

Selen und Knochen? Selen und Knochen!

vorgelegt von
Dipl. Biol. Nicole Pietschmann
aus Waren (Müritz)

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
Fachgebiet Medizinische Biotechnologie
Technische Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
-Dr. rer. nat.-

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzende: Prof. Vera Meyer
Gutachter: Prof. Roland Lauster
Gutachter: Prof. Lutz Schomburg
Gutachter: Prof. Juri Rappsilber

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 14. März 2014

Berlin 2014
D83

Die experimentellen Arbeiten zu dieser Dissertation wurden von April 2010 bis September 2013 unter der Leitung von Prof. Lutz Schomburg am Institut für Experimentelle Endokrinologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, im Rahmen der Graduiertenschule „*Berlin Brandenburg School for Regenerative Therapies*“ durchgeführt.

Berlin, Januar 2014

1. Gutachter: Prof. Roland Lauster (TU Berlin)
2. Gutachter: Prof. Lutz Schomburg (Charité Berlin)
3. Gutachter: Prof. Juri Rappsilber (TU Berlin)

Diese Arbeit wurde finanziert durch die „*Berlin Brandenburg School for Regenerative Therapies*“ (BSRT), die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) und das Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi).

All Meinen Lieben.

Zusammenfassung

Es war einmal ein toxisches Element ...,
ein karzinogenes Element ...,
ein essentielles Spurenelement ...,
und alle trugen die gleiche Bezeichnung:
Selen (Se).

Se übt seine Effekte auf die menschliche Gesundheit hauptsächlich in Form der 21. proteinogenen Aminosäure Selenocystein (Sec) aus. Die Sec-enhaltenden Selenoproteine werden im Menschen von 25 Genen kodiert und kontrollieren zentrale Prozesse der Entwicklung, des Metabolismus und der Alterung. Diese essentielle Bedeutung des Se und der Selenoproteine wird zunehmend durch tierexperimentelle und humane Studien belegt. So werden Se-Mangel bzw. Se-Supplementation mit einem veränderten Krebsrisiko, der Reaktionsfähigkeit des Immunsystems und sogar der Mortalitätsrate bei Krebs oder Sepsis in Verbindung gebracht.

Der Einfluss von Se für die Knochengesundheit ist dagegen bis dato nur wenig charakterisiert, obwohl eine wichtige Rolle von Se für die *Kashin Beck* Erkrankung, einer endemischen Osteoarthritis, seit Jahrzehnten bekannt ist. Daneben konnte eine Verbindung zwischen verzögerter Knochenentwicklung in Kindern und einer vererbten Mutation im *SECIS Binding Protein 2* (SBP2), einem essentiellen Faktor der Selenoproteinbiosynthese, beobachtet werden. Zusätzlich wurde kürzlich eine positive Assoziation zwischen dem Se-Status und dem Se-transportierenden Protein (SePP) im Serum und dem Knochenumbau (bone turnover) bei gesunden postmenopausalen Frauen gezeigt (OPUS-Studie).

Diese Arbeit beschreibt experimentelle Studien zur Rolle von Se für die Knochenentwicklung und –Homöostase. Hierzu wurden Zellkultursysteme und die langen Röhrenknochen Femur und Tibia im *Sepp*-Mausmodell mit unterschiedlichem Se-Status untersucht. Es zeigte sich, dass die Mehrheit der bekannten Selenoproteingene im Knochen exprimiert wird (mit Ausnahme der Dejodase Typ 1 und des Selenoprotein V), ebenso wie alle wichtigen Faktoren des Se-Metabolismus,

