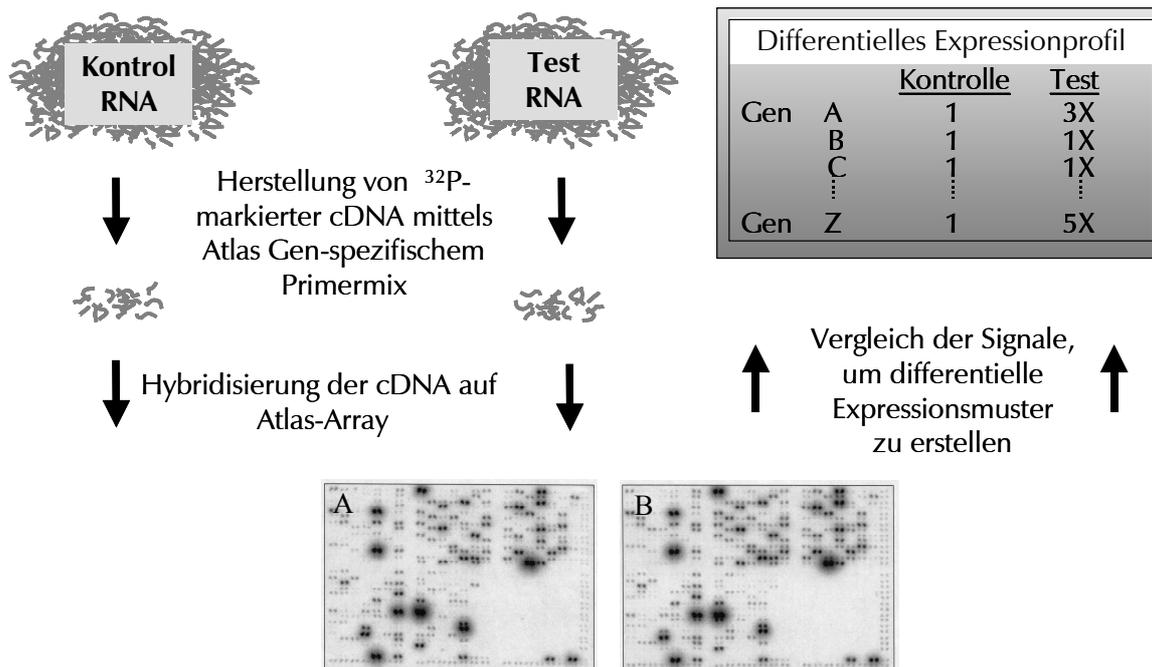


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Probenaufbereitung, Hybridisierung und Auswertung differenzieller Genexpression mittels cDNA-Array

Die Verifizierung der Expressionsdaten erfolgte auf Proteinebene durch Messung der cGPx-Aktivität sowie Bestimmung der Glutathion- und MT-Konzentration.

3.4.1 Aufbereitung und Markierung der Leberproben mit P³²

Zunächst wurde aus der Leber von jeweils 3 Tieren einer Gruppe die Gesamt-RNA mit Hilfe eines RNeasy-Kits (Qiagen #74103) isoliert. Dabei werden die Zellen beim Homogenisieren mit Hilfe von Guanidin/Isothiocyanat lysiert. Um ideale Bindungskonditionen zu schaffen wird Ethanol zugegeben und das Lysat auf „RNeasy spin columns“ übertragen. Diese bestehen aus einer Silicium-Gelmembran, an die die Gesamt-RNA bindet, während die restlichen Zellbestandteile ausgewaschen werden. Zum Schluss wird die RNA mit DEPC-behandeltem Wasser eluiert.

Die isolierte RNA wurde durch Agarose-Gel-Elektrophorese auf einen potentiellen Abbau durch RNase und DNA-Kontaminationen überprüft und bei -80 °C gelagert.

Die RNA der 3 Tiere einer Gruppe wurde gepoolt und ca. 3 μg RNA für die Markierung mit P^{32} verwendet. Für jede Leberprobe bzw. für eine Kontroll-Probe wurden 2 μL 5x Reaktionspuffer (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl_2 , pH 8,3), 1 μL 10x dNTP Mix (jeweils 5 mM dCTP, dGTP, dTTP), 3,5 μL [$\alpha\text{-P}^{32}$] dATP (3,000 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$) und 0,5 μL DTT (100 mM) in ein 0,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur pipettiert und somit ein „Master Mix“ hergestellt. Im nächsten Schritt wurden 1-2 μL RNA, 1 μL CDS Primer Mix und je nach Bedarf ddH₂O auf ein Endvolumen von 3 μL eingestellt, durch Pipettieren gemischt, zentrifugiert und bei 70 °C für zwei Minuten inkubiert. Der für diesen Atlas Array spezifische CDS Primer Mix gewährleistet, dass ausschließlich die mRNA in cDNA umgeschrieben wird, zu der sich komplementäre cDNA-Sonden auf dem Array befinden. Danach wurde die Temperatur auf 50 °C reduziert und die Proben für weitere zwei Minuten inkubiert. Während dieser Inkubation wurde pro Ansatz je 1 μL MMLV Reverse Transkriptase zu dem Master Mix hinzugefügt und gemischt. Nach Vollendung der zweiminütigen Inkubation der Proben bei 50 °C wurden 8 μL Master Mix zu jedem Reaktionsgefäß hinzupipettiert, gemischt und erneut bei 50 °C für weitere 25 Minuten inkubiert. Das Beenden der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 1 μL 10x Stopplösung (0,1 M EDTA, 1 mg/mL Glycogen, pH 8,0). Mittels des Atlas NucleoSpin Extraktions-Kits (Clontech, #K3051) wurde anschließend die so markierte „First Strand cDNA“ von nicht-inkorporierten P^{32} -Nukleotiden und kleinen cDNA-Fragmenten gereinigt.

3.4.2 Hybridisierung der cDNA mit dem Rat Toxicology Array II

Zur Vorbereitung auf die Hybridisierung wurden zunächst 5 mL einer Hybridisierungslösung (ExpressHyb™ Hybridization Solution, Clontech #8015) bei 68 °C vorgewärmt. 0,5 mg Lachssperma-DNA (10 mg/mL) wurden bei 95-100 °C für fünf Minuten denaturiert, auf Eis gekühlt und mit der Hybridisierungslösung gemischt. Danach wurde der mit ddH₂O angefeuchtete Atlas Array in einem Hybridisierungsbehälter mit ddH₂O platziert, das Wasser entfernt und die Hybridisierungslösung gleichmäßig über die Membran verteilt. Für 30 Minuten wurde bei kontinuierlichem Schütteln prehybridisiert.

200 μL der markierten cDNA wurden mit 10x Denaturierungslösung (1M NaOH, 10 mM EDTA) gemischt (Endvolumen: 222 μL) und bei 68 °C für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 5 μL C₀t-1 DNA (1 mg/mL) und 225 μL 2x Neutralisierungslösung (1 M NaH₂PO₄, pH 7,0) hinzugefügt und die Proben bei 68 °C für weitere zehn Minuten inkubiert. Dieser Mix wurde vorsichtig zu der Membran gegeben und über Nacht bei 68 °C hybridisiert.

Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung entfernt und mit 200 mL vorgewärmter (68 °C) Waschlösung 1 (2x SSC, 1 % SDS) ersetzt. Nach vier Waschvorgängen von jeweils 30 Minuten wurde ein Waschvorgang mit Waschlösung 2 (0,1x SSC, 0,5 % SDS) für 30 Minuten durchgeführt. Zum Schluss wurde die Membran für fünf Minuten bei Raumtemperatur in 2x SSC gewaschen und danach in Plastik eingeschweißt, um ein Austrocknen zu verhindern. Für jede Versuchsgruppe wurde je eine Membran hybridisiert. Die Expressionsprofile wurden im Phosphorimager nach 1-wöchiger Exposition erstellt.

3.4.3 Bildauswertung

Die Auswertung der Expressionsprofile erfolgte mit Hilfe der Atlas™ Software. Der Hintergrund wurde über die sog. „externe“ Hintergrund-Kalkulation berechnet, wobei der Hintergrund als die mittlere Intensität der unbesetzten Stellen auf dem Array angenommen wird. Um die Intensitäten zweier Arrays vergleichen zu können, wurde mit Hilfe der durchschnittlichen Intensität aller Gene auf einem Array ein Normalisierungsfaktor errechnet. Dieser Faktor wurde zusammen mit dem Hintergrundwert zur Errechnung der bereinigten Intensitäten („adjusted intensity“) verwendet, indem der Hintergrund von der Intensität abgezogen und die Differenz mit dem Normalisierungsfaktor multipliziert wurde. Ein Signal wurde vom Hintergrundrauschen unterschieden, wenn die Signalintensität den mindestens doppelten Wert des Hintergrundes annahm.

Um signifikante Unterschiede zwischen den bereinigten Intensitäten eines Genes auf verschiedenen Membranen und damit die Expression des Genes in den verschiedenen Gruppen erkennen zu können, wurde für jedes Gen das Verhältnis der Intensität auf den

Arrays der Gruppen I-III mit der Intensität auf dem Array der Gruppe IV gebildet. Ein Unterschied in der Genexpression wurde erst bei einem Verhältnis von ≥ 2 als signifikant betrachtet, um mögliche Fehlinterpretationen zu minimieren. Laut Herstellerangaben kann für eine zwei- bis fünffache Änderung eine mehr als 70 %ige Übereinstimmung mit einer PCR-Verifizierung erwartet werden.

3.5 Statistische Auswertung

Die Berechnungen zur beschreibenden Statistik wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL 2000 durchgeführt. Die im Text und in den Tabellen angegebenen Ergebnisse stellen Gruppenmittelwerte (M) und Standardabweichungen (SD) der Messwerte der einzelnen Tiere einer Gruppe dar.

Die schließende Statistik wurde mit dem Programmpaket SPSS für Windows, Version 10.0 berechnet.

Zunächst erfolgte die Prüfung auf Normalverteilung der Messwerte, berechnet anhand der Residuen, mit den Tests nach Kolmogorow-Smirnow ($\geq 0,05$) und Shapiro-Wilk ($\geq 0,01$). Das Vorliegen von Varianzhomogenität wurde mit dem Levene-Test ($\geq 0,05$) überprüft. Mit der Prozedur UNIANOVA wurden die Behandlungsmittelwerte der vier Versuchsgruppen miteinander verglichen. Bei fehlender Normalverteilung erfolgte der Mittelwertvergleich nach logarithmischer Transformation bzw. Ziehen der Quadratwurzel. Als Ausreißer ermittelte Tiere (maximal ein Tier pro Gruppe) wurden von den statistischen Analysen ausgeschlossen. Im Falle homogener Varianzen wurden signifikante Unterschiede über den Tukey-HSD-Test ermittelt, bei Varianzheterogenität über den Games-Howell-Test.

Signifikante Mittelwertunterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Versuchsgruppen sind in den Ergebnistabellen mit unterschiedlichen Hochbuchstaben gekennzeichnet.

Der einfaktoriellen Auswertung lag folgendes statistische Modell zugrunde:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

y_{ij} = abhängiger Messwert

μ = Gesamtmittelwert über alle Messungen

α_i = Effekt der i-ten Versuchsgruppe; $i = 1-4$

ε_{ij} = Restfehler

Der Einfluss von Se und VE auf die untersuchten Parameter wurde mit der Prozedur UNIANOVA nach gegebener Normalverteilung und Varianzhomogenität zweifaktoriell ausgewertet. Bei Varianzheterogenität erfolgte die Auswertung mit der Prozedur Mixed des SAS Systems bei getrennter Schätzung der Varianzen innerhalb der Gruppen.

Das statistische Modell der zweifaktoriellen Auswertung lautete wie folgt:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

y_{ijk} = abhängiger Messwert

μ = Gesamtmittelwert über alle Messungen

α_i = Effekt des Selens; $i = 0-1$

β_j = Effekt des Vitamin E; $j = 0-1$

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Interaktion zwischen Selen und Vitamin E

ε_{ijk} = Restfehler

4 Ergebnisse

4.1 Selen- und Vitamin E-Konzentrationen in den Versuchsdiäten

Zur Erzeugung eines alimentären Se- und/oder VE-Mangels bei wachsenden männlichen Ratten wurde eine Se- und VE-arme Basisdiät erstellt. Die Se-Zulage sollte 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Diät als Natriumselenat und die VE-Zulage 75 mg α -Tocopherylacetat je kg Diät betragen.

Die Se-Konzentrationen der Diäten III und IV entsprachen den angestrebten Werten von 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Diät (Tabelle 8). In den Mangeldiäten I und II konnte Se nicht mehr nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze der AAS-Messung lag dabei bei $<30 \mu\text{g}$ Se/kg Diät.

α -Tocopherylacetat wurde in einer Konzentration von 70,3 mg/kg in Diät II bzw. 66,3 mg/kg in Diät IV bestimmt, während die Diäten I und III kein α -Tocopherylacetat enthielten. α -Tocopherol konnte in allen vier Diäten in geringer Konzentration nachgewiesen werden, wobei Diät I etwas niedriger lag als die übrigen Diäten.

Die ebenfalls analysierten Konzentration an γ -Tocopherol lag in allen Versuchsdiäten weit unterhalb der Nachweisgrenze von 0,01 mg/kg.

Tabelle 8: Selen- und Vitamin E-Konzentrationen in den Versuchsdiäten

Diät		Selen ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	α -Tocopherol (mg/kg)	α -Tocopherylacetat (mg/kg)
I (-Se -VE)	M	—*	2,43	—
	SD		0,074	
II (-Se +VE)	M	—*	3,13	70,3
	SD		0,114	3,83
III (+ Se -VE)	M	224	2,97	—
	SD		6,2	
IV (+Se +VE)	M	203	3,10	66,3
	SD		10,5	0,097

* unterhalb der Nachweisgrenze von 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Diät

4.2 Gehalt an Rohnährstoffen und ausgewählten Mengen- und Spurenelementen in den Versuchsdiäten

Die analysierten Parameter der Weender Futtermittelanalyse (TM, XA, XP, XL, XF) sowie die Gehalte der Mengen- und Spurenelemente Ca, P, Fe, Cu, Zn und Mn stimmten im Vergleich mit den angestrebten Werten als auch im Vergleich der vier Diäten untereinander gut überein (Tabelle 9). Die nach AIN-93 (REEVES et al. 1993) festgelegten Anforderungen an Protein, Fett, Energiegehalt und Mineralstoffversorgung für Ratten wurden von den Diäten erfüllt.

Tabelle 9: Gehalt an Rohnährstoffen sowie ausgewählten Mengen- und Spurenelementen in den Versuchsdiäten

	Versuchsdiät			
	I	II	III	IV
Trockenmasse (TM) (%)	90,2	90,4	90,5	90,4
Rohasche (XA) (% der FM)	3,29	3,31	3,35	3,32
Rohprotein (XP) (% der FM)	14,1	14,0	13,7	14,0
Rohfett (XL) (% der FM)	6,72	6,78	6,72	6,90
Rohfaser (XF) (% der FM)	5,56	5,63	5,42	5,68
Ca (g/kg FM)	5,37	5,43	5,54	5,59
P (g/kg FM)	3,96	4,20	4,30	4,22
Fe (mg/kg FM)	53,0	53,3	55,5	50,1
Cu (mg/kg FM)	5,67	7,70	9,00	9,48
Zn (mg/kg FM)	56,6	59,6	59,3	60,8
Mn (mg/kg FM)	17,6	18,4	17,8	18,1

4.3 Futteraufnahme, Lebendmasseentwicklung und Futterverwertung

In Tabelle 10 sind wöchentliche Futteraufnahme, Gesamtfutteraufnahme und Futterverwertung der Ratten über den 7-wöchigen Versuchszeitraum aufgeführt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Doppelmangelgruppe zeigte jedoch gegenüber den restlichen drei Gruppen ab der 6. Woche eine tendenziell geringere Futteraufnahme, die sich auch in einer verminderten Gesamtfutteraufnahme widerspiegelte. Die Futterverwertung (FV), welche die Umsetzung des Futters in Lebendmasse ausdrückt, ergab über den gesamten Versuchszeitraum berechnet einen Wert von 3,59 g/g (Gruppe I), 3,30 g/g (Gruppe II), 3,26 g/g (Gruppe III) und 3,34 g/g (Gruppe IV). Damit lag die Futterverwertung bei den Doppelmangel-Tieren signifikant ungünstiger als bei den restlichen Tieren.

Tabelle 10: Wöchentliche Futteraufnahme, Gesamtfutteraufnahme und Futterverwertung der Versuchstiere

Gruppe	Wöchentliche Futteraufnahme (g)								gesamt (g)	FV (g/g)
	d ₁ -d ₇	d ₈ -d ₁₄	d ₁₅ -d ₂₁	d ₂₂ -d ₂₈	d ₂₉ -d ₃₅	d ₃₆ -d ₄₂	d ₄₃ -d ₄₉	d ₁ -d ₄₉		
I (-Se -VE)	M	55,2	74,7	99,0	108,3	110,4	107,3	118,5	673,3	3,59 ^b
	SD	4,79	7,00	11,8	29,6	16,9	29,6	26,9	83,4	0,17
II (-Se +VE)	M	56,8	76,0	99,0	112,3	125,6	129,1	136,5	735,2	3,30 ^a
	SD	4,51	10,8	9,97	10,4	15,1	17,4	11,8	69,2	0,10
III (+Se -VE)	M	53,6	72,3	92,1	101,9	109,5	125,8	126,9	682,0	3,26 ^a
	SD	6,18	5,64	5,56	6,10	5,72	8,04	11,0	38,7	0,13
IV (+Se +VE)	M	57,6	79,6	101,5	103,0	120,1	127,8	136,3	725,9	3,34 ^a
	SD	1,97	5,52	7,82	23,3	17,4	16,7	12,9	69,3	0,17

Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte (TUKEY-HSD, $p < 0,05$)

Bis zum Tag 35 verlief die Entwicklung der Lebendmasse in allen vier Gruppen parallel (Tabelle 11). Danach war in Gruppe I ein Rückgang der Zunahmen zu verzeichnen, der am Ende des Versuches am Tag 49 als signifikant gegenüber den Gruppen II und IV abgesichert werden konnte. Der alleinige VE-Mangel in Gruppe III führte ebenfalls zu

einer tendenziell geringeren Lebendmasse, die sich jedoch nicht signifikant von den anderen drei Gruppen unterschied. Die VE-supplementierten Gruppen II und IV befanden sich während des gesamten Versuchszeitraumes auf vergleichbarem Niveau. Gleiche Tendenzen spiegelten sich auch in dem Parameter „Gesamtzunahme der Lebendmasse“, die sich signifikant in Gruppe I von den Gruppen II und IV unterschied und damit auch in dem Parameter „mittlere Tageszunahme“ der Ratten wider. Im Doppelmangel wurden mittlere Tageszunahmen von 3,66 g erreicht, welche damit signifikant niedriger lagen als die mittleren täglichen Zunahmen in den Versuchsgruppen II mit 4,42 g und IV mit 4,44 g. Gruppe III unterschied sich mit 4,28 g nicht signifikant von den Gruppen I, II und IV.

Tabelle 11: Lebendmasse und Lebendmassezunahme (LMZ) der Versuchstiere

Gruppe	Lebendmasse (g)									LMZ	
	d ₀	d ₇	d ₁₄	d ₂₁	d ₂₈	d ₃₅	d ₄₂	d ₄₉	gesamt (g)	(g/d)	
I (-Se -VE)	M	35,0	55,9	82,4	120	155	181	198	215 ^a	180 ^a	3,66 ^a
	SD	2,16	4,40	7,97	11,7	14,1	16,1	27,8	40,0	39,1	0,80
II (-Se +VE)	M	35,0	55,4	81,7	119	158	194	223	251 ^b	216 ^b	4,42 ^b
	SD	2,04	3,01	3,98	6,27	6,60	14,3	16,4	17,2	16,8	0,34
III (+Se -VE)	M	34,9	57,5	84,0	119	153	185	217	245 ^{ab}	210 ^{ab}	4,28 ^{ab}
	SD	2,05	5,47	6,55	7,39	10,2	10,5	12,3	16,6	16,7	0,34
IV (+Se +VE)	M	35,0	57,6	87,4	126	157	192	222	252 ^b	217 ^b	4,44 ^b
	SD	2,03	2,63	5,25	6,77	15,0	20,3	23,5	23,5	22,9	0,47

Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte (TUKEY-HSD, $p < 0,05$)

4.4 Vitamin E-Konzentrationen in Plasma und Leber

Durch die VE-Zulage in den Gruppen II und IV konnte eine signifikante Erhöhung der α -Tocopherol-Konzentration im Plasma festgestellt werden (Tabelle 12). Der durch den Einsatz von VE-entzogenem Maiskeimöl hervorgerufene VE-Mangel in den Gruppen II und IV manifestierte sich durch einen Abfall der α -Tocopherol-Gehalte im Plasma auf ca. 5 % der supplementierten Gruppen. Parallel dazu verlief die Entwicklung der α -

Tocopherol-Konzentrationen in der Leber. Hier sanken die Gehalte auf ca. 3,5 % der Kontrollgruppen ab. Für VE wurde mittels zweifaktorieller ANOVA ein Einfluss von $p < 0,001$ für beide VE-Status-Parameter errechnet. Se übte auf den α -Tocopherol-Gehalt im Plasma einen statistisch gesicherten Einfluss ($p = 0,020$) aus, während der Gehalt in der Leber von der Se-Zulage nicht signifikant beeinflusst wurde.

Tabelle 12: α -Tocopherol-Konzentrationen in Plasma und Leber nach 49-tägiger Versuchsdauer

Gruppe		α -Tocopherol ($\mu\text{g/mL}$ Plasma)	α -Tocopherol ($\mu\text{g/g}$ Leber FM)
I	M	0,495 ^a	1,04 ^a
(-Se -VE)	SD	0,08	0,19
II	M	10,0 ^b	29,0 ^b
(-Se +VE)	SD	1,62	3,54
III	M	0,410 ^a	1,15 ^a
(+Se -VE)	SD	0,09	0,24
IV	M	9,13 ^b	32,6 ^b
(+Se +VE)	SD	0,82	3,42
zweifaktorielle ANOVA			
Se		0,020	0,061
VE		<0,001	<0,001
Se*VE		0,340	0,866

Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte (TUKEY-HSD, $p < 0,05$; ln-Transformation: VE Plasma, VE Leber)

4.5 Selen-Konzentration und Selen-abhängige Enzyme in Plasma und Leber

In Tabelle 13 sind verschiedene Se-Statusparameter zusammengestellt. Die Se-abhängigen Enzyme pGPx, cGPx und TrxR zeigten übereinstimmend einen signifikanten Aktivitätsabfall in den Mangelgruppen I und II im Vergleich zu den supplementierten Gruppen III und IV. Die Aktivität der pGPx lag im Se-Mangel bei ca. 44 % der Kontrollgruppen. Die TrxR in der Leber reagierte auf den Se-Mangel durch einen Aktivitätsverlust von ca. 87 % gegenüber der Kontrolle.

Am deutlichsten manifestierte sich der Se-Mangel im Aktivitätsabfall der cGPx in der Leber. Im Doppelmangel lag die Aktivität bei 5,45 mU/mg Protein. Die alleinige VE-Supplementation in Gruppe II führte zu einer signifikant höheren Aktivität von 10,9 mU/mg Protein. Die Se-Supplementation erhöhte die Aktivität der cGPx signifikant auf 154 mU/mg Protein (Gruppe III) bzw. 161 mU/mg Protein (Gruppe IV). Parallel zur Aktivität der cGPx verhielt sich der Se-Gehalt in der Leber. Im Doppelmangel (26,3 µg/kg FM) erreichte die Se-Konzentration einen Wert von 3 % im Vergleich mit den Gruppen III (900 µg/kg FM) und IV (883 µg/kg FM). Der Se-Gehalt von 32,6 µg/kg FM in der VE-supplementierten Gruppe II konnte als signifikant gegenüber der Gruppe I abgesichert werden.

Tabelle 13: Selen-Statusparameter in Plasma und Leber nach 49-tägiger Versuchsdauer

Gruppe		pGPx Plasma (mU/mg Protein)	cGPx Leber (mU/mg Protein)	TrxR Leber (mU/mg Protein)	Selen Leber (µg/kg)
I	M	3,82 ^a	5,45 ^a	1,32 ^a	26,3 ^a
(-Se -VE)	SD	0,53	0,96	0,17	3,6
II	M	4,40 ^a	10,9 ^b	1,16 ^a	32,6 ^b
(-Se +VE)	SD	0,93	1,58	0,11	4,9
III	M	10,5 ^b	154 ^c	9,46 ^b	900 ^c
(+Se -VE)	SD	2,40	11,8	1,05	79,8
IV	M	8,13 ^b	161 ^c	9,25 ^b	883 ^c
(+Se +VE)	SD	2,03	15,1	0,89	44,1
zweifaktorielle ANOVA					
Se		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
VE		0,104	<0,001	0,230	0,023
Se*VE		0,013	<0,001	0,668	0,009

Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte (cGPx, Se: TUKEY-HSD; pGPx, TrxR: GAMES-HOWELL, $p < 0,05$; ln-Transformation: cGPx, Se; Wurzel-Transformation: TrxR)

Se übte laut zweifaktorieller ANOVA auf die gemessenen Statusparameter einen signifikanten Einfluss ($p < 0,001$) aus. Darüber hinaus wurde die Aktivität der cGPx ($p < 0,001$) und die Se-Konzentration in der Leber ($p = 0,023$) statistisch signifikant durch VE beeinflusst. Interaktionen zwischen Se und VE (Se*VE) ergaben sich für die Parameter pGPx ($p = 0,013$), cGPx ($< 0,001$) und Se in der Leber ($p = 0,009$).

4.6 Differentielle Genexpression in der Leber

In Abbildung 10 sind die Expressionsprofile der Hybridisierung des „Rat Toxicology cDNA-Arrays“ mit den mit P^{32} markierten cDNA aus den Lebern der Versuchstiere dargestellt. Gezeigt sind die Expressionsmuster der Tiere im Doppelmangel (A), im Selen-Mangel (B), im VE-Mangel (C) sowie die der Kontrolltiere (D). Der eingezeichnete Rahmen G umschließt die Membranpositionen, auf denen sich keine cDNA befanden (G1, G8, G15) sowie die Negativ-Kontrollen M13 mp 18(+) DNA (G2, G9, G16), Lambda DNA (G3, G19, G17) und pUC18 DNA (G4, G11, G18). An diesen Punkten trat kein Hybridisierungssignal auf, so dass eine hohe Spezifität der Hybridisierung angenommen wurde. Die Expressionsmuster der zur Aufrechterhaltung der basalen Zellfunktionen benötigten Gene (sog. „Housekeeping-Gene“) sind in den Koordinaten G5-7, G12-14 und G19-20 zu sehen. Die Auswertung der P^{32} -Intensitäten erbrachte für diese Gene keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

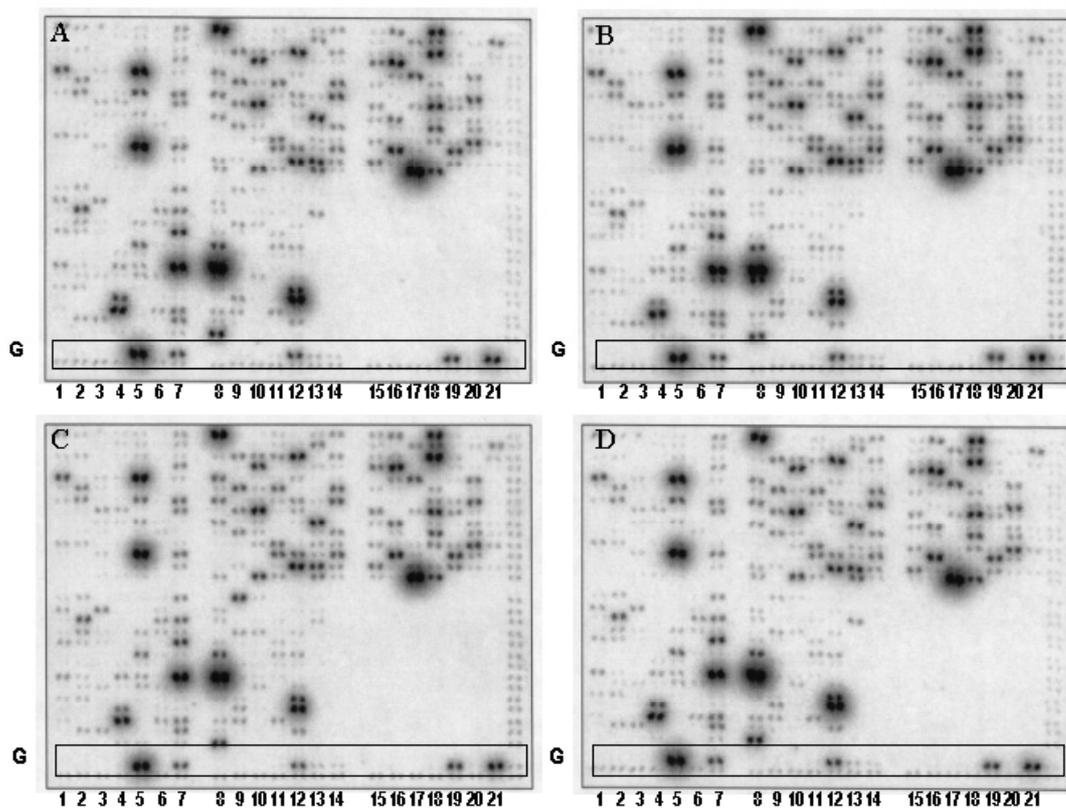


Abbildung 10: Genexpressionsmuster von Ratten im Selen- und Vitamin E-Mangel (A), Selen-Mangel (B), Vitamin E-Mangel (C) und von Kontrolltieren (D)

Im Doppelmangel zeigten 22 Gene verglichen mit der Kontrollgruppe ein differentielles Expressionsverhalten. Der alleinige Se-Mangel in Gruppe II führte zu einer differentiellen Expression von neun Genen, wohingegen im alleinigen VE-Mangel keines der untersuchten Gene eine mindestens zweifache Änderung der Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwies.