wobei geschlechtsspezifische Expressionsunterschiede identifiziert wurden. Biomechanische Untersuchungen deuten Genotypen- und geschlechtsspezifische Unterschiede in der Knochenqualität an, während histologische Arbeiten auf eine verzögerte Knochenentwicklung in den *Sepp*-KO-Tieren schließen lassen. Eine neue Methodik zur Ermittlung der Se-Konzentration aus murinen Knochenproben wurde in der Arbeit etabliert; hierdurch konnte das gesamte Se des Knochens exklusiv der organischen Knochenmatrix zugeordnet werden. Ein starker Se-Mangel im Serum von *Sepp*-KO-Mäusen (25-fach im Vergleich zum WT) wurde nur minimal im Knochen reflektiert (2,5-fach), was auf eine präferentielle Versorgung des Knochens hindeutet. Die Hepatozyten-spezifische Expression eines SePP-Transgens konnte den Knochen Se-Status in den KO-Mäusen wieder herstellen, wodurch ein physiologischer Transportweg für Se in den Knochen identifiziert werden konnte. Hierzu passend wurde von den zwei bekannten *Sepp*-Rezeptoren Apoer2 *in vitro* und *in vivo* in Knochenzellen nachgewiesen, wobei dessen Expression in männlichen *Sepp*-KO-Tieren stark hochreguliert wird. Dies konnte auch für die zwei intrazellulär Se-bindenden Proteine *Selenium-Binding Protein 1* (*Sebp1*) und *Fatty Acid Binding Protein 1* (*Fabp1*) beobachtet werden und beschreibt damit einen neuen physiologischen Feedbackmechanismus für eine verbesserte Se-Aufnahme in Mangelzeiten in das essentielle Knochengewebe.

Die Wirkungen von Se auf den Knochen im Menschen sind elementspezifisch, denn unsere begleitenden Studien zur Assoziation der Kupfer- und Zink-Konzentrationen mit Knochenbeschaffenheit und Knochenumsatz in gesunden postmenopausalen Frauen lieferten grundsätzlich andere Zusammenhänge, z.B. eine gänzlich fehlende Bedeutung der Serumzinkkonzentration für die knochenspezifischen Parameter.

Die Ergebnisse dieser Arbeit befördern den Knochen, neben Gehirn und Hoden, in den Blickpunkt der Se-Forschung, da Knochen als bevorzugtes Se-Zielgewebe im Menschen identifiziert wurde. Knochen ist relativ resistent gegenüber Se-Mangel. Die Leber transportiert über SePP das Se der Nahrung gezielt in den Knochen, wo es über eine dynamische Regulation des SePP-Rezeptors ApoER2 bedarfsgerecht aufgenommen wird. Störungen der SePP-ApoER2-SeBP1-Interaktion, die zu einem Se-Mangel im Knochen führen, sind von medizinischer Relevanz und sollten bei Knochenfehlerkrankungen, –Erkrankungen und –Alterung berücksichtigt werden.

Abstract

Once upon a time there was a toxic element ...,
a carcinogenic element ...,
an essential trace element ...,
all called by the same name:
Selenium (Se).

Se exerts its effects in human health mainly as the 21st proteinogenic amino acid i.e. selenocysteine (Sec). A set of 25 genes encodes Sec-containing selenoproteins in humans and controls central processes of development, metabolism and aging. Selenoproteins undertake a multitude of pivotal functions in the organism. Over the past decades, several animal and human studies contributed to unravel the physiological importance of Se for biological systems. More recently Se deprivation and Se supplementation have been linked to a modified risk of cancer, immunoreactivity and mortality rate in cancer and sepsis.

The influence of Se for bone health, however, is poorly characterized until now, although Se deficiency is linked to Kashin Beck disease, an endemic osteoarthritis. Furthermore, delayed bone age in children is associated to an inherited mutation in *SECIS Binding Protein 2*, an essential factor for selenoprotein biosynthesis. A recent study demonstrated a positive correlation between Se status and Se transport protein (SePP) and bone turnover in healthy postmenopausal women (OPUS-study).

The thesis describes the experimental studies on the role of Se for bone development and homeostasis. Therefore cell culture systems and long bones Femur and Tibia of the *Sepp* mouse model with altering Se status were analyzed. The majority of all known selenoproteins (with the notable exception of Deiodinase type 1 and Selenoprotein V) and all critical factors for Se metabolism are expressed in bone with gender specific expression differences.

Mechanical studies suggest genotype and gender specific differences in bone mineral content while histological experiments indicate a delayed bone development in *Sepp* KO mice. The procedure of determining Se concentrations in murine bones was established in this work and total Se was exclusively located in the organic bone

matrix. A drastic serum Se deficiency in *Sepp* KO mice (25-fold compared to WT) resulted in a modest Se deprivation in bone (2.5-fold), suggesting a preferential Se supply of bone. The hepatocytic specific expression of SePP could rescue bone Se status in *Sepp* KO mice, identifying a physiological way of Se transportation to bone. Of the two known *Sepp* receptors Apoer2 was detected *in vitro* and *in vivo* but the expression is strongly up-regulated in male *Sepp* KO mice only. This sex-specific effect was observed for the two intracellular Se binding proteins *Selenium-Binding Protein 1* (*Sebp1*) und *Fatty Acid Binding Protein 1*, too, describing a novel physiological feedback mechanism for an enhanced Se intake in times of Se deficiency to the essential bone tissue.