Ein Se-Mangel führte zu einer Induktion von Genen, welche am Xenobiotica-Metabolismus der Leber beteiligt sind (Cytochrom P450, DT-Diaphorase, UDP-Glucuronosyltransferase, Bilirubin-UDP-Glucuronosyltransferase) (Tabelle 14). Die Transkriptionsrate der cGPx als Se-abhängiges Enzym wurde um das 13,9-fache im Se-Mangel im Vergleich zur Kontrolle herunterreguliert. Das Gen der ALOX12, welche an einem Gleichgewicht der intrazellulären Hydroperoxid-Konzentration beteiligt ist, wurde um das 2,4-fache hochreguliert. Darüber hinaus wurden durch Se-Mangel die Transkriptionsraten des Histon 2A-Gens (2,1-fach) herunterreguliert und das Gen des zellulären Retinsäure-bindenden Proteins 2 (4,8-fach) sowie des TIMP1 (4,3-fach) hochreguliert.

Tabelle 14: Darstellung der im Selen-Mangel differentiell exprimierten Gene in der Leber

GenBank Accession	Δ -Se / Kontrolle (fache Änderung)	Gen	Funktion	
X12367	↓	13,9	cGPx	Entgiftung von Peroxiden
M13406	↓	2,1	Histon 2A	Transkriptionskontrolle
M29853	↑	2,3*	Cytochrom P450 4B1	Xenobiotica-Metabolismus
J02608	↑	12,3*	DT-Diaphorase	Xenobiotica-Metabolismus
M13506	↑	3,0	UDP-Glucuronosyltransferase 1	Xenobiotica-Metabolismus
U75903	↑	2,1	Bilirubin-UDP-Glucuronosyltransferase Isozym 2	Xenobiotica-Metabolismus
L06040	↑	2,4	Arachidonat 12-Lipoxygenase (ALOX12)	Gleichgewicht der intrazellulären Hydroperoxid-Konzentration
U23407	↑	4,8*	zelluläres Retinsäure-bindendes Protein 2	Extrazelluläres Kommunikations-Protein
L31883	↑	4,3*	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 Precursor (TIMP1)	Protease-Inhibitor

* Gensignal in Höhe des Hindergrunds bei einem Array

In Tabelle 15 sind die im kombinierten Se- und VE-Mangel in der Leber differentiell exprimierten Gene dargestellt. Sie lassen sich grob in die Kategorien Apoptose/Zellcyclus und antioxidativer Schutz/Stressantwort/Inflammation einteilen. Insgesamt war die Situation im Doppelmangel gekennzeichnet von einer Repression anti-apoptotischer Gene (DAD1, Inhibitor of Apoptosis Protein, Bcl2-L1, CAIII), welche einen Schutz gegen Apoptose bieten, während pro-apoptotische Gene (Early Growth Response Protein 1) hochreguliert wurden. Weiterhin wurden einige für die Faltung von Proteinen wichtige Gene wie CCT und HIP sowie am Zellcyclus beteiligte Gene (NPM, CycD1) differentiell exprimiert.

Der deutlichste Unterschied zwischen Doppelmangel und Kontrolle fand sich in der Expression der cGPx. Hier konnte eine Repression um das 18,8-fache in Gruppe I verzeichnet werden. Ebenso führte der Doppelmangel zu verminderten m-RNA-Spiegeln der γ -GCS, 11-beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase und cMOAT. Ebenso wie im alleinigen Se-Mangel zeigte sich eine erhöhte Ableserate des DT-Diaporase-Gens sowie einiger Akute-Phase-Proteine (Serin Protease Inhibitor 3, Alpha-1 Acid Glycoprotein, Fibrinogen Gamma Chain, Metallothionein 1).

Eine signifikante Veränderung der Expression von Genen, deren Genprodukte an der DNA-Reparatur beteiligt sind, konnte sowohl im Einzel- als auch im Doppelmangel nicht festgestellt werden.

Tabelle 15: Darstellung der im Selen- und Vitamin E-Mangel differentiell exprimierten Gene in der Leber

GenBank Accession	Δ -Se -VE / Kontrolle (fache Änderung)	Gen	Funktion	
<u>Apoptose / Zellcyclus:</u>				
Y13336	↓	2,0	Defender against Cell Death 1 Protein (DAD1)	Schutz gegen Apoptose
AF081503	↓	2,6	Inhibitor of Apoptosis Protein 1	Schutz gegen Apoptose
U72350	↓	3,2	Bcl2-L1	Schutz gegen Apoptose
M22413	↓	2,0	Carboanhydrase III (CAIII)	Antioxidanz, Schutz gegen Apoptose
D90345	↓	2,2	T-Complex Protein 1 (CCT) Alpha Untereinheit	Chaperon, Faltung von Proteinen
X82021	↓	2,2	HSC70-Interacting Protein (HIP)	Stabilisation des Chaperons HSC70
J03969	↓	2,9	Nucleophosmin (NPM)	Stimulation des normalen Zellwachstums
D14014	↓	3,1	G1/S-spezifisches Cyclin D1 (CycD1)	Initiation des Zellcycluses, Oncogen
J04154	↑	2,1	Early Growth Response Protein 1	Suppression von Wachstum und Induktion von Apoptose
U77129	↑	2,0*	SPS1/Ste20 Homolog KHS1	Weitergabe von Signalen im MAP-Kinase-Weg
<u>Antioxidativer Schutz / Stressantwort / Inflammation:</u>				
X12367	↓	18,8	cGPx	Entgiftung von Peroxiden
J05181	↓	3,4	γ -Glutamylcysteinsynthetase (γ -GCS)	Glutathionsynthese
U22424	↓	2,2	11-beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2	Umwandlung von Corticosteron zu 11-Dehydrocorticosteron
L49379	↓	2,3	Multispezifischer organischer Anionentransporter (cMOAT)	Entgiftung, Export von Glutathion-Konjugaten
M84719	↓	2,3	Hepatische Flavin-enthaltende Monooxygenase 1 (FMO1)	Entgiftung
PO4800	↓	2,5	Cytochrom P450 3A1	Xenobiotica-Metabolismus
D50568	↓	2,1*	Proteoglycan	Entzündungsmediator
J02608	↑	15,3*	DT-Diaphorase	Xenobiotica-Metabolismus
D00753	↑	2,1	Serin Protease Inhibitor (SPI-3)	Akute-Phase-Protein
J00696	↑	2,3	Alpha-1 Acid Glycoprotein	Akute-Phase-Protein
J00734	↑	2,3	Fibrinogen Gamma Chain	Akute-Phase-Protein
S65838	↑	3,6	Metallothionein 1 (MT 1)	Akute-Phase-Protein, Antioxidanz

* Gensignal in Höhe des Hindergrunds bei einem Array

4.7 Hämoglobin-Konzentration und Hämatokrit-Wert im Vollblut

In Tabelle 16 sind die Hb-Konzentrationen sowie der Hk-Wert im Vollblut der Ratten nach sieben Wochen auf einer Se- und/oder VE-armen Diät dargestellt. Durch den erzeugten Se- bzw. VE-Mangel lagen die Hb-Konzentrationen im Doppelmangel mit 13,3 g/dL signifikant niedriger verglichen mit den Gruppen II-IV. Der Hk-Wert zeigte von Gruppe I bis zur Gruppe IV eine steigende Tendenz. Als signifikant konnte der Wert in der Doppelmangelgruppe gegenüber der Kontrollgruppe abgesichert werden. Sowohl Se als auch VE zeigten bei beiden Parametern signifikante Effekte (zweifaktorielle ANOVA), während signifikante Interaktionen zwischen Se*VE nur beim Hämoglobin auftraten.

Tabelle 16: Hämoglobin-Konzentration und Hämatokrit-Wert im Vollblut nach 49-tägiger Versuchsdauer

Gruppe		Hämoglobin (g/dL)	Hämatokrit (%)
I	M	13,3 ^a	45,5 ^a
(-Se -VE)	SD	0,38	1,61
II	M	14,4 ^b	47,4 ^{ab}
(-Se +VE)	SD	0,27	0,97
III	M	14,6 ^b	47,3 ^{ab}
(+Se -VE)	SD	0,89	2,59
IV	M	14,9 ^b	48,6 ^b
(+Se +VE)	SD	0,59	2,10
zweifaktorielle ANOVA			
Se		<0,001	0,041
VE		0,003	0,023
Se*VE		0,037	0,685

Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte (GAMES-HOWELL, $p < 0,05$)

4.8 Glutathionmetabolismus und Vitamin C-Konzentration in der Leber

In der Leber zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den GSH-Konzentrationen in den Se- und/oder VE-Mangelgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tabelle 17). Die

GSSG-Konzentrationen lagen mit $4,05 \mu\text{mol/g FM}$ in der Gruppe I am niedrigsten und damit signifikant unterschiedlich zu den Gruppen II-IV. Die höchste GSSG-Konzentration wurde in der Gruppe IV mit $46,1 \mu\text{mol/g FM}$ bestimmt. Aus diesen Messwerten ergab sich ein rechnerisch ermitteltes Verhältnis von GSH zu GSSG von 727 in Gruppe I, 432 in Gruppe II, 251 in Gruppe III und 117 in Gruppe IV. Dabei unterschieden sich die Se-Mangelgruppen signifikant von den Se-supplementierten Gruppen. Für die Parameter GSSG und GSH/GSSG ermittelte die zweifaktorielle ANOVA signifikante Einflüsse von Se ($<0,001$) und von VE ($<0,001$ bzw. $0,001$).

Die Aktivität der GR betrug in den Se-Mangelgruppen I und II $49,4 \text{ mU/mg Protein}$ bzw. $50,8 \text{ mU/mg Protein}$ und lag somit um ca. 23 % höher als in den Gruppen III ($41,3 \text{ mU/mg Protein}$) und IV ($40,3 \text{ mU/mg Protein}$). Dies wurde im Mittelwertvergleich als statistisch signifikant abgesichert. Mittels zweifaktorieller ANOVA konnte der Einfluss von Se ($p < 0,001$) bestätigt werden.

Ebenso zeigte die GST im Se-Mangel eine Aktivitätssteigerung. Die Gruppen I ($209 \text{ mU/mg Protein}$) und II ($226 \text{ mU/mg Protein}$) lagen signifikant höher verglichen mit der Kontrollgruppe IV ($162 \text{ mU/mg Protein}$). Die mit $141 \text{ mU/mg Protein}$ signifikant niedrigste Aktivität zeigte sich in der VE-supplementierten Gruppe III. Für diesen Parameter ergab die zweifaktorielle ANOVA sowohl für Se als auch für VE einen signifikanten Effekt von $p < 0,001$. Interaktionen konnten hingegen nicht festgestellt werden.

Der Mangel an VE und/oder Se führte zu einer Depletion an Ascorbinsäure in der Leber, welche sich im Doppelmangel mit einer ca. 30 %igen Reduktion als signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erwies. Se als Einflussgröße wurde mit $p = 0,021$ als signifikant abgesichert, während VE und Se*VE als nicht signifikant eingestuft wurden.

Tabelle 17: Glutathion- und Vitamin C-Konzentrationen sowie Aktivitäten der Glutathionreduktase und der Glutathion-S-Transferase in der Leber

Gruppe		GSH ($\mu\text{mol/g FM}$)	GSSG ($\mu\text{mol/g FM}$)	GSH / GSSG	GR (mU/mg Protein)	GST (mU/mg Protein)	Ascorbat ($\mu\text{mol/g FM}$)
I	M	2774	4,05 ^a	727 ^b	49,4 ^b	209 ^c	105 ^a
	(-Se -VE) SD	1306	1,22	338	3,15	17,0	15,8
II	M	2796	6,73 ^b	432 ^b	50,8 ^b	226 ^c	126 ^{ab}
	(-Se +VE) SD	895	1,76	159	4,46	16,8	26,8
III	M	2677	11,3 ^c	251 ^a	41,3 ^a	141 ^a	133 ^{ab}
	(+Se -VE) SD	527	3,21	57,2	3,78	10,8	25,5
IV	M	3046	46,1 ^c	117 ^a	40,3 ^a	162 ^b	147 ^b
	(+Se +VE) SD	792	33,5	98,3	2,64	8,17	13,8
zweifaktorielle ANOVA							
Se		0,682	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,021
VE		0,536	<0,001	0,001	0,873	<0,001	0,082
Se*VE		0,579	0,199	0,275	0,347	0,671	0,705

Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte (GSH, GR, GST, Ascorbat: TUKEY-HSD; GSSG, GSH/GSSG: GAMES-HOWELL, $p < 0,05$; ln-Transformation: GSSG, GSH/GSSG)

4.9 DNA-Schäden in der Leber

Das Vorhandensein von Einfach- und Doppelstrangbrüchen in der DNA wurde in der Leber mit Hilfe des Comet Assays überprüft. Dabei wurden die Parameter „% DNA im Schweif“ und „Tailmoment“ herangezogen. Im Doppelmangel lag die aus der Zelle migrierte DNA um 15 % höher im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tabelle 18). Allerdings zeigten sich unter den gegebenen Versuchsbedingungen bei großen Intragruppenvarianzen keinerlei signifikante Unterschiede. Ein ähnliches Bild wurde mit dem Parameter „Tailmoment“ ermittelt, welcher bei hoher Streuung innerhalb der Gruppen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen aufzeigte.

Tabelle 18: DNA-Schädigungen anhand der Parameter „% DNA im Schweiß“ und „Tailmoment“ in Vitamin E- und/oder Selen-depletierten Leberzellen

Gruppe		% DNA im Schweiß	Tailmoment
I (-Se -VE)	M	3,93	0,427
	SD	1,04	0,260
II (-Se +VE)	M	3,33	0,321
	SD	1,36	0,239
III (+Se -VE)	M	4,11	0,319
	SD	1,27	0,224
IV (+Se +VE)	M	3,41	0,476
	SD	1,27	0,356
zweifaktorielle ANOVA			
Se		0,765	0,817
VE		0,148	0,804
Se*VE		0,911	0,205

4.10 Lipid- und Proteinschädigungen sowie Parameter einer Inflammation

Die Bestimmung der TBA-RS in der Leber als Maß für die Lipidschädigung ergab für die VE-Mangelgruppen I (82,6 nmol/g FM) und III (87,4 nmol/g FM) signifikant höhere Werte als in den supplementierten Gruppen mit 6,56 nmol/g FM bzw. 7,85 nmol/g FM (Tabelle 19). VE hatte auch nach der zweifaktoriellen ANOVA einen signifikanten Effekt auf diesen Parameter ($p < 0,001$). Der Effekt des Se fiel schwächer aus, konnte aber auch als statistisch signifikant ($p = 0,009$) abgesichert werden, wobei jedoch eine Se-Supplementation nicht zu einer Verringerung der TBA-RS-Konzentration führte. Der mit 6,56 nmol/g FM signifikant niedrigste Wert zeigte sich in der VE-supplementierten Gruppe II, während die Kontrollgruppe bei 7,85 nmol/g FM lag. Die Aktivität der γ -Glutaminsynthetase (γ -GS) war in Gruppe I signifikant gegenüber den Gruppen II-IV erhöht. Se ($p = 0,003$) und VE ($p < 0,001$) zeigten anhand der zweifaktoriellen ANOVA einen signifikanten Einfluss.

Der MT-Gehalt in der Leber erhöhte sich im Doppelmangel um den Faktor 4 gegenüber der Kontrollgruppe und lag damit signifikant höher verglichen mit den MT-

Konzentrationen in den Gruppen II-IV. Die zweifaktorielle ANOVA ergab signifikante Effekte für Se ($p < 0,001$), VE ($p = 0,006$) sowie Interaktionen zwischen Se und VE ($p = 0,002$).

Die Aktivität der LDH im Plasma wurde im Mittelwertvergleich der einzelnen Gruppen nicht signifikant beeinflusst. Dennoch zeigte sich ein tendenzieller Anstieg in der Aktivität von der Kontrollgruppe bis hin zur Doppelmangelgruppe. Mit der zweifaktoriellen ANOVA wurde ein signifikanter Einfluss des Se ($p = 0,011$) ermittelt.

Tabelle 19: Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen und Metallothionein-Konzentrationen sowie Aktivitäten der γ -Glutaminsynthetase in der Leber und Lactatdehydrogenase im Plasma

Gruppe		TBA-RS Leber (nmol/g FM)	γ -GS Leber (U/mg Protein)	MT Leber (ng/mg Protein)	LDH Plasma (mU/mL)
I (-Se -VE)	M	82,6 ^c	17,5 ^b	97,7 ^b	480
	SD	16,3	2,67	52,0	103
II (-Se +VE)	M	6,56 ^a	12,7 ^a	35,6 ^a	470
	SD	0,84	2,41	16,6	90,1
III (+Se -VE)	M	87,4 ^c	13,8 ^a	19,9 ^a	418
	SD	6,64	2,41	4,40	47,9
IV (+Se +VE)	M	7,85 ^b	11,0 ^a	22,9 ^a	385
	SD	1,10	2,70	10,2	49,2
zweifaktorielle ANOVA					
Se		0,009	0,003	<0,001	0,011
VE		<0,001	<0,001	0,006	0,430
Se*VE		0,257	0,328	0,002	0,673

Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte (TUKEY-HSD, $p < 0,05$; ln-Transformation: TBA-RS, MT)

5 Diskussion

5.1 Einfluss eines Selen- und/oder Vitamin E-Mangels auf Futteraufnahme, Lebendmasseentwicklung und Futterverwertung

Bei den Se- und VE-depletierten männlichen Ratten (Gruppe I) wurde ab der 6. Woche eine Depression der Futteraufnahme festgestellt, welche bis zum Versuchsende nach sieben Wochen weiter bestehen blieb, jedoch nicht als statistisch signifikant abgesichert werden konnte. Darüber hinaus führte der Doppelmangel zu einer Wachstumsdepression (Abbildung. 11), welche sich in der siebten Woche als signifikant unterschiedlich zu den Gruppen II-IV abzeichnete. Neben der Futteraufnahme war auch die Nährstoffverwertung in Gruppe I herabgesetzt, wie aus dem Parameter Futterverwertung (FV) hervorgeht, welcher mit 3,59 g/g signifikant ungünstiger lag als in den Gruppen II (3,30 g/g), III (3,26 g/g) und IV (3,34 g/g). Die VE-Supplementation in den Gruppen II und IV schien tendenziell sowohl Futteraufnahme als auch Lebendmassezunahme und damit die FV zu verbessern.

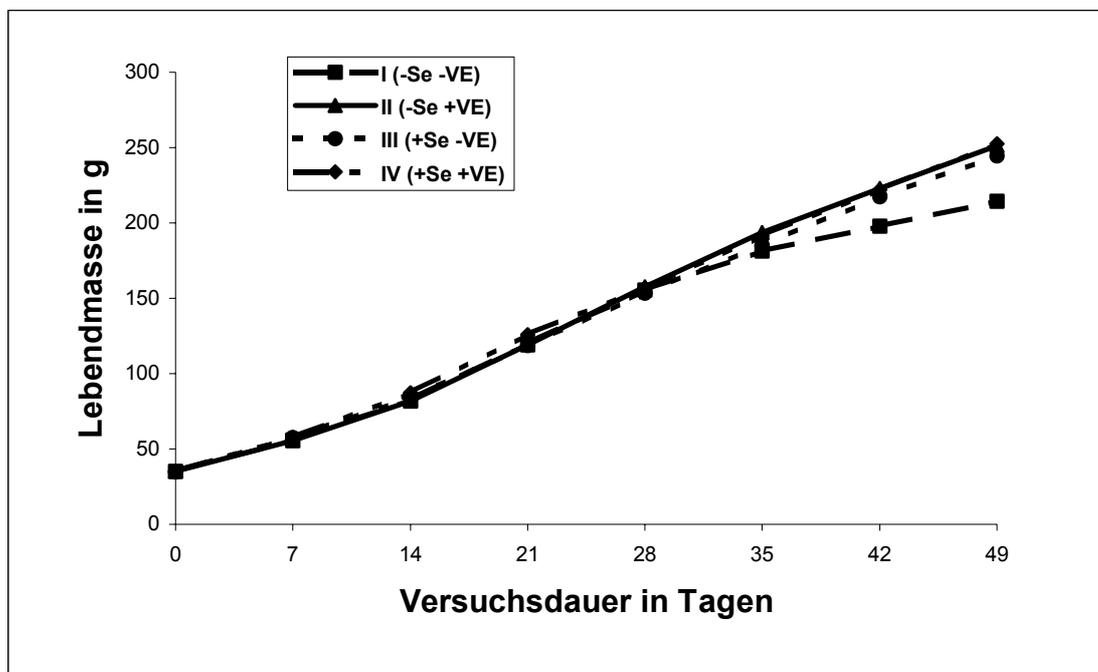


Abbildung 11: Lebendmasseentwicklung wachsender Ratten mit einem Selen- und/oder Vitamin E-Mangel im Vergleich zu Kontrolltieren

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Befunde von TURAN et al. (1999), welche bei Ratten im Se- und VE-Mangel signifikante Wachstumsdepressionen nach 12-14 Wochen feststellten. Diese Tiere lagen mit 177,6 g Körpergewicht im Schnitt um 24 % niedriger, verglichen mit den Kontrolltieren mit 233,6 g Körpergewicht. In einer Studie von HAKKARAINEN et al. (1986) wiesen männliche Ratten nach einer VE-Supplementation (5, 15 oder 45 mg α -Tocopherylactetat/kg Diät) zu einer Se-Mangeldiät nach acht Wochen keine signifikanten Unterschiede in der Lebendmasse auf. In der nicht mit VE supplementierten Doppelmangelgruppe dagegen verringerte sich die Lebendmassezunahme von der dritten Woche an signifikant. Diese Gruppe lag nach acht Wochen mit einem Endgewicht von insgesamt 110 g um die Hälfte niedriger als die restlichen Gruppen. Die Autoren ermittelten mit dieser Studie zum Wachstumserhalt männlicher Ratten im Se-Mangel einen Mindestbedarf von 5 mg α -Tocopherylacetat/kg Diät. Erklärungsansätze für die Wachstumsdepressionen bei Ratten im Doppelmangel gehen aus Untersuchungen von HONG und CHOW (1988) hervor. Die Verabreichung einer Se- und VE-armen Basisdiät an männliche Ratten über neun Wochen führte bei 70 % der Tiere zu einer eosinophilen Enteritis, bei der davon auszugehen ist, dass sie die Nährstoffverwertung reduziert. Durch eine angeschlossene Resupplementation der Diät nach neun Wochen mit 100 mg/kg VE bzw. 1 mg/kg Se konnte die Inzidenz der Enteritis vollständig aufgehoben werden.

In der vorliegenden Studie führte ein alleiniger Se-Mangel in Gruppe II nach sieben Wochen jedoch noch zu keinen signifikanten Wachstumsdepressionen. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen von BAUERSACHS und KIRCHGESSNER (1992) sowie EDER et al. (1995), welche bei männlichen Ratten nach vergleichbarer Versuchsdauer (45 bzw. 40 Tagen) keinen Einfluss eines Se-Mangels auf die Lebendmasseentwicklung feststellen konnten. Im Gegensatz hierzu fanden OLSSON et al. (1993) bei männlichen Ratten mit einem Anfangsgewicht von ca. 50 g nach Verfütterung einer Se-Mangeldiät (9 μ g Se/kg Diät) nach zehn Wochen einen signifikanten Unterschied in der Lebendmasse (318 g) im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 351 g Lebendmasse.

SUNDE et al. (1997) konnten an Ratten, welche von Se-depletierten Müttern abstammten, nach Verfütterung einer Se-Mangeldiät über 28 Tage eine Wachstumsdepression feststellen. Im Gegensatz dazu zeigten entwöhnte, über einen handelsüblichen Lieferanten bezogene Ratten ausreichende Se-Speicher, so dass kein

Effekt eines Se-Mangels auf das Wachstum nach 28 Tagen beobachtet werden konnte. In Repletionsstudien nahmen Se-depletierte männliche Ratten in der zweiten Generation nach intraperitonealer Se-Injektion von 1 bzw. 5 $\mu\text{g Se}/100\text{ g Körpergewicht}$ im Vergleich zu den nicht-behandelten Gruppen um 59 bzw. 81 % an Gewicht zu (THOMPSON et al. 1998). EWAN (1976) führte die in der zweiten Generation auftretenden Wachstumsdepressionen bei Ratten auf eine verminderte Futteraufnahme sowie eine verschlechterte Futtermittelverwertung durch einen erhöhten Glucoseumsatz und Energieverlust über den Urin zurück. Der Autor konnte bei Se-Mangeltieren eine niedrigere Konzentration an Wachstumshormon (GH) im Plasma und in der Hypophyse gegenüber den Kontrolltieren aufzeigen. Untersuchungen über sechs Generationen mit weiblichen Ratten zeigen die Effekte eines Se-Mangels auf die Wachstumsentwicklung mit Hinblick auf Schilddrüsenhormone und die Aktivitäten der Se-abhängigen Dejodinasen (BATES et al. 2000). Jungtiere von Se-defizienten Müttern nahmen in den ersten Lebensmonaten weniger an Lebendmasse zu, einhergehend mit einer geringeren 5'-Dejodinase (5'DI-I)-Aktivität. Die Autoren mutmaßen eine verminderte GH-Transkription und damit Wachstumsdepression als Antwort auf den Se-bedingten Abfall der 5'DI-I-Aktivität.

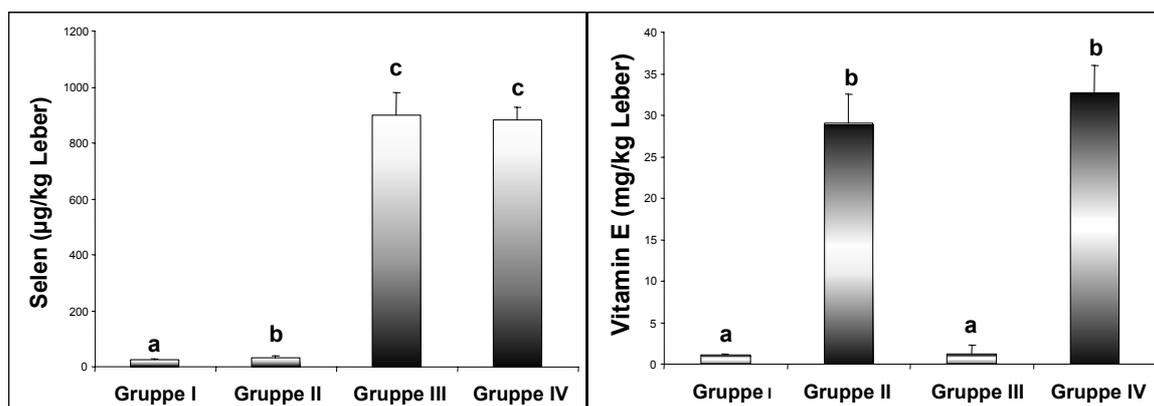
Demnach ist Se für ein ausreichendes Wachstum bei der Ratte notwendig, bei handelsüblichen Ratten jedoch scheinen die vorhandenen Gewebespeicher relativ lange vor einem verminderten Wachstum zu schützen.

5.2 Einfluss eines Selen- und/oder Vitamin E-Mangels auf Selen- und Vitamin E-Konzentrationen in Plasma und Leber

Der VE-Mangel wurde anhand der α -Tocopherol-Konzentrationen in Plasma und Leber verifiziert, welche zu den essentiellen VE-Pools im Organismus zählen (MACHLIN 1984). Zur Demonstration des Se-Mangels wurde die Se-Konzentration in der Leber bestimmt, da diese das Zentralorgan des Se-Stoffwechsels darstellt. Sie dient dem Organismus sowohl als Se-Speicher als auch als Se-Puffer. Des Weiteren werden dort die meisten der bislang bekannten Selenoproteine in hoher Konzentration synthetisiert (DREHER et al.

1997b). Daher erfasst die Messung der Leberselen-Konzentration zum großen Teil das Se der funktionellen Selenoproteine.

In der vorliegenden Studie lag erwartungsgemäß die Leberselen-Konzentration bei den Tieren ohne Se-Zulage (Gruppen I und II) signifikant niedriger als bei den supplementierten Gruppen III und IV (Abbildung 12). Allerdings zeigte auch VE einen Einfluss ($p=0,023$) auf die Se-Konzentration in der Leber, so dass im Doppelmangel der Se-Gehalt mit $26,3 \mu\text{g/kg}$ Leber am niedrigsten lag. Ebenso konnte ein eindeutiger VE-Mangel diagnostiziert werden. Im Plasma sank die VE-Konzentration der Mangel-Gruppen auf 4,73 % und in der Leber auf 3,56 % der supplementierten Gruppen ab. Mittels zweifaktorieller ANOVA ergab sich für Se ein Einfluss auf die VE-Gehalte des Plasmas von $p=0,020$ und der Leber von $p=0,061$.



Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (TUKEY-HSD, $p<0,05$)

Abbildung 12: Selen und Vitamin E-Konzentrationen in der Leber nach 7-wöchigem alimentären Selen- und/oder Vitamin E-Mangel

In zahlreichen Studien wurde der Se-Gehalt der Leber als Statusparameter zur Beschreibung eines Se-Mangels herangezogen (z.B. HONG und CHOW 1988, SUNDE et al. 1997, TURAN et al. 1999). Um den Einfluss der Se-Konzentration in der Diät auf die Se-Konzentration in der Leber zu untersuchen, wurden weibliche wachsende Ratten über 32 Tage entweder mit einer Se-armen Basisdiät oder mit einer Se-supplementierten (20, 50, 100, 150, 200 bzw. $300 \mu\text{g Se/kg}$ als Natriumselenit) Diät gefüttert (WEISS et al. 1996). Die Se-Konzentrationen in der Leber der Se-Mangelgruppe lagen bei 4 % verglichen mit der mit $100 \mu\text{g Se/kg}$ Diät supplementierten Gruppe. Die Supplementation

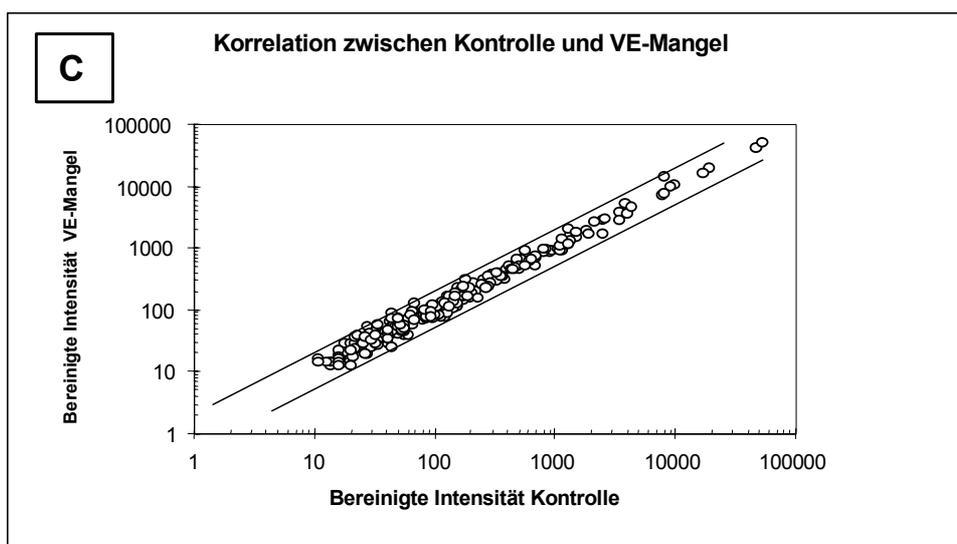
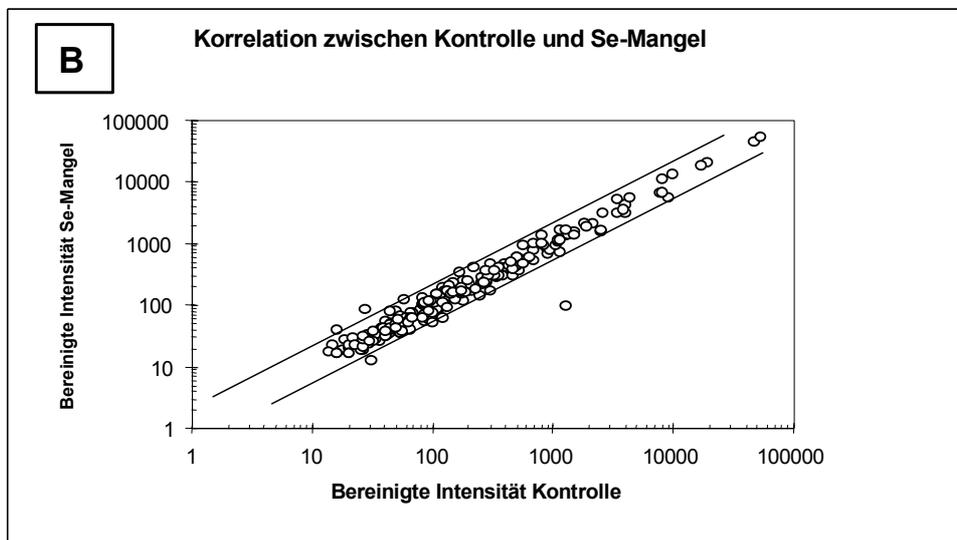
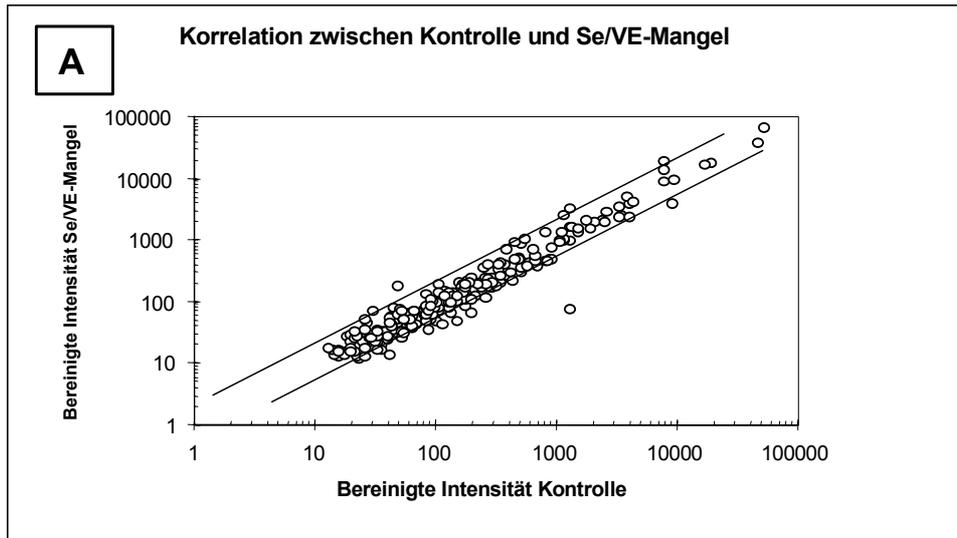
mit 200 μg Se/kg Diät führte zu keinem weiteren Anstieg in der Se-Konzentration der Leber, während die Tiere mit 300 μg Se/kg Diät um 16 % über den Tieren mit 100 μg Se/kg Diät lagen. Diese Ergebnisse belegen den sigmoidalen Anstieg der Se-Gehalte in der Leber in Abhängigkeit gestaffelter Se-Zulagen der Diät. Bei Untersuchungen von BAUERSACHS und KIRCHGESSNER (1992) zur Se-Konzentration im Serum und in der Leber bei unterschiedlicher Se- und VE-Versorgung wurde eine Depletionsdiät von 40 μg Se und 8 mg VE/kg Trockenmasse an männliche Ratten verabreicht. Die Zulagen je kg Diät betragen 0, 200 bzw. 1000 μg Se und 0, 30 bzw. 200 mg VE. Mit zunehmenden Se-Konzentrationen in der Diät war ein Anstieg der Se-Spiegel in Serum und Leber zu verzeichnen. Bei einer Zulage von 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ zur Basisdiät lagerte die Leber die 10-fache Menge an Se verglichen mit der nicht-supplementierten Gruppe ein. Eine Mangelversorgung an VE erniedrigte den Serumselen-Spiegel, der, gemittelt über alle Selenstufen, um 6 % und damit signifikant unterhalb des Kontrollniveaus lag. Bei bedarfsgerechter (30 mg/kg Diät) bzw. überhöhter (200 mg/kg Diät) Versorgung an VE veränderte sich die Se-Konzentration der Leber nicht, bei kombiniertem Mangel war jedoch ein deutlich erniedrigter Wert zu beobachten. Aus diesen Befunden leiten die Autoren eine Interaktion zwischen VE und Se ab, wie durch die eigenen Ergebnisse bestätigt werden konnte. PAZAK und SCHOLZ (1996), welche bei Ratten höhere Se-Spiegel im Blut aufgrund einer VE-Supplementation messen konnten, führten diesen Effekt auf eine erhöhte Bioverfügbarkeit des Se durch die VE-Gabe zurück. LI et al. (2001) untersuchten den Effekt einer Se-Supplementation auf die α -Tocopherol-Spiegel an kultivierten Hepatocyten. Dabei zeigte sich, dass eine durch erhöhten oxidativen Stress (Ferricyanid- bzw. DABS-Zugabe) bedingte Abnahme der α -Tocopherol-Konzentration durch Se-Gaben verhindert werden konnte. Umgekehrt zeigten BUTTRISS und DIPLOCK (1988), dass ein alimentärer Se-Mangel bei Ratten den α -Tocopherol-Gehalt in Organellen (Mitochondrien, Lysosomen, Microsomen) der Leber signifikant erhöht. Es wäre denkbar, dass der Wegfall der Aktivität der GPx im Se-Mangel zu einer verstärkten Einlagerung des VE in die Membranen der Organellen geführt hat.

5.3 Einfluss eines Se- und/oder VE-Mangels auf die differentielle Genexpression in der Leber

Mittels cDNA-Array (Atlas Rat Toxicology Array II) wurde die differentielle Genexpression in der Leber bestimmt. Insgesamt wurden von den 465 auf dem cDNA-Array enthaltenen Genen mehr als 50 % in der Leber exprimiert und somit als Signale erkannt. In Abbildung 13 sind die Gene der Gruppe IV (Kontrolle) korreliert mit den entsprechenden Genen der Gruppen I (A), II (B) und III (C). Eine mindestens zweifache Änderung der bereinigten Intensitäten eines Genes in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde als signifikant betrachtet. Die in die Abbildungen eingezeichneten Linien repräsentieren diese zweifach-Änderung. Alle Punkte, welche sich außerhalb dieser Linien befinden, sind demnach als signifikant zu beurteilen.

5.3.1 Vitamin E-Mangel assoziierte differentielle Genexpression

Die VE-Depletierung bei den Tieren der Gruppe III führte in der Leber unter den gegebenen Versuchsbedingungen bei den untersuchten Genen nicht zu einer mindestens zweifachen und damit signifikanten Änderung der Expression. ARATRI et al. (1999) zeigten in glatten Muskelzellen von Ratten eine 1,6-fache Erhöhung der Expression des α -Tropomyosin-Gens durch Zugabe von 50 μ M α -Tocopherol zum Medium. FECHNER et al. (1998) induzierten bei Ratten nach 5-wöchiger VE-Depletion die Expression des α -Tocopheroltransferprotein-Gens (TTP) durch Gabe von 100 mg α - bzw. δ -Tocopherol/kg Diät. Dies führte zu einer Selektion des α -Isomers in der Leber. Die VE-Depletion dagegen hatte keinen Einfluss auf die Expression des TTP. In der Leber von Mäusen wurde nach 8-wöchiger Supplementation von täglich 40 IU D- α -Tocopherol die Transkription des Collagen α 1-Gens um 70 % reprimiert (CHOJKIER et al. 1998). Dies wurde mit den antioxidativen Eigenschaften des VE begründet.



Linien repräsentieren eine zweifache Änderung der bereinigten Intensitäten zwischen den untersuchten Gruppen

Abbildung 13: Korrelationsanalyse zwischen Kontrolle und den Behandlungsgruppen Doppelmangel (A), Selen-Mangel (B) und Vitamin E-Mangel (C) von 271 bereinigten Intensitäten der exprimierten Gene in der Leber

Darüber hinaus moduliert α -Tocopherol über eine Hemmung der Proteinphosphatase 2A post-transkriptional die Proteinkinase C (BOSCOBOINIK et al. 1991), wodurch Effekte auf transkriptionaler Ebene resultieren können. In humanen Fibroblasten führte α -Tocopherol, vermutlich über die Hemmung der Proteinkinase C, zu einer verminderten Expression des Collagenase-Gens (RICCIARELLI et al. 1999). Bei mittels „Platelet-activating Factor“-stimulierten neutrophilen Granulocyten bzw. mittels Interleukin-1 stimulierten Endothelzellen kam es nach α -Tocopherol-Supplementation zu einer Hemmung der Induktion von Adhäsionsmolekülen (YOSHIKAWA et al. 1998). Ebenso wurde durch α -Tocopherol die LDL-induzierte Produktion von Adhäsionsmolekülen bei Endothelzellen gesenkt, vermutlich aufgrund eines regulatorischen Effekts auf die Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (MARTIN et al. 1997). In Makrophagen und glatten Muskelzellen wird der oxidiertes LDL-aufnehmende Rezeptor CD36 durch α -Tocopherol, nicht jedoch durch β -Tocopherol reprimiert (RICCIARELLI et al. 2000).

Diese zu der vorliegenden Studie differierenden Ergebnisse können auf eine unterschiedliche Expression von Genen in verschiedenen Zielorganen und Zelltypen zurückgeführt werden. Möglicherweise reagieren verglichen mit der Leber andere Gewebe sensitiver auf einen VE-Mangel. Ferner reichte die VE-Zulage von 75 IU/kg Diät eventuell nicht aus, um die *in vitro* beschriebenen Effekte *in vivo* darzustellen. Darüber hinaus enthielt der verwendete Atlas Rat Toxicology Array II nicht die von den Autoren als VE-sensitiv beschriebenen Gene, so dass eine mögliche transkriptionelle Beeinflussung nicht detektiert werden konnte. Es ist davon auszugehen, dass Änderungen in der Genexpression unterhalb des angenommenen Signifikanzniveaus, welche hierbei nicht erfasst wurden, bereits physiologische Konsequenzen für den Organismus haben können. Daher kann an dieser Stelle nicht abschließend beurteilt werden, ob eine Änderung der Genexpression durch einen VE-Mangel in der Leber stattgefunden hat.

5.3.2 Selen-Mangel assoziierte differentielle Genexpression

Als Se-abhängiges Enzym befand sich das Gen der cGPx auf dem verwendeten cDNA-Array. Erwartungsgemäß führte der Se-Mangel bei den Tieren der Gruppe II im Vergleich

zur Kontrollgruppe zu einer signifikanten Abnahme an cGPx-mRNA. Dieses Phänomen ist in der Literatur intensiv behandelt worden. Ein Se-Mangel scheint weniger die Transkription des cGPx-Gens, sondern vor allem die Stabilität der mRNA zu beeinflussen (CHRISTENSEN und BURGNER 1992). Es wird vermutet, dass nach dem Freisetzen der mRNA aus den Polyribosomen im Se-Mangel eine vermehrte Degradation stattfindet, aufgrund eines vorzeitigen Abbruchs der Translation bei Abwesenheit von Selenocystein (BERMANO et al. 1995).

Des Weiteren war der Se-Mangel verbunden mit einem Anstieg der Expression des UDP-Glucuronosyltransferase 1-Gens und des Bilirubin-UDP-Glucuronosyltransferase Isozym 2-Gens. Beide Enzyme erfüllen eine wichtige Entgiftungsfunktion in der Leber, indem Stoffwechselendprodukte bzw. Fremdstoffe wasserlöslich und damit ausscheidbar gemacht werden (MACKENZIE et al. 1996). Cytochrom P450 4B1, welches ebenfalls am Xenobiotica-Metabolismus beteiligt ist und durch Glucocorticoide induziert werden kann (BURGER et al. 1992), wurde in der vorliegenden Studie um das 2,3-fache in der Leber der Se-depletierten Tiere gesteigert. Ebenso führte bei Mäusen ein 60-tägiger Se-Mangel zu einer Induktion verschiedener Enzyme, die an Entgiftungsreaktionen in der Leber beteiligt sind (UDP-Glucuronyltransferase, Cytochrom P-450 Hydroperoxidase, Ethoxycoumarin-O-Ethylase) (REITER und WENDEL 1984). Die Autoren werteten den Anstieg als ein Anzeichen für einen längerfristigen Se-Mangel, da nach 17 Tagen diese Effekte noch nicht auftraten, obwohl sich die cGPx-Aktivität in der Leber bereits auf einem Minimum befand. Darüber hinaus lagen die mRNA-Spiegel der Arachidonat 12-Lipoxygenase (ALOX12) im Se-Mangel signifikant höher im Vergleich zu den Kontrolltieren. SCHNURR et al. (1999) konnten zeigen, dass eine Induktion der ALOX12 durch Interleukine zu einer gleichzeitigen Abnahme der PHGPx-Aktivität in den untersuchten Zelllinien (humanen Lungencarcinomzellen und Monocyten) sowie *in vivo* in Lunge, Leber und Milz von Mäusen führte. Umgekehrt erhöhte eine Hemmung der PHGPx die enzymatische Aktivität der ALOX12 (CHEN et al. 2000). Demnach scheinen ALOX12 und PHGPx Gegenspieler in der Regulation der intrazellulären Hydroperoxid-Konzentration zu sein. Ferner zeigte sich in der Leber der Se-depletierten Tiere eine Induktion des Diaphorase-Gens, während sich die Intensitäten der Kontrolltiere auf der Ebene des Hintergrundes befanden. Die Diaphorase (NADH Ubiquinon Oxidoreduktase) katalysiert die Zwei-Elektronen-Reduktion von oxidierten Quinonen und zählt somit zum

Ubiquinon-abhängigen antioxidativen System. In Übereinstimmung mit den vorliegenden Daten zeigten OLSSON et al. (1993) einen siebenfachen Anstieg der Diaphorase-Aktivität in der Leber von Ratten im Se-Mangel.

Aufgrund der vorliegenden Untersuchung lässt sich schlussfolgern, dass ein Se-Mangel bei Ratten zu einer Induktion von Genen führt, welche für Xenobiotica-metabolisierende Enzyme sowie antioxidativ wirksame Proteine codieren. Diese Induktion könnte eine adaptive Antwort auf den durch den Se-Mangel induzierten Stress darstellen.

Eine kürzlich erschienene Studie belegt die Se-abhängige Änderung der Genexpression im Jejunum von Se-depletierten Mäusen im Vergleich zu den mit 100 μg Se/kg Diät als Selenomethionin supplementierten Kontrolltieren (RAO et al. 2001). Die Anwendung eines GeneChips® von Affymetrix mit 6347 Genen zeigte eine signifikante Veränderung von Genen, welche an DNA-Reparatur, oxidativem Stress, Zellcyclus und Entgiftung beteiligt sind. Ebenso wie in der vorliegenden Studie wurden die Gene für cGPx, ALOX12 und Cytochrom P450 signifikant durch den 90-tägigen alimentären Se-Mangel im Jejunum der Mäuse differentiell exprimiert. Erstaunlicherweise zeigten darüber hinaus die Mäuse eine Veränderung der Expression bei Genen, welche in der vorliegenden Untersuchung erst im kombinierten Se- und VE-Mangel auftraten, z.B. eine veränderte Genexpression des Metallothionein 1 (siehe Kapitel 5.3.3). Möglicherweise treten Effekte eines Se-Mangels im Jejunum von Mäusen deutlicher zum Vorschein als in der Leber von Ratten. Ferner mag die längere Versuchsdauer von 90 Tagen gegenüber der Versuchsdauer von 49 Tagen in der vorliegenden Untersuchung eine Rolle gespielt haben.

5.3.3 Selen- und Vitamin E-Mangel assoziierte differentielle Genexpression

Ein Vergleich der Expressionsprofile in der Leber der Ratten im Doppelmangel (Gruppe I) mit den Kontrolltieren (Gruppe IV) zeigte bei 5 % der untersuchten Gene eine veränderte Expression. Im Folgenden werden die veränderten Gene zu verschiedenen funktionellen Einheiten zusammengefasst und diskutiert.

Apoptose und Zellcyclus

Der Doppelmangel war charakterisiert durch eine signifikante Depression von Genen, welche für Apoptose-hemmende Proteine codieren. Zu diesen Proteinen zählen Defender against Cell Death 1 Protein (NAKASHIMA et al. 1993), Inhibitor of Apoptosis Protein 1 (LISTON et al. 1997) sowie Bcl2-L1, welches maßgeblich an der Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials beteiligt ist (FINKEL 2001). Ferner zeigte sich eine 2,1-fache Induktion des Early Growth Response Protein 1-Gens, dessen Genprodukt als Suppressor von Zellwachstum und Zelltransformation gilt und Apoptose induziert (LIU et al. 1998). In Bezug auf Zellcyclus-abhängige Gene konnte eine Depression des Nucleophosmin-Gens und des G1/S-spezifischen Cyclin D1-Gens in der VE- und Se-depletierten Leber festgestellt werden. Zellwachstum ist assoziiert mit einem Anstieg im Nucleophosmin-Protein, während das G1/S-spezifische Cyclin D1 während der G1 Phase des Zellcyclus synthetisiert wird und die Einleitung von Apoptose zu inhibieren vermag (TAN et al. 2000). HSC70-Interacting Protein, welches das Hitzeschockprotein 70 stabilisiert (HÖHFELD et al. 1995) und die Alpha-Untereinheit des T-Complex Protein 1 (CCT) waren ebenfalls signifikant im Doppelmangel reprimiert. Da beide Proteine zu den Chaperonen zählen und somit die Faltung von Actin, Tubulin und weiteren cytosolischen Proteinen bewirken, sind sie maßgeblich an der zellulären Proteinbiosynthese und dadurch an der Zellproliferation beteiligt (HELMBRECHT und RENSING 1999, KUBOTA et al. 2000). Darüber hinaus konnten KUBOTA et al. (2000) zeigen, dass bei Mäusen die Transkription des Gens der Alpha-Untereinheit von CCT von dem gleichen Transkriptionsfaktor „Staf“ reguliert wird wie das Gen für die Selenocystein tRNA (tRNA^{SEC}). Allerdings liegen bislang keine Informationen darüber vor, ob Se die Bildung von Staf beeinflussen und damit indirekt Einfluss auf die Transkription von CCT nehmen kann.

Diese Ergebnisse zeigen auf genomischer Ebene die Induktion von Apoptose bzw. den hemmenden Effekt des Se- und VE-Mangels auf das Wachstum von Zellen. Es ist wahrscheinlich, dass eine erhöhte Bildung von Hydroperoxiden im kombinierten Se- und VE-Mangel in der vorliegenden Studie zu einer Initiierung von Apoptose geführt hat. Die Repression des Gens der Carboanhydrase III unterstützt diese Befunde, da kürzlich gezeigt werden konnte, dass Carboanhydrase III als Antioxidanz vor H₂O₂-induzierter

Apoptose schützt (RAISANEN et al. 1999). In Studien konnte darüber hinaus belegt werden, dass gesteigerte GPx-Aktivitäten *in vitro* (KAYANOKI et al. 1996) bzw. die Überexpression der cGPx (PACKHAM et al. 1996) Apoptose zu inhibieren vermögen. Es wurden jedoch keine weiteren Apoptose-Marker angewendet, so dass an dieser Stelle abschließend nicht beurteilt werden kann, ob tatsächlich apoptotische Zellen in der Leber auftraten. Da Bcl2-L1 ebenso bei nekrotischen Zellen in der Ätiologie des Zusammenbruchs des mitochondrialen Membranpotentials eine Rolle spielt und, wie im Folgenden erläutert, es zu inflammatorischen Prozessen kam, wäre ein gleichzeitiges Vorhandensein von apoptotischen und nekrotischen Prozessen im Doppelmangel denkbar.

Antioxidativer Schutz / Stressantwort / Inflammation

Eine weitere Destabilisierung bzw. verminderte Synthese der mRNA der cGPx konnte im kombinierten Se- und VE-Mangel (18,8-fach) verglichen mit dem alleinigen Se-Mangel (13,9-fach) festgestellt werden. Ebenso ermittelten MÜLLER und PALLAUF (2002) in der Leber von Se-depletierten Kaninchen höhere mRNA-Spiegel der cGPx verglichen mit den Tieren im Doppelmangel. LI et al. (1996) belegten eine dosisabhängige aber Se-unabhängige Erhöhung der cGPx-Aktivität durch α -Tocopherol in humanen Cardiomyocyten. Dieser Anstieg war assoziiert mit erhöhten mRNA-Spiegeln, allerdings nicht mit einer vermehrten Transkription des cGPx-Gens. Daher vermuten die Autoren, dass die erhöhten mRNA-Spiegel auf eine Stabilisierung der mRNA durch α -Tocopherol zurückzuführen sind, eventuell über eine direkte Interaktion eines α -Tocopherol-bindenden Proteins mit der cGPx-mRNA.

Der kombinierte Se- und VE-Mangel resultierte in einer dreifachen Abnahme der Expression des Gens der katalytischen Untereinheit der γ -Glutamylcysteinsynthetase (γ -GCS). Dieses Enzym katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der *de novo* Synthese von GSH aus den einzelnen Aminosäuren. Ein Anstieg der GSH-Spiegel sowie der Aktivität der γ -GCS wurde bei Ratten in Abhängigkeit von steigenden Se-Zulagen (50, 100, 500, 2000, 4000 μ g Se/kg Diät) beschrieben (LIU et al. 1994). Es kann daher angenommen werden, dass Se eine Rolle in der Homeostase von Glutathion in der Leber

spielt. Allerdings scheint die Transkription des γ -GCS-Gens von verschiedenen Faktoren kontrolliert zu werden. *In vitro* Studien belegten eine Induktion der γ -GCS durch Cytokine (URATA et al. 1996) und Xenobiotika (CAI et al. 1997). BUETLER (1998) dagegen berichtete von einer Abnahme der γ -GCS mRNA und GSH-Spiegel in der Leber von Ratten, welche einem durch Lipopolysaccharid induzierten oxidativen Stress ausgesetzt waren. Des Weiteren wurden die mRNA-Spiegel des Metallothionein 1, welches als Akute-Phase-Protein mit antioxidativen Eigenschaften gilt (SATO und BREMNER 1993), im Doppelmangel signifikant (3,6-fach) erhöht. Es zeigte sich, wie bereits im alleinigen Se-Mangel, eine Induktion des DT-Diaphorase-Gens, während in der Kontrollgruppe die Signalintensitäten auf Höhe des Hintergrundes lagen. Die Induktion der Gene dieser beiden Proteine könnte eine Adaptation zu dem durch Se- und VE-Mangel induzierten oxidativen Stress darstellen. In Übereinstimmung mit den vorliegenden Daten zeigten NAVARRO et al. (1998) einen dramatischen Anstieg der DT-Diaphorase-Aktivität in der Leber von Se- und VE-depletierten Ratten.

In Bezug auf inflammatorische Prozesse war der Doppelmangel charakterisiert durch eine Induktion von weiteren Akute-Phase-Proteinen (Serin Protease Inhibitor 3, Alpha-1 Acid Glycoprotein, Fibrinogen Gamma Chain). Interessanterweise wird die Transkription des Serin Protease Inhibitor 3 (SPI-3) codierenden Gens während einer Inflammation vorübergehend induziert, wohingegen die Gene für SPI-1 und SPI-2, welche die hauptsächlichen Formen bei der Ratte darstellen, in dieser Situation reprimiert werden (PAGES et al. 1990). Die Induktion von pro-inflammatorischen Genen wurde begleitet von einer gleichzeitigen Suppression des anti-inflammatorischen Enzyms 11-beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2, welches bei der Ratte Glucocorticoide (Cortisol, Corticosteron) in die inaktive 11-Dehydroform umwandelt (RAJAN et al. 1995). Dadurch wird die Bindung der Glucocorticoide an die entsprechenden Rezeptoren kontrolliert. Ein weiterer Effekt von Inflammation ist die Repression hepatischer Transporterproteine durch Cytokine. Dazu zählt der kanalikuläre multispezifische organische Anionenexporter (cMOAT), welcher Glutathion-Konjugate und Leukotrien C4 transportiert und von Interleukin-1 auf Transkriptionsebene reprimiert wird (SUZUKI und SUGIYAMA 1998, DENSON et al. 2000). In der vorliegenden Studie wurde cMOAT um das 2,3-fache reprimiert, so dass insgesamt auf Ebene der Genexpression im Doppelmangel von einer inflammatorischen Situation ausgegangen werden kann.