The effect of Se on bone is element specific in humans. Additional studies analyzing an association of Cu and Zn status on bone quality and bone turnover in healthy postmenopausal women presented different relations, e.g. a missing importance of serum Zn concentrations on bone turnover parameters.

The results of this thesis position bone, like brain and testis, in the focus of Se research because bone was identified as a prioritized Se target tissue in humans. Bone is relatively resistant against Se deprivation. Dietary Se is transported by SePP from liver to bone where it is taken up by dynamically regulation of the SePP receptor ApoER2. Interferences of the SePP-ApoER2-SeBP1 interaction, which are linked to Se deficiency in bone, are of medical importance and should be taken into consideration during bone malformation, bone disease and bone aging.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Das essentielle Spurenelement Selen	2
1.1.1 Selen im Wandel der Zeit	2
1.1.2 Vorkommen und Verbreitung des Selens	4
1.1.3 Der Selen-Metabolismus	6
1.2 Selenoproteine und Selen-bindende Proteine	7
1.2.1 Selenoproteine und ihre Funktionen	7
1.2.2 Die Synthese von Selenocystein und der Selenoproteine	9
1.2.3 Selen-bindende Proteine	13
1.2.4 Hierarchie der Se-Versorgung und Selenoproteinexpression.....	14
1.2.5 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Selenoproteinforschung...	14
1.3 Das Selen-transportierende Selenoprotein P	15
1.3.1 Bedeutung und Funktion von Selenoprotein P (SePP).....	15
1.3.2 Selenoprotein P und seine Rezeptoren	17
1.3.3 Das Selenoprotein P- <i>Knockout</i> -Mausmodell	19
1.4 Die Rolle von Selen im Knochen	20
1.4.1 Knochenaufbau und -Entstehung	20
1.4.2 Der Knochen lebt- die Knochenhomöostase	24
1.4.3 Knochenendokrinologie	27
1.4.4 Knochen, Kupfer und Zink?	27
1.4.5 Knochen und Selen?	28

2	Zielstellung der Arbeit	32
3	Material und Methoden	34
3.1	Laborgeräte	35
3.2	Software und Datenbanken	36
3.3	Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	36
3.4	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme (Kits).....	37
3.5	Antikörper	37
3.6	Puffer und Lösungen	37
3.7	Medien und Zusätze für die Zellkultur.....	38
3.8	Eukaryotische Zelllinien	38
3.9	Tierexperimentelle Arbeiten.....	38
3.9.1	Mauslinien und Zucht.....	38
3.9.2	Spezialdiät	39
3.9.3	Organpräparation und Probenvorbereitung	39
3.10	Molekularbiologische Methoden	41
3.10.1	Genotypisierung <i>Sepp</i> -defizienter Mäuse.....	41
3.10.2	Quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR).....	42
3.10.3	Agarosegelelektrophorese mit DNA und RNA.....	45
3.11	Proteinbiochemische Methoden	46
3.11.1	Proteinextraktion.....	46
3.11.2	Western Blot	47
3.11.3	Enzym-Aktivitätstests.....	49
3.12	Histologie und Immunhistochemische Untersuchungen	51
3.12.1	Einbetten von Knochen und Herstellung von Paraffinschnitten	51
3.12.2	Alcian Blau-Färbung	52
3.12.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	52