5.4 Einfluss eines Selen- und/oder Vitamin E-Mangels auf die Aktivität verschiedener Selenoenzyme und der Selen-unabhängigen Glutathionperoxidase

Zur Charakterisierung des Se-Mangels sollte zusätzlich zu der Bestimmung der Se-Akkumulation in der Leber die Erfassung von funktionellen biochemischen Parametern (Aktivität der Selenoenzyme) erfolgen. Darüber hinaus diente die Messung der Aktivität der cGPx als Verifizierung der gemessenen mRNA-Spiegel mittels cDNA-Array auf Proteinebene.

In der vorliegenden Studie wurden die Aktivitäten der Selenoenzyme pGPx, cGPx und TrxR erfasst. Der Se-Einfluss war bei allen drei Parametern zu erkennen ($p < 0,001$). Die cGPx in der Leber reagierte unter den vorliegenden Versuchsbedingungen am deutlichsten auf den Se-Mangel, und die Aktivität spiegelte die mittels cDNA-Array gemessene mRNA-Konzentration wider. Im Doppelmangel fiel die Aktivität auf ca. 3 % verglichen mit der Kontrollgruppe ab, während die Aktivität der pGPx in den Gruppen I und II bei ca. 44 % der Se-supplementierten Gruppen lag. Die TrxR zeigte im Se-Mangel einen Aktivitätsverlust von 87 %. Ein signifikanter Einfluss des VE auf die Aktivitäten der Selenoenzyme konnte lediglich für die cGPx mit $p < 0,001$ abgesichert werden.

Die cGPx in der Leber wird als ein kurzfristiger Se-Statusparameter angesehen, während die cGPx in den Erythrocyten, aufgrund deren relativ langer Lebensdauer von 100 Tagen, zu den langfristigen Statusparametern zählt (BEHNE et al. 1996a). Mit steigender Se-Aufnahme steigt die Aktivität der cGPx bis zum Erreichen eines Plateaus und damit zur maximalen Enzymaktivität an (NEVE 1991). Bei weiblichen (WEISS et al. 1996) und männlichen Ratten (LEI et al. 1995) wurden bei einer Zulage von 100 μg Se/kg Diät maximale cGPx-Aktivitäten und Se-Konzentrationen in der Leber erlangt. Die cGPx-Aktivität in den Erythrocyten dagegen stieg bei Se-Supplementationen über 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Diät weiter an, während die pGPx bereits bei 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Diät ein Plateau erreichte. Da die pGPx in der Niere synthetisiert wird und ein von der cGPx unterschiedliches Genprodukt darstellt (YOSHIMURA et al. 1991), wird für die pGPx eine von der cGPx unterschiedliche Se-Regulation vermutet.

Zur Charakterisierung des Se-Mangels wird darüber hinaus die Aktivität der Se-unabhängigen Peroxidase herangezogen, welche aus verschiedenen Isoformen der Glutathion-S-Transferasen (GST) besteht und im Se-Mangel induziert wird (LAWRENCE

und BURK 1976, TAPPEL et al. 1982, GROMADZINSKA et al. 1988). In der vorliegenden Studie erfolgte eine Steigerung der GST-Aktivität in Abhängigkeit des Se-Mangels ($p < 0,001$) um 44 % in den Gruppen I und II, verglichen mit den Gruppen III und IV. Der VE-Mangel dagegen verminderte die Aktivität der GST signifikant ($p < 0,001$). Allerdings schienen diese Effekte unabhängig voneinander abzulaufen, da sich keine signifikanten Interaktionen zwischen Se und VE ($p = 0,671$) ergaben.

Anhand verschiedener biochemischer Parameter erstellte BURK (1987) eine Klassifizierung des Se-Mangels. Demnach führt ein milder Mangel zu einem Abfall der hepatischen cGPx-Aktivität von nicht unter 5 % der Kontrolltiere. Ein moderater Se-Mangel dagegen bewirkt einen weiteren Abfall der cGPx-Aktivität, jedoch noch keine Veränderung der GST-Aktivität in der Leber. Ein schwerer Se-Mangel führt zusätzlich zu einer Induktion von Xenobiotica-metabolisierenden Enzymen (Tabelle 20).

Tabelle 20: Klassifikation eines Selen-Mangels bei der Ratte anhand des Schweregrades, nach BURK (1987).

Schweregrad des Se-Mangels	hepatische cGPx-Aktivität (% der Kontrolle)	Effekt auf Xenobiotica-metabolisierende Enzyme in der Leber
Mild	5-50 %	nicht vorhanden
Moderat	<5 %	nicht vorhanden
Schwer	<<5 %	vorhanden

In Anlehnung an diese Klassifikation ist der Se-Mangel bei den Tieren der Gruppen I und II in der vorliegenden Studie als „schwer“ einzustufen. In den Empfehlungen des NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1995) wurde der Se-Bedarf für die Ratte basierend auf optimalem Wachstum und maximaler cGPx-Aktivität auf mindestens 150 $\mu\text{g Se/kg}$ Diät festgelegt. Eine nach den Empfehlungen des AIN-93 konzipierte Diät soll eine Gesamt-Konzentration von ca. 180 $\mu\text{g Se/kg}$ enthalten (REEVES et al. 1993). Daher kann vermutet werden, dass mit der Gabe von 200 $\mu\text{g Se/kg}$ Diät in den Gruppen III und IV die maximalen Aktivitäten der Selenoenzyme erreicht wurden.

Der beobachtete Abfall der Aktivitäten der Se-abhängigen Enzyme und der Induktion der GST im Se-Mangel bei Ratten in der vorliegenden Untersuchung stehen im Einklang mit einer Reihe von Studien, welche in Tabelle 21 zusammenfassend dargestellt sind.

HILL et al. (1987) zeichneten bei wachsenden weiblichen Ratten im Se-Mangel über sechs Wochen die hepatischen cGPx- und GST-Aktivitäten auf. Während nach der ersten Woche die cGPx bereits auf 18 % und die pGPx auf 42 % der Kontrollgruppe abfiel, zeigte sich bei der GST eine Induktion ab der dritten Woche und ab der vierten Woche ein konstanter Wert. In einer weiteren Studie von HILL et al. (1997) mit männlichen Ratten über 14 Wochen konnte der rapide Abfall der cGPx-Aktivität in der Leber bestätigt werden. Die hepatischen TrxR-Aktivitäten dagegen wurden weniger stark vom Se-Mangel beeinflusst, wohingegen die Aktivitäten beider Enzyme im Gehirn weitestgehend stabil blieben. Eine Abhängigkeit der Aktivität der Selenoenzyme von der zugeführten Menge sowie der chemischen Form des Se wurde von DAVIS et al. (1999) belegt. Die Aktivität der cGPx in Erythrocyten und Leber lag in der mit Selenomethionin-supplementierten Gruppe signifikant höher im Vergleich zu den mit Selenat bzw. Selenit supplementierten Gruppen. Die Aktivität der GST war abhängig von der zugeführten Menge, nicht jedoch von der Darreichungsform.

MAY et al. (1998) postulierten eine Interaktion zwischen TrxR und VE über die Regeneration von Ascorbat. Die vorliegende Arbeit zeigte im Gegensatz dazu keinen Einfluss des VE auf die Aktivität der TrxR und steht damit in Einklang mit den Ergebnissen von CHENG et al. (1999a). Die Steigerung der Enzymaktivität der cGPx in der Gruppe II hingegen kann durch die ebenso beobachtete erhöhte Stabilität der mRNA durch VE (siehe Kapitel 5.3.2) erklärt werden. In Übereinstimmung mit den vorliegenden Daten zeigten HU et al. (1992) eine Zunahme der GPx-Aktivität in BHK-21/c13-Zellen durch α -Tocopherol. Allerdings blieb in dieser Studie die GST-Aktivität von der VE-Behandlung unbeeinflusst, während in der vorliegenden Studie die GST-Aktivität durch VE zusätzlich gesteigert wurde. Diese gegensätzlichen Befunde sind eventuell auf unterschiedliche Bedingungen *in vitro* und *in vivo* zurückzuführen.

Tabelle 21: Zusammenstellung verschiedener Se-Mangelstudien an männlichen Ratten

Se-Statusparameter	Versuchsbedingungen		Autoren	
	-Se	+Se		
<u>Se Leber (mg/kg TM)</u>	0,94±0,09	8,72±0,96	Versuchstiere: männliche Ratten Versuchsdauer: 45 Tage Se-Zulage: 200 µg/kg als Na ₂ SeO ₃ 30 mg/kg Vitamin E	(BAUERSACHS und KIRCHGESSNER 1992)
<u>cGPx Leber (mU/mg Protein):</u>	24,0±3,9	236,5±30,3		
<u>Se Leber (nmol/g FM):</u>	0,21±0,01	3,40±0,01	Versuchstiere: männliche Ratten (Anfangsgewicht: 68 g) Versuchsdauer: 48 Tage Se-Zulage: 75 µg/kg als Na ₂ SeO ₃ 340 mg/kg all-rac α-Tocopherol	(CASES et al. 2001)
<u>cGPx Leber (µmol/mg Protein)</u>	23,0±3,5	350,0±4,7		
<u>Se Leber (µmol/L Cytosol)</u>	0,06±0,01	a) 0,52±0,05 b) 0,47±0,08 c) 0,49±0,05	Versuchstiere: männliche Ratten Versuchsdauer: 21 Tage Se-Zulage: 100 µg/kg als a) Na ₂ SeO ₃ b) Na ₂ SeO ₄ c) Selenomethionin	(DAVIS et al. 1999)
<u>cGPx Leber (U/mg Protein)</u>	32±10	a) 526±25 b) 587±25 c) 803±46		
<u>cGPx Erythrocyten (U/mg Hb)</u>	69±3	a) 216±6 b) 227±4 c) 314±8		
<u>GST Leber (nmol/mg Protein)</u>	721±25	a) 577±24 b) 595±14 c) 550±29		
<u>pGPx Plasma (mU/mL)</u>	12±2	1300±160	Versuchstiere: männliche Ratten Versuchsdauer: 14 Wochen Se-Zulage: 250 µg/kg als Na ₂ SeO ₄	(HILL et al. 1997)
<u>cGPx Leber (mU/mg Protein)</u>	4±1	310±12		
<u>TrxR Leber (A₄₁₂*1000/mg Protein)</u>	7±6	160±27		
<u>cGPx Leber (mU/mg Protein) :</u>	1±1	691±61	Versuchstiere: männliche Ratten Versuchsdauer: 10 Wochen Se-Zulage: 230 µg/kg als Na ₂ SeO ₃ 20 mg dl-α-Tocopheroylacetat	(OLSSON et al. 1993)
<u>GST Leber (U/mg Protein):</u>	0,76±0,08	2,55±0,28		
<u>Se Leber (µg/kg FM)</u>	59±11	713±101	Versuchstiere: männliche Ratten Versuchsdauer: 8 Wochen Se-Zulage: 100 µg/kg als Na ₂ SeO ₃	(YUAN et al. 1991)
<u>cGPx Leber (mU/mg Protein)</u>	<5	824±160		
<u>GST Leber (mU/mg Protein)</u>	806±72	666±34		

5.5 Einfluss eines Selen- und/oder Vitamin E-Mangels auf Hämoglobingehalt und Hämatokritwert im Vollblut

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Wirkung von Se, VE und mögliche Interaktionswirkungen auf die hämatologischen Parameter Hämoglobin (Hb) und Hämatokrit (Hk) überprüft. In der Doppelmangelgruppe waren beide Parameter signifikant zur Kontrolle erniedrigt. Es ergab sich anhand der zweifaktoriellen ANOVA ein signifikanter Einfluss des Se ($<0,001$ bzw. $0,043$) sowie des VE ($0,003$ bzw. $0,024$) auf die Hb-Konzentration bzw. den Hk-Wert.

OSTER et al. (1988) wiesen nach, dass in menschlichen Erythrocyten 85 % des Se an Hämoglobin gebunden vorliegt. Die Autoren schlossen daraus, dass Se die Hb-Synthese und die Erythropoese begünstigen könnte. Darüber hinaus wird die Abnahme des Hk als eine Akute-Phase-Reaktion bei der Ratte gewertet, da es in einer inflammatorischen Stoffwechsellage zu Änderungen in der Syntheserate der entsprechenden Proteine kommt (SCHREIBER et al. 1989). MÜLLER (2000) fand bei Kaninchen einen positiven Einfluss von VE auf die Hämsynthese und einen signifikanten Einfluss auf die Blutbildung, während Se in der Untersuchung keinen nennenswerten Einfluss auf die hämatologischen Parameter hatte. In einer Langzeitstudie über sieben Monate konnte bei Ratten kein signifikanter Einfluss eines Se-Mangels auf die hämatologischen Parameter festgestellt werden (HU et al. 1984). MATSUDA et al. (1998) ermittelten ebenso keine signifikanten Unterschiede zwischen Se-depletieren und mit $500 \mu\text{g}$ Se-supplementierten Ratten nach 20 Wochen in der Hb-Konzentration und im Hk-Wert. Ähnliche Beobachtungen liegen von BAUERSACHS und KIRCHGESSNER (1992) vor. Ein Se-Mangel führte zu keinen signifikanten Veränderungen bei den untersuchten hämatologischen Parametern. Jedoch zeigte sich ohne Berücksichtigung der verschiedenen Se-Stufen bei den VE-Mangelgruppen ein um 2,5 % niedrigerer Hämoglobinwert im Vergleich zu den VE-supplementierten Gruppen.

In der Literatur werden abgesehen von Auswirkungen eines VE- und Se-Mangels auf Hämsynthese und Blutbildung weitere pathologische Befunde beschrieben, bei denen jedoch mehr der Schutz vor Hämolyse durch oxidative Schäden an den Phospholipiden und Proteinen der Erythrocytenmembran im Vordergrund stehen (DRAKE und FITCH 1980). KIM et al. (1988) zeigten an von Se-depletieren Ratten stammenden Erythrocyten

eine erhöhte t-Butylhydroperoxid-induzierte Hämolyse gegenüber der Kontrollgruppe. Der Effekt einer VE- bzw. GSH-Supplementation war weniger stark ausgeprägt. In einer Studie von SUNDE und HOEKSTRA (1980) schützte die Zugabe von Glucose zu Erythrocyten *in vitro* vor einer Hämolyse, vermutlich indem reduzierende Substrate für die GPx bereitgestellt wurden. Ein bei Ratten über 12 Wochen induzierter VE-Mangel erhöhte *in vitro* die Empfindlichkeit von Erythrocyten gegenüber H₂O₂-induzierter Hämolyse (WANG et al. 1996). Eine Vitamin C- und Glucose-Supplementation bei den gut mit VE-versorgten Tieren führte zu einer weiteren Steigerung der Resistenz der Erythrocyten gegenüber H₂O₂. Bei Untersuchungen an Kälbern stellten SIDDONS und MILLS (1981) im kombinierten Se- und VE-Mangel eine erhöhte Neigung zur peroxidativen Hämolyse bei Erythrocyten fest, nicht jedoch, wenn einer der beiden Wirkstoffe in ausreichendem Maße vorhanden war.

Demnach sind Effekte eines Se- und/oder VE-Mangels auf hämatologische Parameter *in vivo* nicht einheitlich, wohingegen Se- und/oder VE-depletierte Zellen *in vitro* übereinstimmend eine erhöhte Peroxid-induzierte Hämolyseneigung zeigen.

5.6 Einfluss eines Selen- und/oder Vitamin E-Mangels auf den Glutathionmetabolismus und Vitamin C-Konzentrationen in der Leber

In der Leber kam es nach 7-wöchiger Versuchszeit zu keinen signifikanten Unterschieden in der GSH-Konzentration zwischen den Versuchsgruppen. Die signifikant niedrigste GSSG-Konzentration und daraus resultierend das höchste GSH/GSSG Verhältnis war in der Doppelmangelgruppe zu finden. Die zweifaktorielle ANOVA ermittelte für die Parameter GSSG und GSH/GSSG einen signifikanten Einfluss von Se (<0,001) und VE (<0,001 bzw. 0,001). Darüber hinaus wurde in den Se-Mangelgruppen I und II im Vergleich mit den Se-supplementierten Gruppen eine signifikant höhere GR-Aktivität gemessen.

Glutathion zählt zu den intrazellulären Antioxidantien, indem es Sulfhydryl-Gruppen zur Reduktion von Peroxiden bereitstellt. Daher wird im Falle eines erhöhten oxidativen Stresses eine Anreicherung von GSSG und ein niedriges GSH/GSSG Verhältnis erwartet. In

der vorliegenden Studie jedoch zeigten die Se-Mangelgruppen die niedrigsten GSSG-Spiegel. Da dies einherging mit einer signifikant verringerten GPx-Aktivität in der Leber, kann auf eine verminderte Bildung von GSSG im Se-Mangel geschlossen werden. Ferner muss berücksichtigt werden, dass mittels cDNA-Array im Doppelmangel eine Depression des γ -Glutamylcysteinsynthetase-Gens festgestellt wurde und dadurch eine verminderte Synthese an Glutathion denkbar wäre. Da darüber hinaus in der vorliegenden Studie die Aktivität der GR im Se-Mangel signifikant erhöht war, könnte ein vermehrter Umsatz von GSSG zu GSH stattgefunden haben. Der Anstieg der GR-Aktivität wiederum gilt als ein Anzeichen für vermehrten oxidativen Stress (SIES 1991).

COURSIN und CIHLA (1996) fanden nach einer Se-Depletion von 20 Tagen bei Ratten zwar eine signifikante Abnahme der cGPx-Aktivität in den Lungen verglichen mit den Kontrolltieren (150 μg Se/kg Diät), in Bezug auf die GR-Aktivität zeigte sich jedoch nur eine tendenzielle Zunahme im Se-Mangel. Eventuell war eine Depletion von 20 Tagen nicht ausreichend, um die beobachteten Effekte hervorzurufen. In Bezug auf die GSSG-Konzentration stehen die Ergebnisse im Einklang mit Untersuchungen von LII und HENDRICH (1993), bei denen Rattenhepatocyten nach 7-wöchiger Se-Depletion signifikant niedrigere GSSG-Spiegel aufwiesen. YUAN et al. (1991) konnten in der Leber von Ratten im Se-Mangel nach acht Wochen keinen signifikanten Unterschied in der GSH-Konzentration zu den mit 100 μg Se/kg Diät supplementierten Tieren feststellen. Ebenso führte ein 4- bzw. 8-wöchiger VE-Mangel zu keinen signifikanten Unterschieden in der GSH-Konzentration in den untersuchten Organen (Leber, Gehirn, Herz, Lunge, Niere, Muskel). JENKINSON et al. (1987) fanden in der Lunge von Se-defizienten Ratten nach sechs Monaten im Vergleich zur Kontrollgruppe (500 μg Se/kg Diät) niedrigere basale GSSG-Spiegel, während die GSH-Konzentrationen in beiden Gruppen gleich waren. Die Aktivität der GR blieb in dieser Studie durch die diätetische Behandlung unbeeinflusst. Allerdings konnten die Autoren zeigen, dass die doppelte Menge an GSH gegenüber GSSG aus den Lungen freigesetzt wurde. Ähnliche Befunde wurden von HILL und BURK (1982) erhoben. In der Leber von Ratten, welche über 14 Woche eine Se-Mangeldiät verabreicht bekamen, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der basalen GSH-Konzentration im Vergleich zu den Kontrolltieren (500 μg Se/kg Diät). Dennoch kam es in den Hepatocyten zu einer gesteigerten Glutathionsynthese, einhergehend mit einer erhöhten Abgabe von GSH ins Blut. Eventuell führte der Se-

Mangel in der vorliegenden Studie ebenfalls zu einer erhöhten Abgabe von GSH ins Blut, eine erhöhte Glutathionsynthese konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, die Glutathion-Spiegel im Blut zu bestimmen.

VE, Glutathion und Vitamin C stehen in einem engen Zusammenhang, da GSH und Vitamin C zur Regenerierung des VE-Radikals beitragen. Das Se-abhängige Enzym TrxR vermag darüber hinaus die Reduktion der Dehydroascorbinsäure und des Ascorbyl-Radikals zu katalysieren (MAY et al. 1998). Der Verbrauch an Vitamin C gilt als Indikator für oxidativen Stress (BECKER et al. 2000). Daher wurden zusätzlich die Ascorbat-Spiegel in der Leber bestimmt. Der kombinierte Mangel an VE und Se führte bei den Tieren der Gruppe I zu einer signifikanten Depletion an Ascorbinsäure, wobei auch Se allein einen signifikanten Einfluss ($p=0,02$) ausübte.

In Untersuchungen von MAY et al. (1997) wurde ebenfalls eine Abnahme der Ascorbat-Konzentrationen in der Leber von Se-defizienten Ratten beobachtet. Dabei fielen die Spiegel um 20-30 % ab verglichen mit den mit 250 μg Se/kg Diät versorgten Tieren. Der 14-wöchige Se-Mangel führte darüber hinaus zu signifikant verminderten cGPx- und TrxR-Aktivitäten, während die GSH-Spiegel, verglichen mit der Kontrollgruppe, auf gleichem Niveau lagen. Die Autoren führen den beobachteten Effekt auf die verminderte TrxR-Aktivität zurück. In einer kürzlich veröffentlichten Studie bewirkte die Zugabe von Se (0-120 nmol/L) dosisabhängig eine Zunahme der TrxR-Aktivität in kultivierten Hepatocyten (LI et al. 2001). In den supplementierten Zellen kam es zu einem Erhalt an intrazellulärem Ascorbat. Dieser Effekt könnte auf die Aktivität der TrxR zurückzuführen sein, darüber hinaus auf die Aktivitäten der Selenoenzyme cGPx und PHGPx, welche durch Entgiftung von Hydroperoxiden Ascorbinsäure vor dem Verbrauch schützen.

Diese Daten führen zu dem Schluss, dass es in Se- und/oder VE-depletierten Leberzellen zu einem Verlust bzw. Verbrauch an weiteren zellulären Schutzsystemen kommt.

5.7 Einfluss eines Selen- und/oder Vitamin E-Mangels auf DNA-Schäden in der Leber

Mit Hilfe des Comet Assays wurden DNA-Schäden in der Leber bestimmt. Anhand der Parameter „% DNA im Schweif“ und „Tailmoment“ ergaben sich keine signifikanten

Unterschiede zwischen den Gruppen. Die höchste DNA-Schädigung (4,1 % DNA im Schweif) wurde in der VE-Mangelgruppe III gemessen (Abbildung. 14). Insgesamt gesehen befanden sich die DNA-Schäden auf sehr niedrigem Niveau; der durchschnittliche Wert für den Parameter % DNA im Schweif über alle vier Gruppen lag bei 3,7 %. Demnach konnten unter den gegebenen Versuchsbedingungen *in vivo* bei den untersuchten Leberzellen kaum Einfach- und Doppelstrangbrüche induziert werden. In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse aus der Untersuchung zur differentiellen Genexpression in der Leber erwähnenswert, welche zehn an der DNA-Reparatur beteiligte Proteine beinhalteten. Dazu gehörten u.a. die DNA Excision Repair Proteine ERCC 1, 2 und 4; die G/T Mismatch-spezifische Thymin DNA Glycosylase; die AP Endonuclease; die 8-Oxyguanin DNA Glycosylase und das MSH2 DNA Mismatch Repair Protein. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression zwischen den Gruppen.

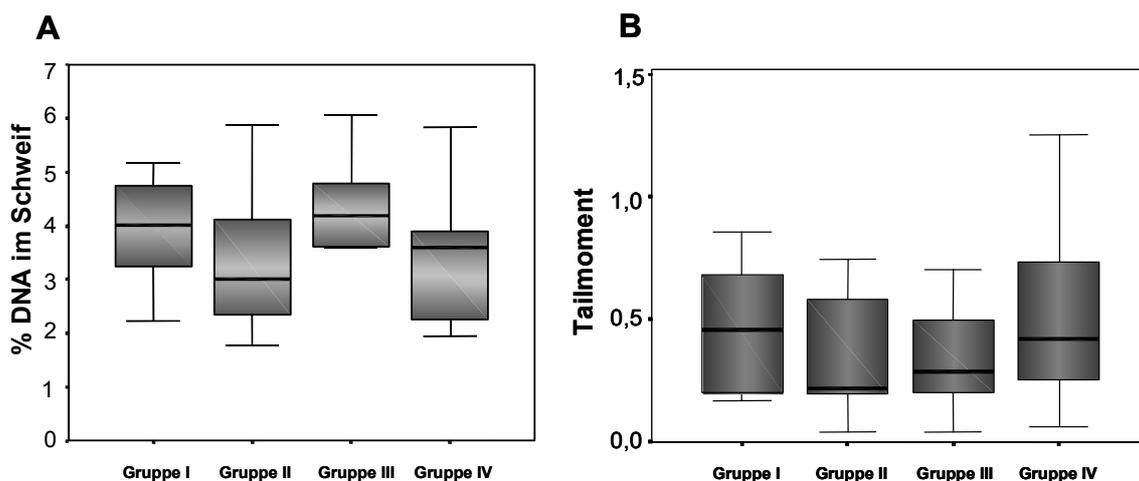


Abbildung 14: Einfluss eines Selen- und/oder Vitamin E-Mangels bei der Ratte auf DNA-Schäden in der Leber, anhand der Parameter „% DNA im Schweif“ (A) und „Tailmoment“ (B).

Aufgrund einer Überproduktion an reaktiven Sauerstoffspezies wird eine oxidative Schädigung der DNA postuliert (AMES et al. 1993). Dennoch war in der vorliegenden Studie der Se- und/oder VE-Mangel nicht mit erhöhten DNA-Schäden assoziiert. Untersuchungen von BOUZYK et al. (1997) belegten, dass eine Supplementation von 100 nM Natriumselenit zu zwei verschiedenen Lymphocyten-Zelllinien (LY-R und LY-S) *in*

vitro zwar zu einer Induktion der cGPx-Aktivität, jedoch nicht zu signifikanten Unterschieden im Parameter Tailmoment führte. Hingegen zeigten die Se-supplementierten Zellen nach einer Inkubation mit 50 μM H_2O_2 signifikant niedrigere Tailmoment-Werte im Vergleich zur nicht-supplementierten Gruppe. In einer Studie von EMONET-PICCARDI et al. (1998) erfolgte bei humanen Fibroblasten nach 3-wöchiger Inkubation mit Natriumselenit (0,6 μM) eine Reduktion der durch UV-Strahlung hervorgerufenen DNA-Schädigung, während die Se-Supplementierung bei nicht-bestrahlten Zellen keinen Einfluss hatte. Wie aus Untersuchungen an humanen Lymphocyten hervorgeht, führte die alleinige Inkubation der Zellen mit 100 μM α -Tocopherol zu keinen signifikanten Unterschieden, während α -Tocopherol den DNA-schädigenden Effekt einer H_2O_2 -Inkubation (200 μM) verhinderte (DUTHIE et al. 1997). Diese *in vitro*-Effekte wurden *in vivo* von WELCH et al. (1999) bestätigt. Eine 4-wöchige Supplementation mit 250 mg α -Tocopherol, 350 mg Ascorbinsäure oder 80 μg Se als Natriumselenit führte bei Rauchern bzw. Nichtrauchern zu keinem signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Die DNA-Schäden wurden mit Hilfe des Comet Assays und durch Messung von 8-Hydroxydeoxyguanosin in Leukocyten bestimmt. Die Autoren schlossen daraus, dass eine Supplementation mit Ascorbinsäure, α -Tocopherol oder Se oxidative Schäden in Leukocyten nicht zu senken vermag. Demgegenüber zeigte eine Studie bei Mäusen, welche Zigarettenrauch ausgesetzt waren, dass die orale Gabe von 100 mg VE/kg Körpergewicht eine Stunde vor der Exposition signifikant das Vorhandensein von Einzelstrangbrüchen in Zellen der Lunge, Leber und des Magens reduzierte (TSUDA et al. 2000). Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten auf der Untersuchung von unterschiedlichen Zielorganen beruhen. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass in der Humanstudie vor der Se-Supplementation bereits maximale cGPx-Aktivitäten vorhanden waren und daher ein eventueller Effekt möglicherweise nicht zum Vorschein kam.

Interessanterweise dokumentierten REDDY et al. (1997) an Linsenepithelzellen bei Mäusen, welche ein knock-out bzw. eine Überexpression für das cGPx-Gen besaßen, dass im unbehandelten Zustand kein Unterschied in der DNA-Schädigung bei den genmanipulierten Tieren gegenüber den Kontrolltieren auftrat. Demgegenüber lagen die DNA-Schäden in den Epithelzellen der knock-out Mäuse nach Behandlung mit 25 μM H_2O_2 um das fünffache über den Kontrollzellen. Die Zellen der Mäuse, in denen das

cGPx-Gen überexprimiert wurde, wiesen dagegen nur 40 % der Schädigung der Kontrollzellen auf.

In Bezug auf VE zeigten FACTOR et al. (2000) anhand eines transgenen Mausmodells, welches mit 100 %iger Inzidenz ein Leberkarzinom entwickelt, eine signifikante Reduktion der Tumorinzidenz durch Modulation der Initiations- als auch der Progressionsphase. Bei einer Administration von 2000 IU/kg Diät führte VE zu einer Abnahme an chromosomalen Aberrationen und Schäden in der mitochondrialen DNA.