3.12.4	Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen	53
3.13	Zellkultur	54
3.13.1	Kultivierung.....	54
3.13.2	Stimulierung mit Natrium-Selenit	56
3.13.3	<i>siRNA</i> -vermittelter <i>knockdown</i> von Apoer2 in Raw264.7-Zellen.....	56
3.13.4	<i>in vitro</i> Assay zum SePP- <i>Uptake</i> mittels Luminometer.....	57
3.14	Spektrometrische Konzentrationsbestimmung	58
3.14.1	Analyse von Knochen.....	59
3.14.2	Analyse von Serum und Lösungen.....	59
3.15	Mikroradiographische Untersuchung muriner Knochen.....	59
3.16	Analyse der OPUS-Auswahlkohorte.....	61
3.17	Statistische Analysen.....	62
4	Ergebnisse.....	63
4.1	Das Spurenelement Selen im murinen Knochen	64
4.1.1	Analyse der Ossifikation in allen <i>Sepp</i> -Mausgruppen.....	64
4.1.2	Ermittlung der Se-Konzentrationen im Knochen von <i>Sepp</i> -Mäusen.....	67
4.1.3	Lokalisation von Se in der Knochenmatrix.....	69
4.2	Expression der Selenoproteingene und Faktoren des Selenoproteinmetabolismus	69
4.2.1	Analyse der Selenoprotein-Genexpression im Knochen.....	70
4.2.2	Vergleich der Expressionsmuster aller gebildeten Selenoproteingene..	71
4.2.3	Expression und Lokalisierung von <i>Sepp</i> in murinen Organen	72
4.2.4	Hepatisches SePP als Transporter in den Knochen?	74
4.2.5	Bestimmung der Enzymaktivitäten im Femur der <i>Sepp</i> -Mäuse	75
4.2.6	Der <i>Sepp</i> -Genotyp und die Expression wichtiger Gene des Selenoproteinmetabolismus	77
4.3	Erfolgt im Knochen eine Rezeptor-vermittelte Se-Aufnahme?.....	79

4.3.1	Untersuchung der Expression aller Sepp-Rezeptoren im Knochen.....	80
4.3.2	<i>in vitro</i> -Analyse der SePP-Apoer2-Interaktion	81
4.4	Analyse der Mineralisierung im Knochen der <i>Sepp</i> -Mäuse	84
4.5	Zusammenhang von Spurenelementen mit Parametern des Knochenstoffwechsels	86
5	Diskussion	93
5.1	Das Spurenelement Selen im murinen Knochen	95
5.2	Hepatisches SePP als Se-Transporter in den Knochen	96
5.3	Expression des Sepp-Rezeptor Apoer2 im Knochen.....	96
5.4	Expression der Selenoproteine und der des –Metabolismus.....	98
5.4.1	Einfluss von Se-Mangel auf die Selenoprotein-Transkripte	98
5.4.2	Regulierung der Se-bindenden Proteine in <i>Sepp</i> -KO-Mäusen	100
5.5	Knochenmorphologie und Se-Status	101
5.5.1	Verlangsamte Ossifikation in <i>Sepp</i> -KO-Mäusen.....	101
5.5.2	Ossifikation und Dejodasen	103
5.5.3	Ossifikation und antioxidative Selenoproteine	105
5.5.4	<i>Sepp</i> -Genotyp, Geschlecht und Knochenmineralisierung	106
5.6	Einfluss von Spurenelementen auf die Knochengesundheit in der OPUS- Kohorte	107
5.7	Fazit und Ausblick.....	110
6	Literaturverzeichnis	112
7	Anhang	126
	Abbildungsverzeichnis	127
	Tabellenverzeichnis	129
	Liste der Publikationen und Präsentationen	131
	Eidesstattliche Erklärung	132

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius	FGF23	<i>Fibroblast Growth Factor 23</i>
µg	Mikro	FN	<i>Femoral neck</i> (Oberschenkelhals)
A	Ampere	g	Gramm / Erdbeschleunigung
Abb.	Abbildung	Gln	Glutamin
ALP	Alkalische Phosphatase	Gluc	Glucose
ApoER2	Apolipoprotein E Rezeptor 2	GPx	Glutathionperoxidase
APS	Ammoniumperoxodisulfat	GR	Glutathionreduktase
AS	Aminosäure	GSH	Glutathion
ATP	Adenosintriphosphat	GSSG	oxidiertes Glutathion
BMC	<i>Bone Mineral Content</i>	h	Stunde
BMD	<i>Bone Mineral Density</i>	HET	Heterozygot
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>	KBD	<i>Kashin Beck Disease</i> (Erkrankung)
bp	Basenpaare	KO	<i>Knockout</i>
BMI	<i>Bodymass Index</i>	L	Liter
BMU	<i>Basic Multicellular Unit</i>	LRP	<i>Low Density Lipoprotein receptor related protein</i>
bzw.	beziehungsweise	LS	Lendenwirbelsäule
ca.	circa	m	Milli
cDNA	<i>complementary DNA</i>	M	Molar
CI	<i>Clearance Index /</i> Konfidenzintervall	MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
CT	<i>Cycle of threshold</i>	Mock	Blindwert, Negativkontrolle
Cys	Cystein	mRNA	<i>messenger RNA</i>
d	Tag / Durchmesser	n	Nano
(d)dH ₂ O	(doppelt) destilliertes Wasser	Na ₂ SeO ₃	Natriumselenit
DEPC	Diethylpyrocarbonat	NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
d.h.	das heißt	NSEP1	<i>Nuclease Sensitive Element Binding Protein 1</i>
Dio	Dejodase	OB	Osteoblast
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	OC	Osteoklast
DMSO	Dimethylsulfoxid	OD	Optische Dichte
DTNB	5,5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure)	OPG	Osteoprotegerin
ECM	<i>Extracellular Matrix</i>	OPUS	<i>Osteoporosis and Ultrasound Study</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	PBS(-T/B)	<i>Phosphate Buffered Saline (TWEEN/BSA)</i>
EFSec	<i>Sec-specific elongation factor</i>	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
eIF4a3	<i>eukaryotic Initiation Factor 4a3</i>	PINP	Prokollagen Typ I N-terminales Propeptid
ER	Endoplasmatisches Retikulum	ppm	<i>parts per million</i>
<i>et al.</i>	und andere	PSTK	Phosphoseryl-tRNA-Kinase
FABP1	<i>Fatty Acid Binding Protein 1</i>	RANK(L)	<i>Receptor Activator of NF-κB (Ligand)</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>	RDA	<i>Recommended Daily Allowance</i>

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>	SPSECS	Sec-tRNA ^{[Ser]^{Sec}-Synthetase}
RNA	Ribonukleinsäure	T3	3,5,3'-Triiod-L-thyronin
ROH	Alkohole	T4	3,3',5,5'-Tetraiod-L-thyronin
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>	Tab.	Tabelle
rpm	<i>Rounds per Minute</i>	TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
RT	Raumtemperatur	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
s	Sekunde	TNB	5-Thio-2-Nitrobenzoesäure
sβCTx	Typ I Kollagen C-terminales Telopeptid	TRFA	Totalreflexions- Röntgenfluoreszenzanalyse
SBP2	<i>SECIS Binding Protein 2</i>	tRNA	<i>transfer</i> RNA
SBP2L	<i>SBP2-like</i>	TrxR	Thioredoxinreduktase
SD	Standardabweichung	Trx	Thioredoxin
SDS	Natriumdodecylsulfat	TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon (Thyrotropin)
Sebp1	<i>Selenium Binding Protein 1</i>	U	Enzymeinheit
Sec	Selenocystein	u.a.	unter anderem
SecS	Selenocystein-Synthase	Ü.N.	Über Nacht
SECIS	<i>Sec Insertion Sequence</i>	uNTx	Urin Kollagen I N-terminales Telozeptid
SECp43	<i>tRNA Selenocysteine Associated Protein</i>	UTR	Untranslatierter Bereich
SEM	Standardfehler des Mittelwertes	UV	Ultraviolett
SeMet	Selenomethionin	V	Volt
SePP/Sepp	Selenoprotein P	VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
SepSecS	<i>Sep (O-phosphoserine) tRNA:Sec (selenocysteine) tRNA-Synthase</i>	v/v	Volumen pro Volumen
Ser	Serin	WT	Wildtyp
SerRS	Seryl-tRNA-Synthetase	w/v	Gewicht pro Volumen
siRNA	<i>silencing</i> RNA	z.B.	zum Beispiel
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>	z.T.	zum Teil
SPS2	Selenophosphat-Synthetase 2		

Die Bezeichnung der Gene und Proteine richtete sich nach den offiziellen Vorgaben und wie sie unter NCBI vorzufinden sind. Gene und Transkripte werden in kursiv dargestellt, wobei humane Gene und Proteine zusätzlich in Großbuchstaben abgebildet werden.