Daher scheint ein protektiver Effekt von Se und VE auf Schäden in der DNA zu existieren, welcher jedoch erst durch einen zusätzlichen Stressor, wie z.B. Irradiation oder H₂O₂ zum Vorschein kommt. Eventuell hat darüber hinaus die Messung der DNA-Schäden mit Hilfe des Comet Assays nicht zur Detektion möglicher Effekte ausgereicht. Aus diesem Grund erscheint es sinnvoll, den Comet Assay durch die zusätzliche Anwendung eines DNA-Reparaturenzyms (Endonuklease III) zu sensitivieren, da dieses Verfahren zu einer spezifischen Detektion von oxidierten Pyrimidinen in der DNA führt (JENKINSON et al. 1999).

5.8 Einfluss eines Selen- und/oder Vitamin E-Mangels auf Parameter einer Zellschädigung sowie Inflammation

Als Maß für eine Lipidschädigung wurden die TBA-RS in der Leber bestimmt. VE, nicht jedoch Se, vermochte die Bildung signifikant zu reduzieren. Ein protektiver Einfluss von VE auf die Entstehung der TBA-RS ist in der Literatur zahlreich beschrieben (BUCKINGHAM 1985, WHITTAKER et al. 1996, TOKUMARU et al. 1997, CHENG et al. 1999b). Die Se-Zulage hingegen führte in der vorliegenden Untersuchung zu einem Anstieg der TBA-RS-Konzentration in der Leber. In der Ätiologie einer Se-Toxizität kommt es nach Reaktion von Selenit mit Glutathion über Bildung von Hydrogenselenid und anschließender Reaktion mit molekularem Sauerstoff zur Generation von Superoxid-Radikalen (SPALLHOLZ 1997). Dies führt zur Depletion an Reduktionsäquivalenten und Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, welche wiederum Lipidperoxidation initiieren können. Es ist jedoch nicht sehr wahrscheinlich, dass diese Effekte in der vorliegenden Untersuchung *in vivo* bei einer Zulage von 200 µg Se/kg Diät zu tragen gekommen sind.

Ebenso sind die Effekte eines Se-Mangels auf Lipidschädigungen weniger eindeutig im Vergleich zu den Effekten eines VE-Mangels. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit führte bei Untersuchungen von AWAD et al. (1994) ein alleiniger Se-Mangel über 16 Wochen bei Ratten zu keinem Anstieg der Lipidperoxidation, während eine signifikante Lipidschädigung im Doppelmangel zu verzeichnen war. In isolierten Mitochondrien des Herzens, welche von Se- und/oder VE-depletierten Ratten stammten, wurde mittels Eisenprovokation *in vitro* eine Lipidperoxidation induziert (SCHOLZ et al. 1997). Dabei konnte ein schützender Effekt des VE ermittelt werden, der Se-Status hatte demgegenüber keinen signifikanten Einfluss auf die Progression der Lipidperoxidation in der mitochondrialen Membran. Eine VE- (30 IU/kg Diät) und/oder Se-Supplementierung (100 µg/kg Diät als Natriumselenit) über 42 Tage zeigte bei Ratten eine signifikante, VE-abhängige Reduktion der TBA-RS in Leber, Herz und Milz, während Se nur in der Niere einen signifikanten Einfluss aufwies. Ratten, welche sich über 20 Wochen im Se-Mangel befanden, wiesen in Leber, Muskel, Erythrocyten und Plasma ebenso keine erhöhten TBA-RS-Spiegel auf (MATSUDA et al. 1998). Signifikante Effekte waren lediglich im Herzen abzusichern. Demnach scheinen bestimmte Organe weniger anfällig gegenüber Se-Mangel-induzierter Lipidperoxidation zu sein. So könnten Anpassungsmechanismen, wie z.B. die Induktion der GST in den Se-depletierten Gruppen sowie noch vorhandene Aktivitäten von Selenoenzymen (z.B. PHGPx) in der vorliegenden Studie vor Lipidschädigungen in der Leber geschützt haben. Bei Untersuchungen von CHENG et al. (1999a) mit Se-adequat bzw. Se-defizitär versorgten cGPx knock-out Mäusen führte ein durch Paraquat (50 mg/kg Körpergewicht) induzierter Stress zu einem Anstieg der F₂-Isoprostane in der Lunge der knock-out Mäuse, unabhängig von der Se-Versorgung und damit von den Aktivitäten der restlichen Selenoproteine. Dies deutet auf einen Hauptschutz durch die cGPx in der Lunge hin. In der Leber dagegen scheinen zusätzlich zu der cGPx weitere Selenoproteine für den Schutz verantwortlich zu sein; denn hier zeigte sich bei den Se-supplementierten knock-out Mäusen eine höhere Resistenz gegenüber Paraquat-induzierter Schädigung. Für zukünftige Forschungsvorhaben wäre es daher von Interesse, weitere Organe (Herz, Niere, Lunge) auf eine Lipidschädigung zu prüfen.

Die differierenden Ergebnisse in der Literatur können ferner anhand der Dauer des induzierten Mangels erklärt werden. Unter Umständen war die Versuchszeit von sieben

Wochen zur Etablierung des Mangels nicht ausreichend, um Effekte in der Leber hervorzurufen, während die protektive Wirkung des VE eindeutig belegt wurde. Zudem könnte die Bestimmung der TBA-RS nicht sensitiv genug sein, um einen eventuellen Einfluss des Se aufzudecken. Daher schlagen CHENG et al. (1997a) anstelle der TBA-RS-Bestimmung die sensitivere Messung von F_2 -Isoprostanen als Indikator für eine Se-Mangel-induzierte Lipidschädigung vor. In den von den Autoren durchgeführten Studien konnte zwar ein Effekt des VE durch die Bestimmung der TBA-RS detektiert werden, nicht jedoch ein Effekt einer cGPx Überexpression bzw. eines cGPx knock-outs. Nach Messung der F_2 -Isoprostan-Konzentration hingegen zeigte sich ein hemmender Effekt der cGPx auf Paraquat-induzierte Lipidperoxidation bei niedrigem VE-Spiegel in der Leber (CHENG et al. 1999b).

Als weiterer Zellschädigungsparameter wurde die Aktivität der γ -GS bestimmt, deren Aktivitätsabnahme als Indikator für eine Proteinschädigung gilt (LIU et al. 2000). Allerdings war in der vorliegenden Studie die Aktivität in der Gruppe I signifikant zu den restlichen Gruppen erhöht. Die γ -GS katalysiert die *de novo* Synthese von Glutamin aus Glutamat und Ammoniak. In einer Stresssituation erhöht sich der Glutamin-Umsatz und damit der Bedarf an Glutamin. Glucocorticoid-Hormone gelten als prinzipielle Mediatoren einer γ -GS Induktion unter physiologischem Stress. Eine Stress-bedingte Steigerung der Aktivität könnte daher eine eventuelle Schädigung und damit Aktivitätsabnahme der γ -GS bei den Tieren im Doppelmangel verdeckt haben. Allerdings zeigten Studien, dass die γ -GS durch Glucocorticoide gewebespezifisch und zwar vorwiegend in Lunge und Muskel induziert wird (ABCOUWER et al. 1995). VATS et al. (1999) hingegen belegten eine Steigerung der γ -GS in der Leber und Muskel bei Ratten, welche über mehrere Tage einem Stress durch Sauerstoffentzug ausgesetzt waren. Da keine zusätzlichen Parameter der Proteinschädigung gemessen wurden, kann abschließend nicht beurteilt werden, ob eine Schädigung in der Leber vorgelegen hat. Die Messung von weiteren Indikatoren für Zellschädigung und Inflammation lassen jedoch vermuten, dass eine inflammatorische Situation zu der Induktion der γ -GS in der Doppelmangelgruppe führte. So kam es in dieser Gruppe tendenziell zu einer erhöhten leberspezifischen LDH-Aktivität im Plasma und zu einem signifikanten Anstieg des Akute-Phase-Proteins MT. Bereits auf mRNA-Ebene konnte eine Induktion des MT-Gens festgestellt werden. Übereinstimmend mit den vorliegenden Befunden beobachteten

FRAGA et al. (1987) nach 21 Tagen bei Ratten im kombinierten Se- und VE-Mangel Lebernekrosen, welche zu einem signifikanten Anstieg des LDH-Spiegels im Plasma führten, während ein alleiniger Se- bzw. VE-Mangel keine erhöhte LDH-Aktivität verursachte. STANGL et al. (2000) konnten eine signifikante Induktion der MT-Gehalte in der Leber von VE-defizitären Ratten verzeichnen, einhergehend mit einer gesteigerten Lipidperoxidation. Möglicherweise hat in der vorliegenden Studie eine erhöhte Lipidperoxid-Konzentration zu einer Aktivierung der Cyclooxygenase- und Lipoxygenase-Aktivität geführt. Dadurch kann es zu einer Stimulierung der Prostaglandin- und Leukotrien-Produktion und somit zu inflammatorischen Prozessen in der Doppelmangelgruppe gekommen sein. Diese Erklärung steht im Einklang mit den mittels cDNA-Array gewonnenen Daten auf genomischer Ebene, welche einen Anstieg der Expression pro-inflammatorischer Gene aufzeigten.

6 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Untersuchung führte ein über die Diät erzeugter Se- und VE-Mangel bei wachsenden Ratten auf Ebene der Genexpression zu einer Repression des Zellcyclus und einer Induktion pro-inflammatorischer Gene. Eine inflammatorische Situation wurde durch Abfall des Hämatokrits sowie durch Anstieg des Akute-Phase-Proteins Metallothionein und der γ -Glutaminsynthetase bestätigt. Ein Mangel an Se und VE führte darüber hinaus zu einer vermehrten Lipidschädigung und zu einer Depletion an Vitamin C in der Leber. Vermutlich hatte der Abfall der VE-Konzentration und die Abnahme der Aktivitäten der Selenoproteine einen verminderten Schutz vor der schädigenden Wirkung von Peroxiden zur Folge, wodurch eine inflammatorische Stoffwechsellage induziert wurde. Allerdings konnten keine DNA-Schäden in der Leber der Versuchstiere nachgewiesen werden. Da es ebenso zu einem Anstieg ausgleichender zellulärer Schutzsysteme kam (Glutathion-S-Transferase, Induktion der Diaphorase), wurden dadurch eventuell weitere Zellschädigungen verhindert.

Eine alleinige Supplementation an Se bzw. VE konnte jeweils die Effekte auf Zellschädigungsparameter im Doppelmangel mindern. Darüber hinaus kam es durch die VE-Supplementation im Se-Mangel zu einer Steigerung der mRNA sowie Enzymaktivität der cGPx und einer erhöhten Se-Konzentration in der Leber. Damit unterstreichen die vorliegenden Ergebnisse die synergistischen Effekte zwischen VE und Se.

Der alleinige VE-Mangel führte, verglichen mit dem Doppelmangel, ebenso zu einer verstärkten Lipidperoxidation, dies war jedoch nicht assoziiert mit einer signifikanten differentiellen Expression der untersuchten Gene. Da nur eine Auswahl an Genen zur Verfügung stand und ausschließlich die Leber betrachtet wurde, kann abschließend nicht beurteilt werden, ob eine Änderung der Genexpression durch einen VE-Mangel bei den Ratten stattgefunden hat.

Zur Evaluierung des Einflusses eines VE- und/oder Se-Mangels auf die differentielle Genexpression bei der Ratte sollten daher weitere Versuche mit verschiedenen Organen unter Verwendung von cDNA-Arrays mit einer größeren Anzahl von Genen erfolgen. Da, wie von den eigenen Untersuchungen bestätigt, Effekte eines alimentären Se-Mangels auf Zellschädigungsparameter bei der Ratte gering sind, sind für die Bestimmung einer Lipidperoxidation sensitive Parameter (z.B. die Messung von F₂-Isoprostanen) sowie bei

der Messung von DNA-Schäden ein zusätzlicher Stressor (z.B. H_2O_2) in Erwägung zu ziehen.

7 Zusammenfassung

Selen (Se) und Vitamin E (VE) spielen eine bedeutende Rolle bei zahlreichen biologischen Prozessen, einschließlich antioxidativem Zellschutz, Modulation redox-sensitiver Enzymkaskaden und Zellwachstum. Über die molekularen Mechanismen, die diesen beobachteten Effekten zugrunde liegen, ist hingegen wenig bekannt. Die vorliegende Arbeit hatte daher zum Ziel, den Einfluss eines alimentären Se- und/oder VE-Mangels auf differentielle Genexpression in der Leber zu untersuchen. Darüber hinaus sollten der Se- und VE-Status sowie verschiedene Zellschädigungsparameter bestimmt werden.

Dazu wurden vier Gruppen mit jeweils acht männlichen Albinoratten mit einem durchschnittlichen Anfangsgewicht von $35,0 \pm 0,8$ g einer Se- und VE-armen Diät auf der Basis von Torula-Hefe (30 %) und VE-entzogenem Maiskeimöl (5 %) zugeteilt. Die Kontrollgruppe (Gruppe IV) erhielt Zulagen an VE (75 mg DL- α -Tocopherylacetat je kg Diät) und Se (200 μ g Se/kg Diät als Natriumselenat). Gruppe I wurde die Se- und VE-defiziente Basisdiät gefüttert. In den beiden anderen Gruppen wurde zu der Basisdiät entweder VE (Gruppe II) oder Se (Gruppe III) zugelegt. Nach sieben Wochen wurden die Ratten dekapitiert und die zur Analyse benötigten Organe sowie Blut- und Plasmaproben gewonnen.

Zur Durchführung einer differentiellen Genexpressionsanalyse wurde in der Leber ein Expressionsprofil von 450 Genen mit Hilfe eines Atlas Rat Toxicology cDNA Arrays erstellt und ausgewählte Gene auf Proteinebene verifiziert. Zur Charakterisierung des Se-Status der Tiere wurden die Se-Konzentrationen in der Leber sowie die Aktivitäten der Se-abhängigen Enzyme zelluläre Glutathionperoxidase (cGPx), plasmatische Glutathionperoxidase (pGPx) und Thioredoxinreduktase (TrxR) bestimmt. Der α -Tocopherol-Gehalt im Plasma und in der Leber diente der Beschreibung des VE-Status. Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBA-RS) und die Aktivität der γ -Glutaminsynthetase (γ -GS) wurden als Kriterien einer Zellschädigung auf Lipid- bzw. Proteinebene herangezogen. Mögliche Schäden auf DNA-Ebene wurden mit Hilfe des Comet Assays bestimmt. Als Parameter einer Inflammation diente die Bestimmung der Metallothionein (MT)-Gehalte und der Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH). Darüber hinaus wurde der Einfluss des VE- und/oder Se-Mangels auf die Blutparameter Hämoglobin (Hb) und Hämatokrit (Hk) sowie

auf die antioxidativen Schutzmechanismen reduziertes (GSH) bzw. oxidiertes (GSSG) Glutathion, Glutathionreduktase (GR), Glutathion-S-Transferase (GST) und Vitamin C in der Leber untersucht.

Folgende Ergebnisse konnten erzielt werden:

- Der Se- und VE-Mangel führte nach sieben Wochen zu einer signifikanten Reduktion der Lebendmasse und der Futterverwertung.
- Anhand der VE-Konzentrationen in Plasma und Leber wurde ein eindeutiger VE-Mangel in den Gruppen I und III diagnostiziert. Durch einen signifikanten Abfall der Se-Konzentrationen, der Aktivitäten der gemessenen Se-abhängigen Enzyme sowie eine Induktion der Se-unabhängigen Glutathionperoxidase (GST) in der Leber konnte der Se-Mangel in den Gruppen I und II als schwer beurteilt werden.
- Der alleinige VE-Mangel (Gruppe III) führte in der Leber zu keiner mindestens zweifachen Änderung der Expression der untersuchten Gene.
- In der Leber der Gruppe II wurden insgesamt neun Gene differentiell exprimiert. Der alleinige Se-Mangel führte zu einer Repression der cGPx und zu einer Induktion von Genen, welche an hepatischen Entgiftungsreaktionen beteiligt sind (DT-Diaphorase, Cytochrom P450 4B1, UDP-Glucuronosyltransferase 1).
- In der Leber der Gruppe I zeigten insgesamt 22 Gene eine differentielle Expression. Es kam zu einer weiteren Abnahme der cGPx-mRNA im Vergleich zum alleinigen Se-Mangel und zu einer Induktion von Genen mit antioxidativen Eigenschaften (DT-Diaphorase, MT). Der Doppelmangel war ferner durch eine signifikante Induktion von Genen charakterisiert, welche für Inflammation-assoziierte Proteine (Serin Protease Inhibitor, multispezifischer organischer Anionentransporter, 11-beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2) und Akute-Phase-Proteine (Serin Protease Inhibitor 3, Alpha-1 Acid Glycoprotein, Fibrinogen Gamma Chain) codieren. Darüber hinaus zeigte sich auf genomischer Ebene ein hemmender Effekt des Se- und VE-Mangels auf das Wachstum von Zellen durch eine Repression anti-apoptotischer (Defender against Cell Death 1 Protein, Inhibitor of Apoptosis Protein 1, Bcl2-L1) und wachstumsstimulierender Gene (G1/S-specific Cyclin D1, Nucleophosmin).

- Die GSH-Konzentration wurde durch den VE- und/oder Se-Mangel in der Leber nicht signifikant beeinflusst, die GSSG-Konzentration hingegen lag in Gruppe I und II signifikant niedriger. Da darüber hinaus eine erhöhte Aktivität der GR im Se-Mangel gemessen wurde, kann eine verstärkte Produktion an GSSG angenommen werden. Im Doppelmangel kam es zusätzlich in der Leber zu einer Depletion an Vitamin C.
- Der VE-Mangel führte zu einer signifikanten Lipidperoxidation in der Leber der Gruppen I und III. Im alleinigen Se-Mangel konnten dagegen keine erhöhten TBA-RS gemessen werden.
- Mit Hilfe des Comet Assays wurden keine signifikanten Unterschiede in der DNA-Schädigung zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen aufgezeigt. Mittels Genexpressionsanalyse wurden darüber hinaus keine signifikanten Unterschiede in den mRNA-Spiegeln der DNA-Reparaturenzyme festgestellt.
- Ein Abfall der γ -GS als ein Parameter der Proteinschädigung wurde in der vorliegenden Untersuchung nicht beobachtet. Stattdessen kam es zu einem Anstieg der Aktivität in der Doppelmangel-Gruppe, was auf eine Stress-bedingte Induktion schließen lässt.
- Gemessen an den Kriterien MT und LDH zeigte sich in der Gruppe I eine erhöhte inflammatorische Stoffwechsellage. Der Doppelmangel führte darüber hinaus zu einer Abnahme der Blutparameter Hb und Hk, was ebenfalls als eine inflammatorischen Reaktion gewertet werden kann.
- Die VE-Zulage führte im Se-Mangel zu einer signifikanten Steigerung der Se-Konzentration, der cGPx-mRNA sowie der cGPx-Aktivität in der Leber.

Damit konnten mit Hilfe der Microarray-Technologie in Abhängigkeit eines Se- und/oder VE-Mangels differentiell exprimierte Gene in der Leber wachsender Ratten nachgewiesen werden. Änderungen auf Expressionsebene führten bei ausgewählten Parametern ebenfalls zu einer Änderung auf Proteinebene.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Doppelmangel zu erhöhten inflammatorischen Prozessen, vermehrten Zellschädigungen, vermindertem Zellzyklus, Depletion an Vitamin C sowie Induktion kompensatorischer Mechanismen in der Leber führte. Um DNA-Schäden zu induzieren, scheint dagegen unter den gegebenen Versuchsbedingungen ein zusätzlicher Stressor (z.B. H_2O_2) notwendig zu sein. Eine

alleinige Supplementation an Se bzw. VE konnte jeweils die Effekte auf Zellschädigungsparameter im Doppelmangel mindern, mit Ausnahme des Parameters TBA-RS. Hier konnten keine Auswirkungen einer Se-Zulage ermittelt werden, so dass zur Evaluierung einer Lipidschädigung im Se-Mangel eventuell sensitivere Methoden Anwendung finden sollten. Die vorliegende Studie bestätigt somit auch auf molekularer Ebene die lange bekannten synergistischen Effekte zwischen VE und Se.

8 Literaturverzeichnis

- ABCOUWER S.F., BODE B.P., SOUBA W.W. (1995): Glucocorticoids regulate rat glutamine synthetase expression in a tissue-specific manner. *J.Surg.Res.* **59**, 59-65
- AHRENDT S.A., HALACHMI S., CHOW J.T., WU L., HALACHMI N., YANG S.C., WEHAGE S., JEN J., SIDRANSKY D. (1999): Rapid p53 sequence analysis in primary lung cancer using an oligonucleotide probe array. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 7382-7387
- AKUTSU N., LIN R., BASTIEN Y., BESTAWROS A., ENEPEKIDES D.J., BLACK M.J., WHITE J.H. (2001): Regulation of gene expression by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and its analog EB1089 under growth-inhibitory conditions in squamous carcinoma cells. *Mol.Endocrinol.* **15**, 1127-1139
- ALCANTARA O., KALIDAS M., BALTATHAKIS I., BOLDT D.H. (2001): Expression of multiple genes regulating cell cycle and apoptosis in differentiating hematopoietic cells is dependent on iron. *Exp.Hematol.* **29**, 1060-1069
- ALON U., BARKAI N., NOTTERMAN D.A., GISH K., YBARRA S., MACK D., LEVINE A.J. (1999): Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 6745-6750
- AMES B.N. (1989): Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free Radic.Res.Commun.* **7**, 121-128
- AMES B.N., SHIGENAGA M.K., HAGEN T.M. (1993): Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **90**, 7915-7922
- ANDERSON M.E. (1998): Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem.Biol.Interact.* **111-112**, 1-14
- ANDREESEN J.R., LJUNGDAHL L.G. (1973): Formate dehydrogenase of *Clostridium thermoaceticum*: incorporation of selenium-75, and the effects of selenite, molybdate, and tungstate on the enzyme. *J.Bacteriol.* **116**, 867-873
- ARATRI E., SPYCHER S.E., BREYER I., AZZI A. (1999): Modulation of alpha-tropomyosin expression by alpha-tocopherol in rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* **447**, 91-94
- ARDÜSER F., WOLFFRAM S., SCHARRER E. (1985): Active absorption of selenate by rat ileum. *J.Nutr.* **115**, 1203-1208
- ARNÉR E.S., HOLMGREN A. (2000): Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur.J.Biochem.* **267**, 6102-6109
- ARTEEL G.E., MOSTERT V., OUBRAHIM H., BRIVIBA K., ABEL J., SIES H. (1998): Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration. *Biol.Chem.* **379**, 1201-1205
- ARTHUR J.R. (2000): The glutathione peroxidases. *Cell Mol.Life Sci.* **57**, 1825-1835
- ARTHUR J.R., BECKETT G.J. (1994): New metabolic roles for selenium. *Proc.Nutr.Soc.* **53**, 615-624
- ARTHUR J.R., BECKETT G.J. (1999): Thyroid function. *Br.Med.Bull.* **55**, 658-668
- AWAD J.A., MORROW J.D., HILL K.E., ROBERTS L.J., BURK R.F. (1994): Detection and localization of lipid peroxidation in selenium- and vitamin E-deficient rats using F2-isoprostanes. *J.Nutr.* **124**, 810-816
- AXLEY M.J., STADTMAN T.C. (1989): Selenium metabolism and selenium-dependent enzymes in microorganisms. *Annu.Rev.Nutr.* **9**, 127-137
- BATES J.M., SPATE V.L., MORRIS J.S., ST GERMAIN D.L., GALTON V.A. (2000): Effects of selenium deficiency on tissue selenium content, deiodinase activity, and thyroid hormone economy in the rat during development. *Endocrinology* **141**, 2490-2500
- BAUERSACHS S., KIRCHGESSNER M. (1992): Hematological parameters, selenium concentration and glutathione peroxidase activities in serum and the liver of rats at different selenium and vitamin E levels. *Z.Ernährungswiss.* **31**, 70-81

- BECK M.A., ESWORTHY R.S., HO Y.S., CHU F.F. (1998): Glutathione peroxidase protects mice from viral-induced myocarditis. *FASEB J.* **12**, 1143-1149
- BECKER K., GROMER S., SCHIRMER R.H., MÜLLER S. (2000): Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target. *Eur.J.Biochem.* **267**, 6118-6125
- BEHNE D., GESSNER H., KYRIAKOPOULOS A. (1996a): Information on the selenium status of several body compartments of rats from the selenium concentrations in blood fractions, hair and nails. *J.Trace Elem.Med.Biol.* **10**, 174-179
- BEHNE D., KYRIAKOPOEULOS A., WEISS-NOWAK C., KALCKLOESCH M., WESTPHAL C., GESSNER H. (1996b): Newly found selenium-containing proteins in the tissues of the rat. *Biol.Trace Elem.Res.* **55**, 99-110
- BEHNE D., WOLTERS W. (1983): Distribution of selenium and glutathione peroxidase in the rat. *J.Nutr.* **113**, 456-461
- BEHNIA R., MOLTENI A., WATERS C.M., PANOS R.J., WARD W.F., SCHNAPER H.W., TS'AO C.H. (1996): Early markers of ventilator-induced lung injury in rats. *Ann.Clin.Lab.Sci.* **26**, 437-450
- BEILSTEIN M.A., WHANGER P.D. (1986a): Chemical forms of selenium in rat tissues after administration of selenite or selenomethionine. *J.Nutr.* **116**, 1711-1719
- BEILSTEIN M.A., WHANGER P.D. (1986b): Deposition of dietary organic and inorganic selenium in rat erythrocyte proteins. *J.Nutr.* **116**, 1701-1710
- BERGGREN M.M., MANGIN J.F., GASDAKA J.R., POWIS G. (1999): Effect of selenium on rat thioredoxin reductase activity: increase by supranutritional selenium and decrease by selenium deficiency. *Biochem.Pharmacol.* **57**, 187-193
- BERLETT B.S., STADTMAN E.R. (1997): Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J.Biol.Chem.* **272**, 20313-20316
- BERMANO G., NICOL F., DYER J.A., SUNDE R.A., BECKETT G.J., ARTHUR J.R., HESKETH J.E. (1995): Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats. *Biochem.J.* **311**, 425-430
- BERRY M.J., MARTIN G.W., III, LOW S.C. (1997): RNA and protein requirements for eukaryotic selenoprotein synthesis. *Biomed.Enviro.Sci.* **10**, 182-189
- BJÖRNSTEDT M., HAMBERG M., KUMAR S., XUE J., HOLMGREN A. (1995a): Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocystine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols. *J.Biol.Chem.* **270**, 11761-11764
- BJÖRNSTEDT M., KUMAR S., HOLMGREN A. (1995b): Selenite and selenodiglutathione: reactions with thioredoxin systems. *Methods Enzymol.* **252**, 209-219
- BJÖRNSTEDT M., XUE J., HUANG W., AKESSON B., HOLMGREN A. (1994): The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J.Biol.Chem.* **269**, 29382-29384
- BOREK C., ONG A., MASON H., DONAHUE L., BIAGLOW J.E. (1986): Selenium and vitamin E inhibit radiogenic and chemically induced transformation in vitro via different mechanisms. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **83**, 1490-1494
- BOSCOBOINIK D., SZEWCZYK A., AZZI A. (1991): Alpha-tocopherol (vitamin E) regulates vascular smooth muscle cell proliferation and protein kinase C activity. *Arch.Biochem.Biophys.* **286**, 264-269
- BOUZYK E., IWANENKO T., JAROCIEWICZ N., KRUSZEWSKI M., SOCHANOWICZ B., SZUMIEL I. (1997): Antioxidant defense system in differentially hydrogen peroxide sensitive L5178Y sublines. *Free Radic.Biol.Med.* **22**, 697-704
- BOWTELL D.D. (1999): Options available - from start to finish - for obtaining expression data by microarray. *Nat.Genet.* **21**, 25-32
- BÖCK A., FORCHHAMMER K., HEIDER J., BARON C. (1991): Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. *Trends Biochem.Sci.* **16**, 463-467