Beispiel: Selenoprotein P

SePP: humanes Gen SePP: humanes Protein

Sepp: murines Gen Sepp: murines Protein

1 Einleitung

“Det bruna ämnet, som vid ammoniak-falternas fonderdelning affkiljt sig, blef nu ett föremål för underfökningen, och befanns, genom de förfök, som i det följande skola bekrivas, vara en egen, hittills okänd, brännbar mineralkropp, hvilken jag, för att utmärka, des flägtfkap i egenfkap med tellurium, kallat Selenium, af Σεληνη, måna.”, (Berzelius 1818).

“The brown substance, which the decomposition of the ammonium salts yielded, now became an object of investigation, and was found, through the experiments, which in the following will be described, to be separate, hitherto unknown, combustible mineral, which I, to mark its akin properties with tellurium, have named Selenium, from Σεληνη, moon (goddess).”, übersetzt ins Englische von E. Arner 2010 (Arner 2010).

Die Erforschung einer zentralen Bedeutung von Selen (Se) für die Knochenhomöostase rückt stetig mehr in den Fokus der Wissenschaft. So deuten tierexperimentelle Arbeiten und humane Studien auf eine tragende Rolle von Se für die Knochengesundheit hin, jedoch ist nur wenig über das Vorhandensein des essentiellen Spurenelementes *per se* im Knochen bekannt. Die Bedeutung des Se-Status und des Se-transportierenden Plasmaproteins „Selenoprotein P“ (SePP) für die Knochenentwicklung und den Knochenmetabolismus wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

1.1 Das essentielle Spurenelement Selen

1.1.1 Selen im Wandel der Zeit

Mit den vorherig zitierten Worten hat der schwedische Chemiker Jöns Jacob Berzelius (1779-1848) das erste Mal das neu identifizierte Element beschrieben und ihm den Namen Selen gegeben. Die Entdeckung des metalloiden Minerals geschah zufällig bei der Produktion von Schwefelsäure im Bleikammerschlamm, nachdem Berzelius mit zwei weiteren Wissenschaftlern eine Schwefelsäurefabrik in Gripsholm gekauft hatte (Arner 2010). Die starke Ähnlichkeit zu dem 1780 entdeckten Tellur (lat. *tellus*, Erde, Te) wurde ihm schnell bewusst und in Anlehnung an die silbrige Erscheinung des Elementes, benannte er es nach der griechischen Mondgöttin *Selene*. In dieser ersten Se-Publikation erwähnte Berzelius bereits die starke chemische Ähnlichkeit zwischen Se und Schwefel (S), welche zweifelsohne eine Beziehung zu den, damals noch unbekanntem, Selenocystein (Sec)- sowie Cystein (Cys)- enthaltenden Proteinen herstellte (Abschnitt 1.2.1) (Arner 2010).

Über viele Jahrzehnte hinweg wurde Se ausschließlich als ein hoch toxisches Element angesehen (Rosenfeld and Beath 1945; Taboury 1945). Ein Industriegift, das im Mensch und Viehbestand Selenintoxikationen (Selenosen) hervorruft. In Huftieren führte der Verzehr Se-akkumulierender Pflanzen zu der in den 1930iger Jahren bekannten „Alkali-Krankheit“ mit deformierten Hufen und Haarausfall (O'Toole and Raisbeck 1995). Eine Selenose zeigt sich im Menschen u.a. mit dem Verlust der Haare und Fingernägel, Durchfall und einem knoblauchartigen Geruch des Atems (Goldhaber 2003; Sutter *et al.* 2008). Neben dem toxischen Potential wurden Se

zudem karzinogene Eigenschaften zugeordnet (Nelson *et al.* 1943). Der Wandel von einer toxischen Substanz hin zu einem essentiellen Spurenelement vollzog sich zwischen den Jahren 1954-1957 (Abb. 1.1).



Abb. 1.1: Die Bedeutung von Se im Wandel der Zeit. Se wurde über viele Dekaden hinweg als ein hoch toxisches Element mit karzinogenen Eigenschaften angesehen. Die Sichtweise änderte sich mit den Forschern Schwarz und Foltz, die Se als ein essentielles Spurenelement in Säugetieren identifizierten, welches sogar antikarzinogene Effekte aufweist. Neben einer wichtigen Bedeutung in der Ernährung wird Se nun auch eine gesundheitsfördernde Funktion zugesprochen (modifiziert nach Vernie (Vernie 1984) und Köhrle (Köhrle 1999)).