- BÖSL M.R., TAKAKU K., OSHIMA M., NISHIMURA S., TAKETO M.M. (1997): Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (Trsp). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**, 5531-5534
- BRAY T.M., TAYLOR C.G. (1993): Tissue glutathione, nutrition, and oxidative stress. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* **71**, 746-751
- BRIGELIUS-FLOHÉ R. (1999): Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic.Biol.Med.* **27**, 951-965
- BRIGELIUS-FLOHÉ R., FRIEDRICHS B., MAURER S., SCHULTZ M., STREICHER R. (1997): Interleukin-1-induced nuclear factor kappa B activation is inhibited by overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in a human endothelial cell line. *Biochem.J.* **328**, 199-203
- BRIVIBA K., KLOTZ L.O., SIES H. (1999): Defenses against peroxynitrite. *Methods Enzymol.* **301**, 301-311
- BUCKINGHAM K.W. (1985): Effect of dietary polyunsaturated/saturated fatty acid ratio and dietary vitamin E on lipid peroxidation in the rat. *J.Nutr.* **115**, 1425-1435
- BUEGE J.A., AUST S.D. (1978): Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **52**, 302-310
- BUETLER T.M. (1998): Identification of glutathione S-transferase isozymes and gamma- glutamylcysteine synthetase as negative acute-phase proteins in rat liver. *Hepatology* **28**, 1551-1560
- BURGER H.J., SCHUETZ J.D., SCHUETZ E.G., GUZELIAN P.S. (1992): Paradoxical transcriptional activation of rat liver cytochrome P-450 3A1 by dexamethasone and the antigluco-corticoid pregnenolone 16 alpha- carbonitrile: analysis by transient transfection into primary monolayer cultures of adult rat hepatocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**, 2145-2149
- BURK R.F. (1983): Biological activity of selenium. *Annu.Rev.Nutr.* **3**, 53-70
- BURK R.F. (1987): Production of selenium deficiency in the rat. *Methods Enzymol.* **143**, 307-313
- BURK R.F., BROWN D.G., SEELY R.J., SCAIEF C.C., III (1972): Influence of dietary and injected selenium on whole-body retention, route of excretion, and tissue retention of ⁷⁵Se. *J.Nutr.* **102**, 1049-1055
- BURK R.F., HILL K.E. (1994): Selenoprotein P. A selenium-rich extracellular glycoprotein. *J.Nutr.* **124**, 1891-1897
- BURK R.F., HILL K.E. (1999): Orphan selenoproteins. *Bioessays* **21**, 231-237
- BURK R.F., HILL K.E., AWAD J.A., MORROW J.D., KATO T., COCKELL K.A., LYONS P.R. (1995): Pathogenesis of diquat-induced liver necrosis in selenium-deficient rats: assessment of the roles of lipid peroxidation and selenoprotein P. *Hepatology* **21**, 561-569
- BURK R.F., HILL K.E., BOEGLIN M.E., EBNER F.F., CHITTUM H.S. (1997): Selenoprotein P associates with endothelial cells in rat tissues. *Histochem.Cell.Biol.* **108**, 11-15
- BURTON G.W., INGOLD K.U. (1989): Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **570**, 7-22
- BUTTRISS J.L., DIPLOCK A.T. (1988): The alpha-tocopherol and phospholipid fatty acid content of rat liver subcellular membranes in vitamin E and selenium deficiency. *Biochim.Biophys.Acta* **963**, 61-69
- CAI J., HUANG Z.Z., LU S.C. (1997): Differential regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase heavy and light subunit gene expression. *Biochem.J.* **326**, 167-172
- CASES J., VACCHINA V., NAPOLITANO A., CAPORICCIO B., BESANCON P., LOBINSKI R., ROUANET J.M. (2001): Selenium from selenium-rich Spirulina is less bioavailable than selenium from sodium selenite and selenomethionine in selenium- deficient rats. *J.Nutr.* **131**, 2343-2350
- CASSO D., BEACH D. (1996): A mutation in a thioredoxin reductase homolog suppresses p53-induced growth inhibition in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol.Gen.Genet.* **252**, 518-529
- CELIS J.E., KRUIHOFFER M., GROMOVA I., FREDERIKSEN C., OSTERGAARD M., THYKJAER T., GROMOV P., YU J., PALSDOTTIR H., MAGNUSSON N., ORNTOFT T.F. (2000): Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. *FEBS Lett.* **480**, 2-16

- CHANG T.C., CHOU W.Y., CHANG G.G. (2000): Protein oxidation and turnover. *J.Biomed.Sci.* **7**, 357-363
- CHEESEMAN K.H. (1993): Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Mol.Aspects Med.* **14**, 191-197
- CHEN C.J., HUANG H.S., LIN S.B., CHANG W.C. (2000): Regulation of cyclooxygenase and 12-lipoxygenase catalysis by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in A431 cells. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* **62**, 261-268
- CHEN L.H., THACKER R.R. (1986): Vitamin C partially reversed some biochemical changes produced by vitamin E deficiency. *Biotechnol.Appl.Biochem.* **8**, 40-45
- CHENG W., FU Y.X., PORRES J.M., ROSS D.A., LEI X.G. (1999a): Selenium-dependent cellular glutathione peroxidase protects mice against a pro-oxidant-induced oxidation of NADPH, NADH, lipids, and protein. *FASEB J.* **13**, 1467-1475
- CHENG W.H., HO Y.S., ROSS D.A., HAN Y., COMBS G.F., Jr., LEI X.G. (1997a): Overexpression of cellular glutathione peroxidase does not affect expression of plasma glutathione peroxidase or phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mice offered diets adequate or deficient in selenium. *J.Nutr.* **127**, 675-680
- CHENG W.H., HO Y.S., ROSS D.A., VALENTINE B.A., COMBS G.F., LEI X.G. (1997b): Cellular glutathione peroxidase knockout mice express normal levels of selenium-dependent plasma and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases in various tissues. *J.Nutr.* **127**, 1445-1450
- CHENG W.H., VALENTINE B.A., LEI X.G. (1999b): High levels of dietary vitamin E do not replace cellular glutathione peroxidase in protecting mice from acute oxidative stress. *J.Nutr.* **129**, 1951-1957
- CHOI J.H., CHUNG W.J., HAN S.J., LEE H.B., CHOI I.W., LEE H.K., JANG K.Y., LEE D.G., HAN S.S., PARK K.H., IM S.Y. (2000): Selective involvement of reactive oxygen intermediates in platelet-activating factor-mediated activation of NF-kappaB. *Inflammation* **24**, 385-398
- CHOJKIER M., HOUGLUM K., LEE K.S., BUCK M. (1998): Long- and short-term D-alpha-tocopherol supplementation inhibits liver collagen alpha1(I) gene expression. *Am.J.Physiol.* **275**, G1480-G1485
- CHOW C.K. (1979): Effect of dietary selenium and vitamin E on the antioxidant defense systems of rat erythrocytes. *Int.J.Vitam.Nutr.Res.* **49**, 182-185
- CHOW C.K., TAPPEL A.L. (1974): Response of glutathione peroxidase to dietary selenium in rats. *J.Nutr.* **104**, 444-451
- CHRISTENSEN M.J., BURGNER K.W. (1992): Dietary selenium stabilizes glutathione peroxidase mRNA in rat liver. *J.Nutr.* **122**, 1620-1626
- CHRISTMAN J.W., BLACKWELL T.S., JUURLINK B.H. (2000): Redox regulation of nuclear factor kappa B: therapeutic potential for attenuating inflammatory responses. *Brain Pathol.* **10**, 153-162
- CHU F.F., ESWORTHY R.S. (1995): The expression of an intestinal form of glutathione peroxidase (GSHPx-GI) in rat intestinal epithelium. *Arch.Biochem.Biophys.* **323**, 288-294
- CHUBATSU L.S., MENEHINI R. (1993): Metallothionein protects DNA from oxidative damage. *Biochem.J.* **291**, 193-198
- CLARK L.C. (1985): The epidemiology of selenium and cancer. *Fed.Proc.* **44**, 2584-2589
- COHEN H.J., CHOVANIEC M.E., MISTRETTA D., BAKER S.S. (1985): Selenium repletion and glutathione peroxidase - differential effects on plasma and red blood cell enzyme activity. *Am.J.Clin.Nutr.* **41**, 735-747
- COHEN M.B., DUVEL D.L. (1988): Characterization of the inhibition of glutathione reductase and the recovery of enzyme activity in exponentially growing murine leukemia (L1210) cells treated with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Biochem.Pharmacol.* **37**, 3317-3320
- COHEN P., BOUABOULA M., BELLIS M., BARON V., JBILO O., POINOT-CHAZEL C., GALIEGUE S., HADIBI E.H., CASELLAS P. (2000): Monitoring cellular responses to *Listeria monocytogenes* with oligonucleotide arrays. *J.Biol.Chem.* **275**, 11181-11190
- COMBS G.F. (1999): Chemopreventive mechanisms of selenium. *Med.Klin.* **94**, 18-24

- COMBS G.F., COMBS S. (1986): *The role of selenium in nutrition*. Academic Press, Orlando
- COPELAND P.R., DRISCOLL D.M. (1999): Purification, redox sensitivity, and RNA binding properties of SECIS-binding protein 2, a protein involved in selenoprotein biosynthesis. *J.Biol.Chem.* **274**, 25447-25454
- CORT W.M., VICENTE T.S., WAYSEK E.H., WILLIAMS B.D. (1983): Vitamin E content of feedstuffs determined by high-performance liquid chromatographic fluorescence. *J.Agric.Food Chem.* **31**, 1330-1333
- COURSIN D.B., CIHLA H.P. (1996): Pulmonary effects of short term selenium deficiency. *Thorax* **51**, 479-483
- COWAN D.B., WEISEL R.D., WILLIAMS W.G., MICKLE D.A. (1993): Identification of oxygen responsive elements in the 5'-flanking region of the human glutathione peroxidase gene. *J.Biol.Chem.* **268**, 26904-26910
- DAVIS C.D., FENG Y., HEIN D.W., FINLEY J.W. (1999): The chemical form of selenium influences 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl- DNA adduct formation in rat colon. *J.Nutr.* **129**, 63-69
- DE HAAN J.B., BLADIER C., GRIFFITHS P., KELNER M., O'SHEA R.D., CHEUNG N.S., BRONSON R.T., SILVESTRO M.J., WILD S., ZHENG S.S., BEART P.M., HERTZOG P.J., KOLA I. (1998): Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress- inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J.Biol.Chem.* **273**, 22528-22536
- DENSON L.A., AULD K.L., SCHIEK D.S., MCCLURE M.H., MANGELSDORF D.J., KARPEN S.J. (2000): Interleukin-1beta suppresses retinoid transactivation of two hepatic transporter genes involved in bile formation. *J.Biol.Chem.* **275**, 8835-8843
- DERISI J.L., IYER V.R., BROWN P.O. (1997): Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**, 680-686
- DIZDAROGLU M. (1991): Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic.Biol.Med.* **10**, 225-242
- DRAKE J.R., FITCH C.D. (1980): Status of vitamin E as an erythropoietic factor. *Am.J.Clin.Nutr.* **33**, 2386-2393
- DREHER I., JAKOBS T.C., KÖHRLE J. (1997a): Cloning and characterization of the human selenoprotein P promoter. Response of selenoprotein P expression to cytokines in liver cells. *J.Biol.Chem.* **272**, 29364-29371
- DREHER I., SCHMUTZLER C., JAKOB F., KÖHRLE J. (1997b): Expression of selenoproteins in various rat and human tissues and cell lines. *J.Trace Elem.Med.Biol.* **11**, 83-91
- DRENT M., COBBEN N.A., HENDERSON R.F., WOUTERS E.F., DIEIJEN-VISSER M. (1996): Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation. *Eur.Respir.J.* **9**, 1736-1742
- DUTHIE S.J., COLLINS A.R., DUTHIE G.G., DOBSON V.L. (1997): Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human lymphocytes. *Mutat.Res.* **393**, 223-231
- EATON D.L., TOAL B.F. (1982): Evaluation of the Cd/hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **66**, 134-142
- EDER K., KRALIK A., KIRCHGESSNER M. (1995): Effect on metabolism of thyroid hormones in deficient to subtoxic selenium supply levels. *Z.Ernährungswiss.* **34**, 277-283
- EMONET-PICCARDI N., RICHARD M.J., RAVANAT J.L., SIGNORINI N., CADET J., BEANI J.C. (1998): Protective effects of antioxidants against UVA-induced DNA damage in human skin fibroblasts in culture. *Free Radic.Res.* **29**, 307-313
- EVANS H.M., BISHOP K.S. (1922): On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* **56**, 650-651

- EWAN R.C. (1976): Effect of selenium on rat growth, growth hormone and diet utilization. *J.Nutr.* **106**, 702-709
- FACTOR V.M., LASKOWSKA D., JENSEN M.R., WOITACH J.T., POPESCU N.C., THORGEIRSSON S.S. (2000): Vitamin E reduces chromosomal damage and inhibits hepatic tumor formation in a transgenic mouse model. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97**, 2196-2201
- FARRELL P.M., ROBERTS R.J. (1994): Vitamin E. In: *Modern nutrition in health and disease*. (eds. SHILS M.E., OLSON J.A., SHIKE M.) Lea and Febiger, Philadelphia, Baltimore, Hong Kong, London, Munich, Sydney, Tokyo, 326-341
- FECHNER H., SCHLAME M., GUTHMANN F., STEVENS P.A., RUSTOW B. (1998): alpha- and delta-tocopherol induce expression of hepatic alpha-tocopherol-transfer-protein mRNA. *Biochem.J.* **331**, 577-581
- FINKEL E. (2001): The mitochondrion: is it central to apoptosis? *Science* **292**, 624-626
- FLOHÉ L. (1997): Selenium in peroxide metabolism. *Med.Klin.* **92**, 5-7
- FLOHÉ L., ANDREESEN J.R., BRIGELIUS-FLOHÉ R., MAIORINO M., URSINI F. (2000): Selenium, the element of the moon, in life on earth. *IUBMB.Life* **49**, 411-420
- FLOHÉ L., BRIGELIUS-FLOHE R., SALIOU C., TRABER M.G., PACKER L. (1997): Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Radic.Biol.Med.* **22**, 1115-1126
- FLOHÉ L., GUNZLER W.A., SCHOCK H.H. (1973): Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* **32**, 132-134
- FLOYD R.A. (1990): The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* **11**, 1447-1450
- FOURY F., TALIBI D. (2001): Mitochondrial control of iron homeostasis. A genome wide analysis of gene expression in a yeast frataxin-deficient strain. *J.Biol.Chem.* **276**, 7762-7768
- FRAGA C.G., ARIAS R.F., LLESUY S.F., KOCH O.R., BOVERIS A. (1987): Effect of vitamin E- and selenium-deficiency on rat liver chemiluminescence. *Biochem.J.* **242**, 383-386
- FRAGA C.G., LEIBOVITZ B.E., TAPPEL A.L. (1988): Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radic.Biol.Med.* **4**, 155-161
- FRANKEL E.N., HU M.L., TAPPEL A.L. (1989): Rapid headspace gas chromatography of hexanal as a measure of lipid peroxidation in biological samples. *Lipids* **24**, 976-981
- FRANKEN N.A., STROOTMAN E., HOLLAAR L., VAN DER L.A., WONDERGEM J. (2000): Myocardial enzyme activities in plasma after whole-heart irradiation in rats. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* **126**, 27-32
- FUCHS J., ZOLLNER T.M., KAUFMANN R., PODDA M. (2001): Redox-modulated pathways in inflammatory skin diseases. *Free Radic.Biol.Med.* **30**, 337-353
- GALLEGOS A., BERGGREN M., GASDASKA J.R., POWIS G. (1997): Mechanisms of the regulation of thioredoxin reductase activity in cancer cells by the chemopreventive agent selenium. *Cancer Res.* **57**, 4965-4970
- GANTHER H.E. (1999): Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis* **20**, 1657-1666
- GANTHER H.E., KRAUS R.J. (1984): Oxidation states of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **107**, 593-602
- GASDASKA P.Y., BERGGREN M.M., BERRY M.J., POWIS G. (1999): Cloning, sequencing and functional expression of a novel human thioredoxin reductase. *FEBS Lett.* **442**, 105-111
- GEBEL S., MÜLLER T. (2001): The activity of NF-kappaB in Swiss 3T3 cells exposed to aqueous extracts of cigarette smoke is dependent on thioredoxin. *Toxicol.Sci.* **59**, 75-81
- GEISS G.K., BUMGARNER R.E., AN M.C., AGY M.B., 'T WOUT A.B., HAMMERSMARK E., CARTER V.S., UPCHURCH D., MULLINS J.I., KATZE M.G. (2000): Large-scale monitoring of host cell gene expression during HIV-1 infection using cDNA microarrays. *Virology* **266**, 8-16

- GERHOLD D., RUSHMORE T., CASKEY C.T. (1999): DNA chips: promising toys have become powerful tools. *Trends Biochem.Sci.* **24**, 168-173
- GISSEL H., CLAUSEN T. (2001): Excitation-induced Ca²⁺ influx and skeletal muscle cell damage. *Acta Physiol.Scand.* **171**, 327-334
- GLADYSHEV V.N., HATFIELD D.L. (1999): Selenocysteine-containing proteins in mammals. *J.Biomed.Sci.* **6**, 151-160
- GLADYSHEV V.N., JEANG K.T., STADTMAN T.C. (1996): Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**, 6146-6151
- GRIFFITH O.W. (1999): Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic.Biol.Med.* **27**, 922-935
- GROMADZINSKA J., SKLODOWSKA M., WASOWICZ W. (1988): Glutathione peroxidase activity, lipid peroxides and selenium concentration in various rat organs. *Biomed.Biochim.Acta* **47**, 19-24
- GROMER S., ARSCOTT L.D., WILLIAMS C.H., Jr., SCHIRMER R.H., BECKER K. (1998): Human placenta thioredoxin reductase. Isolation of the selenoenzyme, steady state kinetics, and inhibition by therapeutic gold compounds. *J.Biol.Chem.* **273**, 20096-20101
- GROSS C., KELLEHER M., IYER V.R., BROWN P.O., WINGE D.R. (2000): Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. *J.Biol.Chem.* **275**, 32310-32316
- GU Q.P., SUN Y., REAM L.W., WHANGER P.D. (2000): Selenoprotein W accumulates primarily in primate skeletal muscle, heart, brain and tongue. *Mol.Cell Biochem.* **204**, 49-56
- GUIMARAES M.J., PETERSON D., VICARI A., COCKS B.G., COPELAND N.G., GILBERT D.J., JENKINS N.A., FERRICK D.A., KASTELEIN R.A., BAZAN J.F., ZLOTNIK A. (1996): Identification of a novel seld homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism? *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**, 15086-15091
- GÜNTHER R., HÖLLRIEGL V., VORMANN J., BUBECK J., CLASSEN H.G. (1994): Increased lipid peroxidation in rat tissues by magnesium deficiency and vitamin E depletion. *Mg Bull.* **16**, 38-42
- HABIG W.H., JAKOBY W.B. (1981): Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol.* **77**, 398-405
- HACIA J.G. (1999): Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nat.Genet.* **21**, 42-47
- HAFEMAN D.G., HOEKSTRA W.G. (1977): Lipid peroxidation in vivo during vitamin E and selenium deficiency in the rat as monitored by ethane evolution. *J.Nutr.* **107**, 666-672
- HAKKARAINEN J., TYOPPONEN J., JONSSON L. (1986): Vitamin E requirement of the growing rat during selenium deficiency with special reference to selenium dependent- and selenium independent- glutathione peroxidase. *Zentralbl.Veterinärmed.A.* **33**, 247-258
- HALLIWELL B. (2000): Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *Am.J.Clin.Nutr.* **72**, 1082-1087
- HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M. (1989): *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford
- HALPNER A.D., HANDELMAN G.J., HARRIS J.M., BELMONT C.A., BLUMBERG J.B. (1998): Protection by vitamin C of loss of vitamin E in cultured rat hepatocytes. *Arch.Biochem.Biophys.* **359**, 305-309
- HASSOUN B.S., PALMER I.S., DWIVEDI C. (1995): Selenium detoxification by methylation. *Res.Commun.Mol.Pathol.Pharmacol.* **90**, 133-142
- HAYASHI T., UENO Y., OKAMOTO T. (1993): Oxidoreductive regulation of nuclear factor kappa B. Involvement of a cellular reducing catalyst thioredoxin. *J.Biol.Chem.* **268**, 11380-11388
- HELMBRECHT K., RENSING L. (1999): Different constitutive heat shock protein 70 expression during proliferation and differentiation of rat C6 glioma cells. *Neurochem.Res.* **24**, 1293-1299

- HIDALGO J., CAMPMANY L., BORRAS M., GARVEY J.S., ARMARIO A. (1988): Metallothionein response to stress in rats: role in free radical scavenging. *Am.J.Physiol.* **255**, E518-E524
- HILL K.E., BURK R.F. (1982): Effect of selenium deficiency and vitamin E deficiency on glutathione metabolism in isolated rat hepatocytes. *J.Biol.Chem.* **257**, 10668-10672
- HILL K.E., BURK R.F. (1985): Effect of selenium deficiency on the disposition of plasma glutathione. *Arch.Biochem.Biophys.* **240**, 166-171
- HILL K.E., BURK R.F. (1997): Selenoprotein P: recent studies in rats and in humans. *Biomed.Enviro.Sci.* **10**, 198-208
- HILL K.E., BURK R.F., LANE J.M. (1987): Effect of selenium depletion and repletion on plasma glutathione and glutathione-dependent enzymes in the rat. *J.Nutr.* **117**, 99-104
- HILL K.E., MCCOLLUM G.W., BOEGLIN M.E., BURK R.F. (1997): Thioredoxin reductase activity is decreased by selenium deficiency. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **234**, 293-295
- HO C.T., CHAN A.C. (1992): Regeneration of vitamin E in rat polymorphonuclear leucocytes. *FEBS Lett.* **306**, 269-272
- HONG C.B., CHOW C.K. (1988): Induction of eosinophilic enteritis and eosinophilia in rats by vitamin E and selenium deficiency. *Exp.Mol.Pathol.* **48**, 182-192
- HÖHFELD J., MINAMI Y., HARTL F.U. (1995): Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell* **83**, 589-598
- HU M.L., CHUNG C., SPALLHOLZ J.E. (1984): Hematologic data of selenium-deficient and selenium-supplemented rats. *J.Inorg.Biochem.* **22**, 165-173
- HU W.L., GOLDRING C.E., RAO N.R., RICE-EVANS C., BURDON R.H., DIPLOCK A.T. (1992): Variable alpha-tocopherol stimulation and protection of glutathione peroxidase activity in established and malignant fibroblasts. *Biofactors* **4**, 47-49
- HUANG H.S., CHEN C.J., SUZUKI H., YAMAMOTO S., CHANG W.C. (1999): Inhibitory effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase on the activity of lipoxigenases and cyclooxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **58**, 65-75
- IP C. (1998): Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. *J.Nutr.* **128**, 1845-1854
- JAKOBS T.C., SCHMUTZLER C., MEISSNER J., KÖHRLE J. (1997): The promoter of the human type I 5'-deiodinase gene - mapping of the transcription start site and identification of a DR+4 thyroid-hormone-responsive element. *Eur.J.Biochem.* **247**, 288-297
- JANSSEN Y.M., VAN HOUTEN B., BORM P.J., MOSSMAN B.T. (1993): Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab.Invest.* **69**, 261-274
- JENKINSON A.M., COLLINS A.R., DUTHIE S.J., WAHLE K.W., DUTHIE G.G. (1999): The effect of increased intakes of polyunsaturated fatty acids and vitamin E on DNA damage in human lymphocytes. *FASEB J.* **13**, 2138-2142
- JENKINSON S.G., SPENCE T.H., Jr., LAWRENCE R.A., HILL K.E., DUNCAN C.A., JOHNSON K.H. (1987): Rat lung glutathione release: response to oxidative stress and selenium deficiency. *J.Appl.Physiol.* **62**, 55-60
- JONNALAGADDA S.B., RAO P.V. (1993): Toxicity, bioavailability and metal speciation. *Comp.Biochem.Physiol.C.* **106**, 585-595
- KALYANARAMAN B., KAROUI H., SINGH R.J., FELIX C.C. (1996): Detection of thiyl radical adducts formed during hydroxyl radical- and peroxy-nitrite-mediated oxidation of thiols - a high resolution ESR spin-trapping study at Q-band (35 GHz). *Anal.Biochem.* **241**, 75-81
- KAYANOKI Y., FUJII J., ISLAM K.N., SUZUKI K., KAWATA S., MATSUZAWA Y., TANIGUCHI N. (1996): The protective role of glutathione peroxidase in apoptosis induced by reactive oxygen species. *J.Biochem.* **119**, 817-822
- KENDALL S.D., CHRISTENSEN M.J. (1997): Selenium deficiency decreases expression of the genes for transthyretin and citrate transport protein in rat liver. *Nutr.Res.* **17**, 351-362

- KIM C.H., YASUMOTO K., SUZUKI T., YOSHIDA M. (1988): tert-butyl hydroperoxide-induced hemolysis of alpha-tocopherol- decreased erythrocytes from selenium-deficient and selenium-adequate rats. *J.Nutr.Sci.Vitaminol.* **34**, 481-490
- KÖHRLE J. (2000): The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cell Mol.Life Sci.* **57**, 1853-1863
- KÖHRLE J., BRIGELIUS-FLOHÉ R., BÖCK A., GARTNER R., MEYER O., FLOHÉ L. (2000): Selenium in biology: facts and medical perspectives. *Biol.Chem.* **381**, 849-864
- KRETZ-REMY C., MEHLEN P., MIRALTO M.E., ARRIGO A.P. (1996): Inhibition of I kappa B-alpha phosphorylation and degradation and subsequent NF-kappa B activation by glutathione peroxidase overexpression. *J.Cell Biol.* **133**, 1083-1093
- KUBOTA H., YOKOTA S., YANAGI H., YURA T. (2000): Transcriptional regulation of the mouse cytosolic chaperonin subunit gene Ccta/t-complex polypeptide 1 by selenocysteine tRNA gene transcription activating factor family zinc finger proteins. *J.Biol.Chem.* **275**, 28641-28648
- KUDRIN A.V. (2000): Trace elements in regulation of NF-kappaB activity. *J.Trace Elem.Med.Biol.* **14**, 129-142
- KURIAN K.M., WATSON C.J., WYLLIE A.H. (1999): DNA chip technology. *J.Pathol.* **187**, 267-271
- LAURENT A., PERDU-DURAND E., ALARY J., DEBRAUWER L., CRAVEDI J.P. (2000): Metabolism of 4-hydroxynonenal, a cytotoxic product of lipid peroxidation in rat precision-cut liver slices. *Toxicol.Lett.* **114**, 203-214
- LAWRENCE R.A., BURK R.F. (1976): Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **71**, 952-958
- LAWRENCE R.A., PARKHILL L.K., BURK R.F. (1978): Hepatic cytosolic non selenium-dependent glutathione peroxidase activity: its nature and the effect of selenium deficiency. *J.Nutr.* **108**, 981-987
- LAWSON T., BIRT D.F. (1983): Enhancement of the repair of carcinogen-induced DNA damage in the hamster pancreas by dietary selenium. *Chem.Biol.Interact.* **45**, 95-104
- LEE C.K., KLOPP R.G., WEINDRUCH R., PROLLA T.A. (1999): Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* **285**, 1390-1393
- LEE S.R., KIM J.R., KWON K.S., YOON H.W., LEVINE R.L., GINSBURG A., RHEE S.G. (1999): Molecular cloning and characterization of a mitochondrial selenocysteine-containing thioredoxin reductase from rat liver. *J.Biol.Chem.* **274**, 4722-4734
- LEI X.G. (2001): Glutathione peroxidase-1 gene knockout on body antioxidant defense in mice. *Biofactors* **14**, 93-99
- LEI X.G., DANN H.M., ROSS D.A., CHENG W.H., COMBS G.F., RONEKER K.R. (1998): Dietary selenium supplementation is required to support full expression of three selenium-dependent glutathione peroxidases in various tissues of weanling pigs. *J.Nutr.* **128**, 130-135
- LEI X.G., EVENSON J.K., THOMPSON K.M., SUNDE R.A. (1995): Glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase are differentially regulated in rats by dietary selenium. *J.Nutr.* **125**, 1438-1446
- LI R.K., COWAN D.B., MICKLE D.A., WEISEL R.D., BURTON G.W. (1996): Effect of vitamin E on human glutathione peroxidase (GSH-PX1) expression in cardiomyocytes. *Free Radic.Biol.Med.* **21**, 419-426
- LI X., HILL K.E., BURK R.F., MAY J.M. (2001): Selenium spares ascorbate and alpha-tocopherol in cultured liver cell lines under oxidant stress. *FEBS Lett.* **508**, 489-492
- LII C.K., HENDRICH S. (1993): Selenium deficiency suppresses the S-glutathiolation of carbonic anhydrase III in rat hepatocytes under oxidative stress. *J.Nutr.* **123**, 1480-1486
- LISTON P., LEFEBVRE C., FONG W.G., XUAN J.Y., KORNELUK R.G. (1997): Genomic characterization of the mouse inhibitor of apoptosis protein 1 and 2 genes. *Genomics* **46**, 495-503
- LIU C., RANGNEKAR V.M., ADAMSON E., MERCOLA D. (1998): Suppression of growth and transformation and induction of apoptosis by EGR-1. *Cancer Gene Ther.* **5**, 3-28