Pinsent beschrieb die Notwendigkeit einer Selenit-Zugabe in der Synthese der Formiat-Dehydrogenase in Prokaryoten (Pinsent 1954). Wenige Jahre später konnte die Gruppe um Schwarz und Foltz eine essentielle Bedeutung von Se auch in Säugetieren nachweisen, indem sie es als Bestandteil des sogenannten "Faktor 3" identifizierten, welcher einen protektiven Effekt auf experimentell induzierte Lebernekrosen im Rattenmodell zeigte (Schwarz 1951; Schwarz and Foltz 1999). 1973 wurde Se in unabhängigen Studien als Bestandteil von Proteinen nachgewiesen: in der bakteriellen Glycinreduktase (Turner and Stadtman 1973) und der Glutathionperoxidase (GPx) in Säugetieren (Flohe *et al.* 1973; Rotruck *et al.* 1973). In diesem Zusammenhang wurde auch der Begriff Selenoprotein geprägt, d.h. ein Protein, das Se in seiner Primärstruktur enthält (Flohe *et al.* 1973; Turner and Stadtman 1973). Cone *et al.* konnten wenige Jahre später Sec als die Se-Komponente in der Glycinreduktase nachweisen (Cone *et al.* 1976). Die enorme

Bedeutung eines ausreichenden Se-Status im Menschen konnte 1979 durch eine unbekannte chinesische Forschungsgruppe beschrieben werden. Sie entdeckte, dass die Keshan-Krankheit ein auf Se-Mangel basierendes Syndrom darstellt (Flohe 2009; unknown authors 1979). Hierbei handelt es sich um eine endemische Kardiomyopathie in China, deren Inzidenz durch Se-Supplementationen verringert werden konnte (Li *et al.* 2013; unknown authors 1979). Wenige Jahre später wurden auch der myxödematöse Kretinismus (Schilddrüsenhormonmangel) und die Kashin Beck Erkrankung (*Kashin Beck disease*, KBD) mit einer Se-Defizienz in Zusammenhang gebracht (Yang *et al.* 1988; Vanderpas *et al.* 1990). Auf KBD, einer endemischen Osteoarthritis, wird im Abschnitt 1.4.5 intensiver eingegangen.

Die Entdeckung von Se und die Identifizierung der Selenoproteine legte die Basis für die weitere und intensivere Erforschung der Bedeutung von Se für die menschliche Gesundheit. Heutzutage ist bekannt, dass Se eine wichtige Funktion in der menschlichen Gesundheit ausübt (Rayman 2012). Eine Assoziation von niedrigem Se-Status mit einem erhöhten Risiko für Infektionen und Krebs wird kontrovers diskutiert, von einer Mehrheit der durchgeführten tierexperimentellen und Humanstudien jedoch bestätigt (Beck *et al.* 2003; Davis *et al.* 2012). So konnte in Experimenten gezeigt werden, dass in der Sepsis und bei Nierenkrebs die Mortalität mit dem Se-Status invers korreliert (Angstwurm *et al.* 2007; Meyer *et al.* 2012). Damit hat die Se-Supplementation in der medizinischen Praxis ein breites Potential, z.B. in der Prävention und Behandlung von Krebs- und Herzerkrankungen, Inhibition der viralen Expression und in der Verbesserung der Immunantwort sowie der männlichen Fertilität. Doch der Leitsatz von Paracelsus "*dosis facit venenum*" (die Dosis macht das Gift) sollte weiterhin im Kopf behalten werden, damit aus den protektiven Effekten im physiologischen Bereich keine Vergiftungserscheinungen werden.

1.1.2 Vorkommen und Verbreitung des Selens

Als ein Vertreter der Chalkogene befindet sich Se (Ordnungszahl 34) im Periodensystem in der VI. Hauptgruppe zwischen Schwefel und Tellur, mit denen es viele Ähnlichkeiten teilt. Das Halbmetall Se kommt in der Natur nur selten in seiner elementaren Form vor (z.B. in dem Mineral Pyrit), aber es ist weitverbreitet in der

Erdkruste mit einer durchschnittlichen Konzentration von 0,09 mg/kg (Mehdi *et al.* 2013).