- LIU J., YEO H.C., OVERVIK-DOUKI E., HAGEN T., DONIGER S.J., CHU D.W., BROOKS G.A., AMES B.N. (2000): Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J.Appl.Physiol.* **89**, 21-28
- LIU J.Z., ZHANG B.Z., MILNER J.A. (1994): Dietary selenite modifies glutathione metabolism and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene conjugation in rats. *J.Nutr.* **124**, 172-180
- LIU S.L., DEGLI E.S., YAO T., DIEHL A.M., ZERN M.A. (1995): Vitamin E therapy of acute CCl₄-induced hepatic injury in mice is associated with inhibition of nuclear factor kappa B binding. *Hepatology* **22**, 1474-1481
- LOFT S., DENG X.S., TUO J., WELLEJUS A., SORENSEN M., POULSEN H.E. (1998): Experimental study of oxidative DNA damage. *Free Radic.Res.* **29**, 525-539
- LOW S.C., BERRY M.J. (1996): Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes. *Trends Biochem.Sci.* **21**, 203-208
- LOW S.C., HARNEY J.W., BERRY M.J. (1995): Cloning and functional characterization of human selenophosphate synthetase, an essential component of selenoprotein synthesis. *J.Biol.Chem.* **270**, 21659-21664
- LU T., LIU J., LECLUYSE E.L., ZHOU Y.S., CHENG M.L., WAALKES M.P. (2001): Application of cDNA microarray to the study of arsenic-induced liver diseases in the population of Guizhou, China. *Toxicol.Sci.* **59**, 185-192
- LUPERCHIO S., TAMIR S., TANNENBAUM S.R. (1996): No-induced oxidative stress and glutathione metabolism in rodent and human cells. *Free Radic.Biol.Med.* **21**, 513-519
- MACHLIN L.J. (1984): *Handbook of Vitamins. Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects.* Marcel Dekker, New York, Basel
- MACKENZIE P.I., MOJARRABI B., MEECH R., HANSEN A. (1996): Steroid UDP glucuronosyltransferases: characterization and regulation. *J.Endocrinol.* **150**, S79-S86
- MAIORINO M., COASSIN M., ROVERI A., URSINI F. (1989): Microsomal lipid peroxidation: effect of vitamin E and its functional interaction with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Lipids* **24**, 721-726
- MANSELL J.B., BERRY M.J. (2001): Towards a mechanism for selenocysteine incorporation in eukaryotes. In: *Selenium. Its molecular biology and role in human health.* (ed. HATFIELD D.L.) Kluwer Academic Publishers, Boston; Dordrecht; London, 69-80
- MANUEL Y., THOMAS Y., PELLEGRINI O. (1992): Metallothionein and tissue damage. *IARC Sci.Publ.* 231-237
- MARKANT A., PALLAUF J. (1996): Metallothionein and zinc as potential antioxidants in radical-induced lipid peroxidation in cultured hepatocytes. *J.Trace Elem.Med.Biol.* **10**, 88-95
- MARTIN A., FOXALL T., BLUMBERG J.B., MEYDANI M. (1997): Vitamin E inhibits low-density lipoprotein-induced adhesion of monocytes to human aortic endothelial cells in vitro. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **17**, 429-436
- MATSUDA A., KIMURA M., ITOKAWA Y. (1998): Influence of selenium deficiency on vital functions in rats. *Biol.Trace Elem.Res.* **61**, 287-301
- MATSUI M., OSHIMA M., OSHIMA H., TAKAKU K., MARUYAMA T., YODOI J., TAKETO M.M. (1996): Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev.Biol.* **178**, 179-185
- MAY J.M., COBB C.E., MENDIRATTA S., HILL K.E., BURK R.F. (1998): Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. *J.Biol.Chem.* **273**, 23039-23045
- MAY J.M., MENDIRATTA S., HILL K.E., BURK R.F. (1997): Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase. *J.Biol.Chem.* **272**, 22607-22610
- MCKENZIE R.C., RAFFERTY T.S., BECKETT G.J. (1998): Selenium: an essential element for immune function. *Immunol.Today* **19**, 342-345

- MEINHOLD H., CAMPOS-BARROS A., WALZOG B., KOHLER R., MULLER F., BEHNE D. (1993): Effects of selenium and iodine deficiency on type I, type II and type III iodothyronine deiodinases and circulating thyroid hormones in the rat. *Exp.Clin.Endocrinol.* **101**, 87-93
- MILLER R.E., HACKENBERG R., GERSHMAN H. (1978): Regulation of glutamine synthetase in cultured 3T3-L1 cells by insulin, hydrocortisone, and dibutyryl cyclic AMP. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **75**, 1418-1422
- MILNER J.A. (1986): Inhibition of chemical carcinogenesis and tumorigenesis by selenium. *Adv.Exp.Med.Biol.* **206**, 449-463
- MORADPOUR D., BLUM H.E. (1999): DNA chip technology. *Dtsch.Med.Wochenschr.* **124**, 1395-1396
- MOSTERT V. (2000): Selenoprotein P: properties, functions, and regulation. *Arch.Biochem.Biophys.* **376**, 433-438
- MUSTACICH D., POWIS G. (2000): Thioredoxin reductase. *Biochem.J.* **346**, 1-8
- MÜLLER A. (2000): Untersuchungen zur ernährungsphysiologischen Funktion von Selen und Vitamin E beim Kaninchen. Diss. oec. troph. JLU Gießen, Logos Verlag, Berlin
- MÜLLER A.S., PALLAUF J. (2002): Downregulation of GPx1 mRNA and the loss of GPx1 activity causes cellular damage in the liver of selenium deficient rabbits. *J.Anim.Physiol.a.Anim.Nutr.* **86**, in press
- MÜLLER G., FRUHAUF A., MATHIAS B. (1986): Thiobarbituric acid positive substances as indicators of lipid peroxidation. *Z.Gesamte Inn.Med.* **41**, 673-676
- MYKKANEN H.M., WASSERMAN R.H. (1989): Uptake of ⁷⁵Se-selenite by brush border membrane vesicles from chick duodenum stimulated by vitamin D. *J.Nutr.* **119**, 242-247
- MYKKANEN H.M., WASSERMAN R.H. (1990): Relationship of membrane-bound sulfhydryl groups to vitamin D-stimulated uptake of [⁷⁵Se]Selenite by the brush border membrane vesicles from chick duodenum. *J.Nutr.* **120**, 882-888
- NAHAPETIAN A.T., JANGHORBANI M., YOUNG V.R. (1983): Urinary trimethylselenonium excretion by the rat: effect of level and source of selenium-75. *J.Nutr.* **113**, 401-411
- NAKASHIMA T., SEKIGUCHI T., KURAOKA A., FUKUSHIMA K., SHIBATA Y., KOMIYAMA S., NISHIMOTO T. (1993): Molecular cloning of a human cDNA encoding a novel protein, DAD1, whose defect causes apoptotic cell death in hamster BHK21 cells. *Mol.Cell Biol.* **13**, 6367-6374
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1995): *Nutrient requirements of Laboratory Animals*. National Academy Press, Washington
- NAUMANN C., BASSLER R. (1997): *Methodenbuch Band III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln, 4. Ergänzungslieferung*. VDLUFA-Verlag, Darmstadt
- NAVARRO F., NAVAS P., BURGESS J.R., BELLO R.I., DE CABO R., ARROYO A., VILLALBA J.M. (1998): Vitamin E and selenium deficiency induces expression of the ubiquinone- dependent antioxidant system at the plasma membrane. *FASEB J.* **12**, 1665-1673
- NEVE J. (1991): Physiological and nutritional importance of selenium. *Experientia* **47**, 187-193
- OKUNO T., KUBOTA T., KURODA T., UENO H., NAKAMURO K. (2001): Contribution of enzymic alpha,gamma-elimination reaction in detoxification pathway of selenomethionine in mouse liver. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **176**, 18-23
- OLSSON U., LUNDGREN B., SEGURA-AGUILAR J., MESSING-ERIKSSON A., ANDERSSON K., BECEDAS L., DE PIERRE J.W. (1993): Effects of selenium deficiency on xenobiotic-metabolizing and other enzymes in rat liver. *Int.J.Vitam.Nutr.Res.* **63**, 31-37
- ORRENIUS S. (1993): Mechanisms of oxidative cell damage. In: *Free radicals: from basic science to medicine*. (eds. POLI G., ALBANO E., DIANZANI M.U.) Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 47-50
- OSTER O., SCHMIEDEL G., PRELLWITZ W. (1988): Correlations of blood selenium with hematological parameters in West German adults. *Biol.Trace Elem.Res.* **15**, 47-81

- PACKER L., LANDVIK S. (1989): Vitamin E: introduction to biochemistry and health benefits. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **570**, 1-6
- PACKER L., WEBER S.U., RIMBACH G. (2001): Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *J.Nutr.* **131**, 369S-373S
- PACKHAM G., ASHMUN R.A., CLEVELAND J.L. (1996): Cytokines suppress apoptosis independent of increases in reactive oxygen levels. *J.Immunol.* **156**, 2792-2800
- PAGES G., ROUAYRENC J.F., LE CAM G., MARILLER M., LE CAM A. (1990): Molecular characterization of three rat liver serine-protease inhibitors affected by inflammation and hypophysectomy. Protein and mRNA analysis and cDNA cloning. *Eur.J.Biochem.* **190**, 385-391
- PARK H.S., HUH S.H., KIM Y., SHIM J., LEE S.H., PARK I.S., JUNG Y.K., KIM I.Y., CHOI E.J. (2000): Selenite negatively regulates caspase-3 through a redox mechanism. *J.Biol.Chem.* **275**, 8487-8491
- PAZAK H.E., SCHOLZ R.W. (1996): Effects of maternal vitamin E and selenium status during the perinatal period on age-related changes in tissue concentration of vitamin E in rat pups. *Int.J.Vitam.Nutr.Res.* **66**, 126-133
- PENCE B.C., DELVER E., DUNN D.M. (1994): Effects of dietary selenium on UVB-induced skin carcinogenesis and epidermal antioxidant status. *J.Invest.Dermatol.* **102**, 759-761
- POSAS F., CHAMBERS J.R., HEYMAN J.A., HOFFLER J.P., DE NADAL E., ARINO J. (2000): The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol.Chem* **275**, 17249-17255
- POULSEN H.E., JENSEN B.R., WEIMANN A., JENSEN S.A., SORENSEN M., LOFT S. (2000): Antioxidants, DNA damage and gene expression. *Free Radic.Res.* **33**, S33-S39
- RAFIQUE R., SCHAPIRA A.H., COOPER J.M. (2001): Sensitivity of respiratory chain activities to lipid peroxidation: effect of vitamin E deficiency. *Biochem.J* **357**, 887-892
- RAISANEN S.R., LEHENKARI P., TASANEN M., RAHKILA P., HARKONEN P.L., VAANANEN H.K. (1999): Carbonic anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis. *FASEB J.* **13**, 513-522
- RAJAN V., CHAPMAN K.E., LYONS V., JAMIESON P., MULLINS J.J., EDWARDS C.R., SECKL J.R. (1995): Cloning, sequencing and tissue-distribution of mouse 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase-1 cDNA. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **52**, 141-147
- RAO L., PUSCHNER B., PROLLA T.A. (2001): 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.* **131**, 3175-3181
- READ R., BELLEW T., YANG J.G., HILL K.E., PALMER I.S., BURK R.F. (1990): Selenium and amino acid composition of selenoprotein P, the major selenoprotein in rat serum. *J.Biol.Chem.* **265**, 17899-17905
- REDDY K., TAPPEL A.L. (1974): Effect of dietary selenium and autoxidized lipids on the glutathione peroxidase system of gastrointestinal tract and other tissues in the rat. *J.Nutr.* **104**, 1069-1078
- REDDY V.N., LIN L.R., HO Y.S., MAGNENAT J.L., IBARAKI N., GIBLIN F.J., DANG L. (1997): Peroxide-induced damage in lenses of transgenic mice with deficient and elevated levels of glutathione peroxidase. *Ophthalmologica* **211**, 192-200
- REEVES P.G., NIELSEN F.H., FAHEY G.C., Jr. (1993): AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J.Nutr.* **123**, 1939-1951
- REITER R., WENDEL A. (1984): Selenium and drug metabolism-II. Independence of glutathione peroxidase and reversibility of hepatic enzyme modulations in deficient mice. *Biochem.Pharmacol.* **33**, 1923-1928
- REZNICK A.Z., PACKER L. (1994): Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* **233**, 357-363
- RICCIARELLI R., MARONI P., OZER N., ZINGG J.M., AZZI A. (1999): Age-dependent increase of collagenase expression can be reduced by alpha-tocopherol via protein kinase C inhibition. *Free Radic.Biol.Med.* **27**, 729-737

- RICCIARELLI R., TASINATO A., CLEMENT S., OZER N.K., BOSCOBOINIK D., AZZI A. (1998): alpha-Tocopherol specifically inactivates cellular protein kinase C alpha by changing its phosphorylation state. *Biochem.J.* **334**, 243-249
- RICCIARELLI R., ZINGG J.M., AZZI A. (2000): Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells. *Circulation* **102**, 82-87
- ROCKETT J.C., DIX D.J. (2000): DNA arrays: technology, options and toxicological applications. *Xenobiotica* **30**, 155-177
- ROSSER B.G., GORES G.J. (1995): Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* **108**, 252-275
- ROTRUCK J.T., POPE A.L., GANTHER H.E., SWANSON A.B., HAFEMAN D.G., HOEKSTRA W.G. (1973): Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* **179**, 588-590
- ROY M., KIREMIDJIAN-SCHUMACHER L., WISHE H.I., COHEN M.W., STOTZKY G. (1994): Supplementation with selenium and human immune cell functions. I. Effect on lymphocyte proliferation and interleukin 2 receptor expression. *Biol.Trace Elem.Res.* **41**, 103-114
- RUEF J., MOSER M., BODE C., KUBLER W., RUNGE M.S. (2001): 4-hydroxynonenal induces apoptosis, NF-kappaB-activation and formation of 8-isoprostane in vascular smooth muscle cells. *Basic Res.Cardiol.* **96**, 143-150
- SAITO Y., HAYASHI T., TANAKA A., WATANABE Y., SUZUKI M., SAITO E., TAKAHASHI K. (1999): Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein P. *J.Biol.Chem.* **274**, 2866-2871
- SALDEEN J. (2000): Cytokines induce both necrosis and apoptosis via a common Bcl-2- inhibitable pathway in rat insulin-producing cells. *Endocrinology* **141**, 2003-2010
- SANDSTROM P.A., ROBERTS B., FOLKS T.M., BUTTKE T.M. (1993): HIV gene expression enhances T cell susceptibility to hydrogen peroxide- induced apoptosis. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **9**, 1107-1113
- SANDSTROM P.A., TEBBEY P.W., VAN CLEAVE S., BUTTKE T.M. (1994): Lipid hydroperoxides induce apoptosis in T cells displaying a HIV- associated glutathione peroxidase deficiency. *J.Biol.Chem.* **269**, 798-801
- SATO M., BREMNER I. (1993): Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic.Biol.Med.* **14**, 325-337
- SATO M., SASAKI M., HOJO H. (1995): Antioxidative roles of metallothionein and manganese superoxide dismutase induced by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6. *Arch.Biochem.Biophys.* **316**, 738-744
- SCHENA M., SHALON D., DAVIS R.W., BROWN P.O. (1995): Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-470
- SCHENK H., KLEIN M., ERDBRUGGER W., DROGE W., SCHULZE-OSTHOFF K. (1994): Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**, 1672-1676
- SCHMUTZLER C., BRTKO J., WINZER R., JAKOBS T.C., MEISSNER-WEIGL J., SIMON D., GORETZKI P.E., KOHRLE J. (1998): Functional retinoid and thyroid hormone receptors in human thyroid- carcinoma cell lines and tissues. *Int.J.Cancer* **76**, 368-376
- SCHNURR K., BELKNER J., URSINI F., SCHEWE T., KUHN H. (1996): The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase controls the activity of the 15-lipoxygenase with complex substrates and preserves the specificity of the oxygenation products. *J.Biol.Chem* **271**, 4653-4658
- SCHNURR K., BORCHERT A., KUHN H. (1999): Inverse regulation of lipid-peroxidizing and hydroperoxyl lipid- reducing enzymes by interleukins 4 and 13. *FASEB J.* **13**, 143-154
- SCHOLZ R.W., MINICUCCI L.A., REDDY C.C. (1997): Effects of vitamin E and selenium on antioxidant defense in rat heart. *Biochem.Mol.Biol.Int.* **42**, 997-1006

- SCHRECK R., RIEBER P., BAEUERLE P.A. (1991): Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* **10**, 2247-2258
- SCHREIBER G., TSYKIN A., ALDRED A.R., THOMAS T., FUNG W.P., DICKSON P.W., COLE T., BIRCH H., DE JONG F.A., MILLAND J. (1989): The acute phase response in the rodent. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **557**, 61-85
- SCHÜTZE N., BACHTHALER M., LECHNER A., KÖHRLE J., JAKOB F. (1998): Identification by differential display PCR of the selenoprotein thioredoxin reductase as a 1 alpha,25(OH)₂-vitamin D₃-responsive gene in human osteoblasts - regulation by selenite. *Biofactors* **7**, 299-310
- SCHÜTZE N., FRITSCHKE J., EBERT-DUMIG R., SCHNEIDER D., KÖHRLE J., ANDREESEN R., KREUTZ M., JAKOB F. (1999): The selenoprotein thioredoxin reductase is expressed in peripheral blood monocytes and THP1 human myeloid leukemia cells - regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and selenite. *Biofactors* **10**, 329-338
- SCHWARZ K., FOLTZ C.M. (1957): Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J.Am.Chem.Soc.* **79**, 3292-3293
- SEN C.K., PACKER L. (1996): Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* **10**, 709-720
- SEVANIAN A., HOCHSTEIN P. (1985): Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annu.Rev.Nutr.* **5**, 365-390
- SHAN X.Q., AW T.Y., JONES D.P. (1990): Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol.Ther.* **47**, 61-71
- SHIOBARA Y., SUZUKI K.T. (1998): Binding of selenium (administered as selenite) to albumin after efflux from red blood cells. *J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl.* **710**, 49-56
- SIDDONS R.C., MILLS C.F. (1981): Glutathione peroxidase activity and erythrocyte stability in calves differing in selenium and vitamin E status. *Br.J.Nutr.* **46**, 345-355
- SIES H. (1989): Biochemistry of thiol groups: the role of glutathione. *Naturwissenschaften* **76**, 57-64
- SIES H. (1991): Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am.J.Med.* **91**, 31S-38S
- SIES H. (1999): Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic.Biol.Med.* **27**, 916-921
- SIES H., STAHL W. (1995): Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am.J.Clin.Nutr.* **62**, 1315S-1321S
- SINGH N.P., MCCOY M.T., TICE R.R., SCHNEIDER E.L. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp.Cell Res.* **175**, 184-191
- SINHA R., MEDINA D. (1997): Inhibition of cdk2 kinase activity by methylselenocysteine in synchronized mouse mammary epithelial tumor cells. *Carcinogenesis* **18**, 1541-1547
- SMITH W.L., LANDS W.E. (1972): Oxygenation of polyunsaturated fatty acids during prostaglandin biosynthesis by sheep vesicular gland. *Biochemistry* **11**, 3276-3285
- SOUTHERN E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* **98**, 503-517
- SPALLHOLZ J.E. (1997): Free radical generation by selenium compounds and their prooxidant toxicity. *Biomed.Enviro.Sci.* **10**, 260-270
- STANGL G.I., NOSTELBACHER K., EDER K., KIRCHGESSNER M. (2000): Chronic vitamin E inadequacy and thermally treated oils affect the synthesis of hepatic metallothionein isoforms. *Eur.J.Nutr.* **39**, 112-120
- STOCKER A., ZIMMER S., SPYCHER S.E., AZZI A. (1999): Identification of a novel cytosolic tocopherol-binding protein: structure, specificity, and tissue distribution. *IUBMB.Life* **48**, 49-55
- SUN Q.A., WU Y., ZAPPACOSTA F., JEANG K.T., LEE B.J., HATFIELD D.L., GLADYSHEV V.N. (1999): Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. *J.Biol.Chem.* **274**, 24522-24530

- SUNDE R.A. (1997): Selenium. In: *Handbook of nutritionally essential mineral elements*. (eds. O'DELL B.L., SUNDE R.A.) Marcel Dekker, New York; Basel; Hong Kong, 493-556
- SUNDE R.A. (2001): Regulation of selenoprotein expression. In: *Selenium. Its molecular biology and role in human health*. (ed. HATFIELD D.L.) Kluwer Academic Publishers, Boston; Dordrecht; London, 81-96
- SUNDE R.A., HOEKSTRA W.G. (1980): Structure, synthesis and function of glutathione peroxidase. *Nutr.Rev.* **38**, 265-273
- SUNDE R.A., THOMPSON B.M., PALM M.D., WEISS S.L., THOMPSON K.M., EVENSON J.K. (1997): Selenium regulation of selenium-dependent glutathione peroxidases in animals and transfected CHO cells. *Biomed. Environ. Sci.* **10**, 346-355
- SUZUKI H., SUGIYAMA Y. (1998): Excretion of GSSG and glutathione conjugates mediated by MRP1 and cMOAT/MRP2. *Semin. Liver Dis.* **18**, 359-376
- SWIERCZYNSKI J., MAYER D. (1998): Vitamin E prevents induction of carbonyl group formation in microsomal protein by dehydroepiandrosterone. *Nutr. Cancer* **32**, 101-106
- TAKAHASHI K., AVISSAR N., WHITIN J., COHEN H. (1987): Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **256**, 677-686
- TAN A., BITTERMAN P., SONENBERG N., PETERSON M., POLUNOVSKY V. (2000): Inhibition of Myc-dependent apoptosis by eukaryotic translation initiation factor 4E requires cyclin D1. *Oncogene* **19**, 1437-1447
- TANAKA K., HASHIMOTO T., TOKUMARU S., IGUCHI H., KOJO S. (1997): Interactions between vitamin C and vitamin E are observed in tissues of inherently scorbutic rats. *J. Nutr.* **127**, 2060-2064
- TAPPEL M.E., CHAUDIERE J., TAPPEL A.L. (1982): Glutathione peroxidase activities of animal tissues. *Comp. Biochem. Physiol. B* **73**, 945-949
- TEMPLE N.J., BASU T.K. (1987): Selenium and cabbage and colon carcinogenesis in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **79**, 1131-1134
- TERAMOTO S., TOMITA T., MATSUI H., OHGA E., MATSUSE T., OUCHI Y. (1999): Hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis in human lung fibroblasts: protective roles of glutathione. *Jpn. J. Pharmacol.* **79**, 33-40
- THOMPSON H.J., MEEKER L.D., BECCI P.J., KOKOSKA S. (1982): Effect of short-term feeding of sodium selenite on 7,12- dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in the rat. *Cancer Res.* **42**, 4954-4958
- THOMPSON K.M., HAIBACH H., EVENSON J.K., SUNDE R.A. (1998): Liver selenium and testis phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase are associated with growth during selenium repletion of second-generation Se-deficient male rats. *J. Nutr.* **128**, 1289-1295
- THOMPSON K.M., HAIBACH H., SUNDE R.A. (1995): Growth and plasma triiodothyronine concentrations are modified by selenium deficiency and repletion in second-generation selenium-deficient rats. *J. Nutr.* **125**, 864-873
- TOKUMARU S., OGINO R., SHIROMOTO A., IGUCHI H., KOJO S. (1997): Increase of lipid hydroperoxides in tissues of vitamin E-deficient rats. *Free Radic. Res.* **26**, 169-174
- TSUDA S., MATSUSAKA N., UENO S., SUSAN N., SASAKI Y.F. (2000): The influence of antioxidants on cigarette smoke-induced DNA single-strand breaks in mouse organs: a preliminary study with the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Toxicol. Sci.* **54**, 104-109
- TURAN B., HOTOMAROGLU O., KILIC M., DEMIREL-YILMAZ E. (1999): Cardiac dysfunction induced by low and high diet antioxidant levels comparing selenium and vitamin E in rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **29**, 142-150
- URATA Y., YAMAMOTO H., GOTO S., TSUSHIMA H., AKAZAWA S., YAMASHITA S., NAGATAKI S., KONDO T. (1996): Long exposure to high glucose concentration impairs the responsive expression of

- gamma-glutamylcysteine synthetase by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in mouse endothelial cells. *J.Biol.Chem.* **271**, 15146-15152
- URSINI F., HEIM S., KIESS M., MAIORINO M., ROVERI A., WISSING J., FLOHE L. (1999): Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* **285**, 1393-1396
- VATS P., MUKHERJEE A.K., KUMRIA M.M., SINGH S.N., PATIL S.K., RANGNATHAN S., SRIDHARAN K. (1999): Changes in the activity levels of glutamine synthetase, glutaminase and glycogen synthetase in rats subjected to hypoxic stress. *Int.J.Biometeorol.* **42**, 205-209
- VENDELAND S.C., BEILSTEIN M.A., CHEN C.L., JENSEN O.N., BAROFSKY E., WHANGER P.D. (1993): Purification and properties of selenoprotein W from rat muscle. *J.Biol.Chem.* **268**, 17103-17107
- VERES Z., KIM I.Y., SCHOLZ T.D., STADTMAN T.C. (1994): Selenophosphate synthetase. Enzyme properties and catalytic reaction. *J.Biol.Chem.* **269**, 10597-10603
- VIITA H., SEN C.K., ROY S., SILJAMAKI T., NIKKARI T., YLA-HERTTUALA S. (1999): High expression of human 15-lipoxygenase induces NF-kappaB-mediated expression of vascular cell adhesion molecule 1, intercellular adhesion molecule 1, and T-cell adhesion on human endothelial cells. *Antioxid.Redox.Signal.* **1**, 83-96
- VILCEK J., LEE T.H. (1991): Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J.Biol.Chem.* **266**, 7313-7316
- VOEHRINGER D.W. (1999): BCL-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. *Free Radic.Biol.Med.* **27**, 945-950
- WANG J., HUANG C.J., CHOW C.K. (1996): Red cell vitamin E and oxidative damage: a dual role of reducing agents. *Free Radic.Res.* **24**, 291-298
- WANG K., GAN L., JEFFERY E., GAYLE M., GOWN A.M., SKELLY M., NELSON P.S., NG W.V., SCHUMMER M., HOOD L., MULLIGAN J. (1999): Monitoring gene expression profile changes in ovarian carcinomas using cDNA microarray. *Gene* **229**, 101-108
- WATANABE C.M., WOLFFRAM S., ADER P., RIMBACH G., PACKER L., MAGUIRE J.J., SCHULTZ P.G., GOHIL K. (2001): The in vivo neuromodulatory effects of the herbal medicine ginkgo biloba. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **98**, 6577-6580
- WEBER S.U., THIELE J.J., CROSS C.E., PACKER L. (1999): Vitamin C, uric acid, and glutathione gradients in murine stratum corneum and their susceptibility to ozone exposure. *J.Invest.Dermatol.* **113**, 1128-1132
- WEISS S.L., EVENSON J.K., THOMPSON K.M., SUNDE R.A. (1996): The selenium requirement for glutathione peroxidase mRNA level is half of the selenium requirement for glutathione peroxidase activity in female rats. *J.Nutr.* **126**, 2260-2267
- WEITZEL F., URSINI F., WENDEL A. (1990): Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in various mouse organs during selenium deficiency and repletion. *Biochim.Biophys.Acta* **1036**, 88-94
- WELCH R.W., TURLEY E., SWEETMAN S.F., KENNEDY G., COLLINS A.R., DUNNE A., LIVINGSTONE M.B., MCKENNA P.G., MCKELVEY-MARTIN V.J., STRAIN J.J. (1999): Dietary antioxidant supplementation and DNA damage in smokers and nonsmokers. *Nutr.Cancer* **34**, 167-172
- WELZ B., MELCHER M. (1985): Decomposition of marine biological tissues for determination of arsenic, selenium, and mercury using hydride-generation and cold-vapor atomic absorption spectrometries. *Anal.Chem.* **57**, 427-431
- WEN W.H., BERNSTEIN L., LESCALLETT J., BEAZER-BARCLAY Y., SULLIVAN-HALLEY J., WHITE M., PRESS M.F. (2000): Comparison of TP53 mutations identified by oligonucleotide microarray and conventional DNA sequence analysis. *Cancer Res.* **60**, 2716-2722
- WHANGER P.D., BUTLER J.A. (1988): Effects of various dietary levels of selenium as selenite or selenomethionine on tissue selenium levels and glutathione peroxidase activity in rats. *J.Nutr.* **118**, 846-852

- WHANGER P.D., WESWIG P.H., SCHMITZ J.A., OLDFIELD J.E. (1977): Effects of selenium and vitamin E deficiencies on reproduction, growth, blood components, and tissue lesions in sheep fed purified diets. *J.Nutr.* **107**, 1288-1297
- WHITTAKER P., WAMER W.G., CHANDERBHAN R.F., DUNKEL V.C. (1996): Effects of alpha-tocopherol and beta-carotene on hepatic lipid peroxidation and blood lipids in rats with dietary iron overload. *Nutr.Cancer* **25**, 119-128
- WILLIAMS C.H., ARSCOTT L.D., MÜLLER S., LENNON B.W., LUDWIG M.L., WANG P.F., VEINE D.M., BECKER K., SCHIRMER R.H. (2000): Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved. *Eur.J.Biochem.* **267**, 6110-6117
- WINGLER K., BÖCHER M., FLOHÉ L., KOLLMUS, H., BRIGELIUS-FLOHÉ R (1999): mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins. *Eur.J.Biochem.* **259**, 149-157
- WINGLER K., MÜLLER C., SCHMEHL K., FLORIAN S., BRIGELIUS-FLOHÉ R. (2000): Gastrointestinal glutathione peroxidase prevents transport of lipid hydroperoxides in CaCo-2 cells. *Gastroenterology* **119**, 420-430
- WOLFFRAM S. (2000): Der Stoffwechsel ernährungsphysiologisch relevanter anorganischer und organischer Selenverbindungen. *Übers.Tierernährg.* **28**, 65-94
- WOLFFRAM S., ANLIKER E., SCHARRER E. (1986): Uptake of selenate and selenite by isolated intestinal brush border membrane vesicles from pig, sheep and rat. *Biol.Trace Elem.Res.* **10**, 293-306
- WOLFFRAM S., BERGER B., GRENACHER B., SCHARRER E. (1989): Transport of selenoamino acids and their sulfur analogues across the intestinal brush border membrane of pigs. *J.Nutr.* **119**, 706-712
- WOLFFRAM S., GRENACHER B., SCHARRER E. (1988): Transport of selenate and sulphate across the intestinal brush-border membrane of pig jejunum by two common mechanism. *Q.J.Exp.Physiol.* **73**, 103-111
- WU D., HAYEK M.G., MEYDANI S. (2001): Vitamin E and macrophage cyclooxygenase regulation in the aged. *J.Nutr.* **131**, 382S-8S
- WU J., ZERN M.A. (1999): NF-kappa B, liposomes and pathogenesis of hepatic injury and fibrosis. *Front Biosci.* **4**, D520-D527
- WÜRMLI R., WOLFFRAM S., STINGELIN Y., SCHARRER E. (1989): Stimulation of mucosal uptake of selenium from selenite by L-cysteine in sheep small intestine. *Biol.Trace Elem.Res.* **20**, 75-85
- XIE L., XU L., HE Z., ZHOU W., WANG L., ZHANG L., LAN K., REN C., LIU W., YAO K. (2000): Identification of differentially expressed genes in nasopharyngeal carcinoma by means of the Atlas human cancer cDNA expression array. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* **126**, 400-406
- YANG J.G., HILL K.E., BURK R.F. (1989): Dietary selenium intake controls rat plasma selenoprotein P concentration. *J.Nutr.* **119**, 1010-1012
- YEH J.Y., VENDELAND S.C., GU Q., BUTLER J.A., OU B.R., WHANGER P.D. (1997): Dietary selenium increases selenoprotein W levels in rat tissues. *J.Nutr.* **127**, 2165-2172
- YOSHIKAWA T., YOSHIDA N., MANABE H., TERASAWA Y., TAKEMURA T., KONDO M. (1998): alpha-Tocopherol protects against expression of adhesion molecules on neutrophils and endothelial cells. *Biofactors* **7**, 15-19
- YOSHIMURA S., SUEMIZU H., TANIGUCHI Y., WATANABE K., NOMOTO Y., KATSUOKA Y., ARIMORI S., MORIUCHI T. (1991): Molecular cloning of human plasma glutathione peroxidase gene and its expression in the kidney. *Nucleic Acids Symp.Ser.* **25**, 163-164
- YUAN C., PENTTILA K.E., ALFTHAN G., LINDROS K.O. (1991): Role of selenium-dependent glutathione peroxidase in protecting against t-butyl hydroperoxide-induced damage in hepatocytes. *Pharmacol.Toxicol.* **68**, 196-200
- ZELAZOWSKI A.J., PIOTROWSKI J.K. (1977): The levels of metallothionein-like proteins in animal tissues. *Experientia* **33**, 1624-1625

ZHU H., CONG J.P., MAMTORA G., GINGERAS T., SHENK T. (1998): Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**, 14470-14475

9 Anhang

Anhangstabelle 1: Wöchentliche Futterraufnahme, Gesamfutteraufnahme und Futterverwertung der Ratten

Gruppe	Tier	Futterraufnahme (g FM/Woche)							gesamt (g)	FV (g/g)
		d ₁ -d ₇	d ₈ -d ₁₄	d ₁₅ -d ₂₁	d ₂₂ -d ₂₈	d ₂₉ -d ₃₅	d ₃₆ -d ₄₂	d ₄₃ -d ₄₉		
I (-Se -VE)	1	48,9	67,1	85,8	98,9	92,2	101,0	85,4	579,2	3,63
	2	55,0	68,8	96,5	103,1	115,4	130,1	131,1	699,9	3,33
	3	56,3	65,6	82,6	97,9	101,5	66,52	109,4	579,8	3,63
	4	58,9	82,6	111,5	111,4	87,4	123,3	79,1	654,3	5,91
	5	52,9	79,1	108,3	121,4	114,9	125,9	133,7	736,1	3,42
	6	53,7	78,0	101,0	108,7	107,4	74,7	137,1	660,6	3,66
	7	51,5	73,5	92,0	100,4	127,1	86,7	114,0	645,1	3,87
	8	64,3	83,3	114,2	124,3	137,4	149,9	158,3	831,7	3,58
	M	55,2	74,7	99,0	108,3	110,4	107,3	118,5	735,2	3,59
	SD	4,79	7,00	11,8	10,2	16,9	29,6	26,9	69,2	0,17
II (-Se +VE)	9	49,3	72,3	92,4	107,3	124,3	135,5	137,3	714,5	3,24
	10	56,9	79,0	98,8	111,5	115,0	133,0	141,8	716,9	3,36
	11	54,4	64,8	85,9	100,0	110,2	104,3	126,4	641,9	3,17
	12	56,3	77,8	101,7	115,0	132,2	141,2	140,6	651,2	3,37
	13	58,2	71,0	88,3	99,1	109,6	103,6	118,7	671,5	3,37
	14	57,4	88,1	101,6	112,5	119,7	124,2	126,3	633,5	3,39
	15	56,5	61,6	108,2	124,1	144,3	139,0	148,6	688,7	3,16
	16	65,5	93,0	115,4	128,4	149,1	152,1	152,5	738,3	4,17
	M	56,8	76,0	99,02	112,2	125,6	129,1	136,5	682,0	3,30
	SD	4,51	10,8	9,97	10,4	15,1	17,4	11,8	38,7	0,10
III (+Se -VE)	17	54,9	74,6	95,3	106,8	115,1	130,4	137,3	696,2	3,16
	18	56,5	74,0	90,9	109,3	115,6	128,7	141,9	584,6	3,12
	19	41,1	65,6	94,1	99,3	104,5	122,0	125,3	760,9	3,33
	20	53,8	69,6	93,1	100,7	106,0	116,5	111,4	734,7	3,48
	21	47,8	70,7	87,6	94,4	110,0	133,2	127,9	726,2	3,14
	22	56,5	64,7	87,8	93,6	102,4	114,1	114,3	830,1	3,20
	23	59,6	78,7	96,9	102,2	105,4	124,3	121,6	723,7	3,39
	24	58,5	80,1	101,0	108,9	117,0	137,1	135,7	750,6	3,25
	M	53,6	72,3	92,1	101,9	109,5	125,8	126,9	725,9	3,26
	SD	6,18	5,64	5,56	6,10	5,72	8,04	11,0	69,3	0,13
IV (+Se +VE)	25	55,1	71,3	94,6	102,2	116,6	127,3	129,1	696,2	3,23
	26	58,6	81,5	102,2	48,4	80,4	87,7	125,7	584,6	3,25
	27	59,4	76,6	102,2	110,6	130,2	138,9	142,9	760,9	3,33
	28	55,5	76,8	97,9	110,5	124,4	127,7	142,0	734,7	3,27
	29	57,1	76,8	92,1	105,4	123,0	134,0	137,8	726,2	3,33
	30	60,5	87,3	116,2	126,3	139,2	138,6	162,0	830,1	3,23
	31	55,9	87,2	98,4	106,1	120,4	134,1	121,8	723,7	3,73
	32	58,4	79,6	108,7	114,2	126,3	133,9	129,5	750,6	3,39
	M	57,6	79,6	101,5	103,0	120,1	127,8	136,3	725,9	3,34
	SD	1,97	5,52	7,82	23,2	17,4	16,7	12,9	69,3	0,17

kursiv: als Ausreißer aus Bewertung ausgeschlossen

Anhangstabelle 2: Lebendmasse und Lebendmassezunahme (LMZ) der Ratten

Gruppe	Tier	Lebendmasse (g)								LMZ	
		d ₀	d ₇	d ₁₄	d ₂₁	d ₂₈	d ₃₅	d ₄₂	d ₄₉	gesamt (g)	(g/d)
I (-Se -VE)	1	3,63	48,3	70,7	104,3	136,2	170,4	184,1	191,6	159,6	3,26
	2*	5,91	53,0	76,0	114,9	152,6	183,0	213,7	243,6	210,1	4,29
	3	3,42	56,0	78,2	109,9	146,0	170,9	163,2	193,4	159,9	3,26
	4	3,66	57,4	86,1	128,4	157,1	162,1	191,1	145,3	110,8	2,26
	5*	3,87	58,0	90,1	130,1	173,4	196,7	227,5	250,1	215,5	4,40
	6	3,58	57,1	87,9	123,9	160,4	187,7	181,4	217,0	180,3	3,68
	7	3,59	54,1	77,2	110,9	142,2	169,0	178,5	203,9	166,8	3,40
	8*	0,17	63,5	93,3	137,5	175,2	209,5	244,5	271,0	232,6	4,75
M		35,0	55,9	82,4	120,0	155,4	181,2	198,0	214,5	179,5	3,66
SD		2,16	4,40	7,97	11,7	14,1	16,1	27,7	40,0	39,1	0,80
II (-Se +VE)	9	32,0	49,4	74,1	110,5	151,4	184,5	219,6	253,7	221,7	4,52
	10*	33,5	53,8	84,0	120,0	156,6	192,1	225,1	252,4	218,9	4,47
	11	33,7	56,7	79,9	113,4	150,8	182,2	202,8	237,4	203,7	4,16
	12	34,4	55,4	83,5	123,3	160,6	196,9	236,1	261,2	226,8	4,63
	13	34,6	58,8	81,0	115,0	152,3	182,5	203,0	226,8	192,2	3,92
	14*	36,6	58,7	86,7	124,9	165,3	199,0	228,3	251,9	215,3	4,39
	15	37,2	55,7	84,8	128,5	168,7	225,4	251,6	284,7	247,5	5,05
	16*	37,9	54,6	79,2	115,7	156,9	187,5	217,6	243,2	205,3	4,19
M		35,0	55,4	81,7	118,9	157,8	193,8	223,0	251,4	216,4	4,42
SD		2,04	3,01	3,98	6,27	6,60	14,3	16,3	17,2	16,8	0,34
III (+Se -VE)	17*	32,3	57,3	78,9	113,3	152,4	188,3	223,7	258,1	225,8	4,61
	18*	32,8	56,5	85,1	117,1	157,3	191,3	226,0	262,6	229,8	4,69
	19*	33,7	47,3	73,9	108,9	136,9	170,7	202,5	226,7	193,0	3,94
	20	34,4	56,6	82,8	114,8	151,4	175,8	205,5	221,7	187,3	3,82
	21	34,7	53,6	83,9	119,0	145,3	183,9	222,9	248,3	213,6	4,36
	22	36,3	62,8	81,3	117,4	151,9	179,3	205,1	234,1	197,8	4,04
	23	37,4	64,0	92,6	125,8	159,7	185,7	215,3	240,7	203,3	4,15
	24	37,8	61,7	93,4	132,4	171,4	204,9	237,1	265,3	227,5	4,64
M		34,9	53,4	84,0	118,6	153,3	185,0	217,3	244,7	209,8	4,28
SD		2,05	56,9	6,55	7,39	10,2	10,5	12,3	16,6	16,7	0,34
IV (+Se +VE)	25*	32,5	53,4	79,0	114,6	150,6	183,7	218,6	248,0	215,5	4,40
	26	32,6	56,9	89,5	129,2	123,9	148,6	173,6	212,7	180,1	3,68
	27	34,2	56,5	82,7	126,5	160,5	199,4	232,1	262,8	228,6	4,67
	28	34,4	55,8	83,8	120,7	159,2	192,3	225,7	259,3	224,9	4,59
	29*	34,9	57,7	89,6	122,8	160,7	199,2	222,3	253,0	218,1	4,45
	30	36,3	60,8	95,8	137,2	175,2	218,7	256,7	292,9	256,6	5,24
	31	37,6	58,6	88,8	124,7	161,5	188,8	214,4	231,7	194,1	3,96
	32*	37,7	61,4	89,7	130,0	163,8	201,8	233,7	259,0	221,3	4,52
M		35,0	57,6	87,4	125,7	156,9	191,5	222,1	252,4	217,4	4,44
SD		2,03	2,63	5,25	6,77	15,0	20,27	23,5	23,5	22,9	0,47

*für cDNA-Array Analysen ausgewählte Tiere

Anhangstabelle 3: α -Tocopherol-Konzentrationen in Plasma und Leber der Ratten

Gruppe	Tier	α -Tocopherol Plasma ($\mu\text{g/mL}$)	α -Tocopherol Leber ($\mu\text{g/g FM}$)
I (-Se -VE)	1	0,617	1,25
	2	0,558	1,28
	3	0,400	0,92
	4	0,448	1,02
	5	0,424	0,76
	6	0,474	0,88
	7	0,471	1,02
	8	0,567	1,20
	M	0,495	1,04
	SD	0,077	0,19
II (-Se +VE)	9	10,1	28,7
	10	12,4	34,5
	11	12,3	27,8
	12	9,23	25,2
	13	10,1	30,1
	14	9,49	33,6
	15	8,73	25,3
	16	7,89	26,7
	M	10,0	29,0
	SD	1,62	3,54
III (+Se -VE)	17	0,524	1,61
	18	0,394	1,10
	19	0,336	0,96
	20	0,431	1,22
	21	0,482	1,30
	22	0,477	1,14
	23	0,262	0,81
	24	0,371	1,10
	M	0,410	1,15
	SD	0,086	0,24
IV (+Se +VE)	25	9,80	35,2
	26	10,4	36,0
	27	8,42	30,3
	28	9,00	36,1
	29	9,19	32,6
	30	7,90	28,6
	31	9,68	34,6
	32	8,62	27,5
	M	9,13	32,6
	SD	0,82	3,42

Anhangstabelle 4: Aktivitäten der Selen-abhängigen Enzyme pGPx, cGPx und TrxR sowie hepatische Selen-Konzentrationen

Gruppe	Tier	pGPx Plasma (mU/mg Protein)	cGPx Leber (mU/mg Protein)	TrxR Leber (mU/mg Protein)	Selen Leber (µg/kg FM)
I (-Se -VE)	1	3,07	5,68	1,35	28,5
	2	3,98	6,43	1,53	28,4
	3	3,13	5,35	1,53	28,9
	4	4,59	4,90	1,21	28,4
	5	3,56	3,87	1,19	27,3
	6	4,04	4,70	1,13	19,0
	7	3,98	6,82	1,46	22,3
	8	4,22	5,87	1,15	27,3
	M	3,82	5,45	1,32	26,3
	SD	0,53	0,96	0,17	3,63
II (-Se +VE)	9	5,45	12,9	1,07	28,3
	10	3,42	10,6	1,16	26,8
	11	3,41	9,82	1,03	33,2
	12	3,60	11,8	1,20	28,0
	13	3,55	8,03	1,33	40,9
	14	4,94	12,6	1,30	32,1
	15	5,16	11,1	1,09	34,4
	16	5,33	10,3	1,09	37,3
	M	4,36	10,9	1,16	32,6
	SD	0,93	1,58	0,11	4,91
III (+Se -VE)	17	8,88	134,5	8,80	803,5
	18	12,5	149,7	9,60	860,8
	19	13,5	156,2	10,7	827,9
	20	13,6	157,0	10,7	944,7
	21	8,84	167,8	10,5	932,0
	22	10,8	144,4	8,43	1052
	23	8,67	153,3	8,51	925,5
	24	7,47	171,1	8,43	857,3
	M	10,5	154,2	9,46	900,4
	SD	2,40	11,9	1,05	79,8
IV (+Se+VE)	25	4,12	148,1	9,79	840,4
	26	7,27	143,9	10,5	868,0
	27	7,24	153,8	9,20	873,8
	28	8,20	164,6	8,87	908,1
	29	6,99	181,3	8,17	827,8
	30	8,71	177,8	10,4	859,3
	31	7,14	145,2	8,24	950,7
	32	11,4	173,2	8,85	934,5
	M	8,13	161,0	9,25	882,8
	SD	2,03	15,2	0,89	44,1

kursiv: als Ausreißer aus Bewertung ausgeschlossen

Anhangstabelle 5: Hämoglobin-Konzentration und Hämatokrit-Wert der Ratten

Gruppe	Tier	Hämoglobin (g/dL)	Hämatokrit (%)
I (-Se -VE)	1	13,2	47,5
	2	13,0	47,0
	3	12,8	44,5
	4	18,2	64,5
	5	13,6	44,5
	6	13,7	45,5
	7	13,0	43,0
	8	13,7	46,5
	M	13,3	45,5
	SD	0,38	1,61
II (-Se +VE)	9	14,0	46,5
	10	14,5	48,0
	11	14,5	47,0
	12	14,6	49,0
	13	14,4	47,5
	14	14,7	46,5
	15	14,0	48,5
	16	14,6	46,5
	M	14,4	47,4
	SD	0,27	0,98
III (+Se -VE)	17	14,7	47,5
	18	15,1	48,5
	19	14,0	43,5
	20	13,5	44,5
	21	13,6	45,0
	22	14,7	50,5
	23	15,8	49,5
	24	15,8	49,0
	M	14,6	47,3
	SD	0,89	2,59
IV (+Se +VE)	25	14,6	47,0
	26	13,8	45,5
	27	14,9	47,5
	28	15,0	50,0
	29	15,5	50,5
	30	14,7	48,0
	31	15,8	52,0
	32	14,8	48,5
	M	14,9	48,6
	SD	0,59	2,10

kursiv: als Ausreißer aus Bewertung ausgeschlossen

Anhangstabelle 6: Glutathion- und Vitamin C-Konzentrationen sowie Aktivitäten der Glutathionreduktase und der Glutathion-S-Transferase in der Leber

Gruppe	Tier	GSH ($\mu\text{mol/g FM}$)	GSSG ($\mu\text{mol/g FM}$)	GSH / GSSG	GR (mU/mg Protein)	GST (mU/mg Protein)	Ascorbat ($\mu\text{mol/g FM}$)
I (-Se -VE)	1	5585	4,32	1290	52,1	203,3	n.a.
	2	2212	5,86	375,8	51,6	242,1	91,7
	3	2803	5,50	508,1	53,9	200,8	n.a.
	4	2741	2,97	920,1	46,4	182,8	n.a.
	5	1244	4,41	279,8	45,4	208,0	116,1
	6	2142	2,34	912,3	48,1	203,6	107,4
	7	2030	3,24	623,9	50,9	217,5	86,5
	8	3436	3,78	906,0	46,4	215,0	123,5
	M	2774	4,05	726,9	49,4	209,1	105,0
	SD	1307	1,22	338,5	3,15	17,0	15,8
II (-Se +VE)	9	2864	4,95	576,0	51,0	198,1	n.a.
	10	1848	5,05	364,2	51,5	250,3	151,1
	11	2204	7,21	303,8	43,8	205,2	108,3
	12	2476	7,48	329,1	46,8	227,9	n.a.
	13	2274	4,86	465,3	49,0	232,0	122,3
	14	3566	8,65	410,3	58,8	234,1	155,9
	15	4615	6,22	740,4	52,7	232,2	n.a.
	16	2518	9,46	264,2	52,5	231,7	94,0
	M	2795	6,73	431,7	50,8	226,4	126,3
	SD	895,1	1,76	159,1	4,46	16,8	26,8
III (+Se -VE)	17	3077	14,6	208,9	44,1	141,6	119,4
	18	2865	14,5	195,5	35,9	135,9	n.a.
	19	3030	10,9	276,0	45,4	130,7	174,9
	20	3608	14,4	248,3	44,9	143,4	n.a.
	21	2312	7,57	303,5	38,8	142,4	119,3
	22	2063	9,15	223,5	43,8	164,9	112,1
	23	2384	6,65	356,4	40,5	137,4	139,1
	24	2474	12,3	198,4	36,9	131,5	n.a.
	M	2676	11,3	251,3	41,3	141,0	133,0
	SD	526,6	3,21	57,2	3,78	10,8	25,5
IV (+Se +VE)	25	3562	90,6	37,3	43,6	162,8	127,2
	26	4349	75,3	55,7	37,8	151,4	n.a.
	27	3569	75,9	45,0	41,0	162,2	165,2
	28	2749	8,87	307,9	38,7	151,4	n.a.
	29	2765	34,1	79,2	38,9	165,4	142,4
	30	2118	19,3	107,9	44,2	173,0	n.a.
	31	3484	18,6	185,7	37,0	160,8	149,2
	32	2289	10,7	211,1	41,0	172,5	150,6
	M	3046	46,1	117,0	40,3	162,4	146,9
	SD	792,0	33,5	98,3	2,64	8,17	13,8

Anhangstabelle 7: DNA-Schädigungen anhand der Parameter „% DNA im Schweif“ und „Tailmoment“ in Leberzellen der Ratten

Gruppe	Tier	% DNA im Schweif	Tailmoment
I (-Se -VE)	1	4,52	0,212
	2	4,18	0,788
	3	3,86	0,588
	4	2,24	0,154
	5	5,19	1,981
	6	2,66	0,160
	7	4,95	0,423
	8	3,83	0,667
	M	3,93	0,427
	SD	1,04	0,260
II (-Se +VE)	9	2,30	0,173
	10	5,89	0,686
	11	2,56	0,423
	12	2,40	0,208
	13	4,41	0,654
	14	1,78	0,040
	15	3,82	0,192
	16	3,46	0,192
	M	3,33	0,321
	SD	1,36	0,239
III (+Se -VE)	17	4,21	1,176
	18	3,63	0,250
	19	4,68	0,647
	20	3,60	0,577
	21	4,89	0,265
	22	4,15	0,118
	23	1,67	0,039
	24	6,07	0,340
	M	4,11	0,319
	SD	1,27	0,224
IV (+Se +VE)	25	5,83	0,769
	26	3,95	0,588
	27	3,84	0,154
	28	2,38	0,058
	29	2,13	1,154
	30	1,85	0,314
	31	3,77	0,333
	32	3,43	0,442
	M	3,41	0,476
	SD	1,27	0,356

kursiv: als Ausreißer aus Bewertung ausgeschlossen

Anhangstabelle 8: TBA-RS und Metallothionein-Konzentrationen sowie Aktivitäten der γ -Glutaminsynthetase und Lactatdehydrogenase in der Leber

Gruppe	Tier	TBA-RS Leber (nmol/g FM)	γ -GS Leber (U/mg Protein)	MT Leber (ng/mg Protein)	LDH Plasma (mU/mL)
I (-Se -VE)	1	97,1	16,7	182,7	660,3
	2	68,0	13,2	56,3	489,4
	3	91,9	20,4	51,7	478,6
	4	82,9	17,3	1886,1	1210,5
	5	62,0	21,6	102,6	412,3
	6	75,0	15,3	53,6	390,0
	7	73,6	17,0	84,0	372,1
	8	110,5	18,1	152,9	559,3
	M	82,6	17,5	97,7	480,3
	SD	16,3	2,67	52,0	102,7
II (-Se +VE)	9	6,06	8,93	202,8	491,0
	10	7,89	11,7	35,9	497,8
	11	5,80	14,1	26,7	455,2
	12	6,58	11,3	27,6	627,8
	13	5,26	16,3	30,2	397,1
	14	7,30	11,9	17,5	547,5
	15	6,97	12,0	68,9	364,5
	16	6,62	15,3	42,4	380,4
	M	6,56	12,7	35,6	470,2
	SD	0,84	2,41	16,6	90,1
III (+Se -VE)	17	97,7	13,4	16,0	466,4
	18	94,9	14,4	22,3	464,9
	19	96,3	13,2	20,8	435,2
	20	82,5	18,4	25,7	401,6
	21	86,1	12,5	25,3	389,5
	22	78,3	13,8	17,4	425,0
	23	89,9	10,5	17,8	320,6
	24	83,7	13,6	13,7	441,9
	M	87,4	13,8	19,9	418,1
	SD	6,64	2,41	4,37	47,8
IV (+Se+VE)	25	9,43	8,64	15,1	397,8
	26	8,27	15,7	13,2	461,6
	27	9,41	8,99	20,7	374,9
	28	6,65	10,9	19,6	321,8
	29	7,71	12,3	13,2	341,5
	30	6,29	12,4	39,9	338,1
	31	8,73	7,79	25,8	426,7
	32	7,90	9,10	35,8	416,6
	M	7,85	11,0	22,9	384,9
	SD	1,10	2,70	10,2	49,2

kursiv: als Ausreißer aus Bewertung ausgeschlossen

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Josef Pallauf herzlich für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas und die engagierte Betreuung.

Frau Prof. Dr. Katja Becker-Brandenburg möchte ich für das Interesse am Thema, für die freundliche Übernahme des Koreferates und für die konstruktiven Hinweise zur Arbeit danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Edgar Weigand bedanke ich mich für die wertvolle und kritische Durchsicht der Arbeit und für das Erstellen des 3. Gutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. habil. Gerald Rimbach, ohne dessen produktive Anregungen und Ideen diese Arbeit in der vorliegenden Form nicht hätte entstehen können.

Den zwei weiteren Mitgliedern der „Dornfelder Crew“ Frau Stephanie Cremers und Frau Bettina Nier möchte ich für die wundervolle gemeinsame Zeit im Büro bzw. bei den Versuchen danken. Es ist schön, seine Kollegen als Freunde zu haben.

Ein großer Dank geht an meine Diplomandinnen Frau Kirsten Grashoff und Frau Anika Wagner, die mich durch ihre Mitarbeit bei den Versuchen tatkräftig unterstützt haben.

Ich danke Frau Dr. Erika Most, Frau Anja Marx, Frau Martina Schneider und Frau Frauke Frank für die Hilfe bei den Vitamin E- und Selen-Analysen sowie Frau Susanne Breitstadt für die umfangreiche Unterstützung bei den Enzymmessungen. Ebenso gilt mein Dank Frau Silke Hees und Herrn Marco Jäger für die Mithilfe bei den über Weihnachten und Silvester laufenden Tierversuchen. Frau Nicole Zuber und Herrn Helmut Henzel danke ich für die Durchführung der Weender-Analysen und Frau Tina Volk für die Hilfsbereitschaft in meiner Anfangszeit am Institut.

Herrn Klaus Brandl, Herrn Marco Jäger und Herrn Christian Spangenberg sei für den „24-Stunden Computernotdienst“ gedankt. Bei Frau Christine Bösch-Saadatmandi und meinem Vater möchte ich mich für die kritische Durchsicht des Manuskripts und für die konstruktiven Anregungen bedanken.

Ein weiterer Dank gebührt Herrn Olaf Heller für die Hilfsbereitschaft bei der mikroskopischen Auswertung der DNA Schäden.

Ich danke allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Tierernährung und Ernährungsphysiologie für die schöne Zeit.

Mein Dank gilt auch meiner Schwester und allen Freunden für ihre Anteilnahme und dafür, dass sie immer für mich da waren. Ganz besonders möchte ich dabei Herrn Oliver Leismann für seine große persönliche Unterstützung bei der Erstellung und Durchsicht der Arbeit, für seine immerwährende Hilfsbereitschaft und für seine motivierenden Worte in weniger erfolgreichen Situationen danken.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern, Helgard und Dieter Fischer, danken, die mir meine Ausbildung und dadurch das Entstehen dieser Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben.

Lebenslauf

Alexandra Fischer

Geburtsdatum 12. Juni 1973
Geburtsort Gießen

Schulbildung

1979 – 1983 Grundschule in Solms
1983 – 1989 Gesamtschule in Solms
1989 – 1992 Gymnasiale Oberstufe in Wetzlar mit Schulabschluss Abitur

Hochschulausbildung

1992 – 1997 Studium der Haushalts- und Ernährungswissenschaften, Fachrichtung Ernährungswissenschaft an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
seit Juni 1998 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen

Praktische Erfahrungen und Auslandsaufenthalte

Okt. 1994 – März 1995 Praktikum an der „University of Greenwich, School of Biological and Chemical Sciences“ in London, England
Aug. 1995 – Sep. 1995 Praktikum in einer Fachklinik für Innere Medizin, Stoffwechselerkrankungen und Erkrankungen der Bewegungsorgane in Bad Neustadt
März 1996 – April 1996 Praktikum bei der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) in Frankfurt
Jan. 1998 – April 1998 Praktikum an der „University of California, Department of Nutrition“ in Davis, Kalifornien, USA
Feb. 1999 – März 1999 Forschungsaufenthalt an der „University of California, Division of Biochemistry and Molecular Biology“ in Berkeley, Kalifornien, USA