Die Anwendungsmöglichkeiten von Se sind vielfältig, u.a. in der Elektro-Industrie (z.B. Halbleiterherstellung), der Kosmetik (z.B. Anti-Schuppenshampoo, *Anti-Aging*) und der Landwirtschaft (Nahrungs- und Düngemittelzusatz) (Robinson and Yaffe 1956; Combs 2001; Flohe 2009). Letzteres stellte sich als sinnvoll heraus, da die Se-Konzentrationen in den Böden weltweit zwischen 0,1-2,0 µg Se/kg schwankt (Combs 2001). Aufgrund einer unzureichenden Se-Versorgung aus natürlichen Ressourcen zählen weite Bereiche der Erde zu sogenannten Selenmangelgebieten (z.B. weite Teile Europas und Asiens), in denen eine erhöhte Prävalenz für einen niedrigen Se-Status vorliegt (Tab.1.1) (Combs 2001).

Tab. 1.1: Selen-Status weltweit sowie Prävalenz für einen niedrigen Se-Status.

Prävalenz für einen niedrigen Se-Status ¹		Se-Einnahme	
Staat (Beispiele)	Prävalenz-Kategorie	Staat (Beispiele)	Se [µg/Person/d]
Chile, China, Deutschland, Estland, Kuba, Neuseeland, Niger, Österreich, Polen	Hoch (>50%)	China ² Deutschland Neuseeland	7-11 35 19-80
Australien, Bolivien, England, Frankreich, Indien, Russland, Schweiz, Türkei	Moderat (10-50%)	England Russland Schweiz	12-43 54-80 70
Ägypten, Burundi, Finnland, Japan, Kanada, Korea, Norwegen, Schottland, USA	Niedrig (<10%)	Finnland Japan USA	67-100 104-127 60-220

¹basierend auf einem Plasma- oder Serum-Se-Level von <70 µg/L (Combs 2001).

²Gebiet, in dem die Keshan-Krankheit verstärkt verbreitet ist.

Im Gegensatz dazu existieren hoch Se-haltige Böden mit bis zu 90 mg Se/kg (North Dakota, USA) (Combs 2001). Dementsprechend variiert der Se-Status bedeutend zwischen den Populationen weltweit, denn ein geringes Se-Vorkommen im Boden, der für die landwirtschaftliche Produktion von Nahrung genutzt wird, hat als direkte Konsequenz eine ungenügende Se-Versorgung durch die Ernährung (Rayman 2008). Die globale diätisch aufgenommene Se-Zufuhr rangiert zwischen 7-220 µg Se/Tag (Tab. 1.1) (Combs 2001). Auffällig ist, dass auch Deutschland mit 35 µg Se/Person/d zu den Se-unterversorgten Ländern zählt. Die empfohlene tägliche Dosis (RDA, *recommended daily allowance*) von Se liegt in Europa dagegen bei

55 µg (Richtlinie 2008/100/EG, Kommission der Europäischen Gemeinschaft) und kann durch den Verzehr Se-reicher Nahrungsmittel wie Meeresfrüchten, Fleisch, Getreide und Paranüsse positiv beeinflusst werden. Neben dem geografischen Wohnort und der Ernährung hängt der Se-Status zusätzlich von Geschlecht, Alter und Genotyp ab (Combs 2001; Diwadkar-Navsariwala and Diamond 2004; Schomburg and Schweizer 2009; Steinbrecher *et al.* 2010). Somit schwankt der absolute Se-Gehalt im Körper von Individuum zu Individuum und rangiert zwischen 3-20 mg (Fan *et al.* 1988).

1.1.3 Der Selen-Metabolismus

Der Körper nimmt Se über die Nahrung als organische bzw. anorganische Verbindung auf. Zu den anorganischen Se-Formen zählen Selenat- und Selenit-Salze (hauptsächlich im Boden) und zu den organischen Verbindungen v.a. Selenomethionin (SeMet) sowie Sec. Nach der Aufnahme über den Darm werden die Se-Formen mit einer ähnlichen Rate resorbiert (70-95%) (Wolffram 1995). Sec wird hauptsächlich von der Leber aufgenommen und verstoffwechselt. Selenat sowie SeMet gelangen fast unverändert in die Blutzirkulation, während Selenit bereits von Darmzellen intrazellulär metabolisiert wird (Hasegawa *et al.* 1995; Whanger *et al.* 1996). Der Se-Metabolismus ist schematisch in der Abb. 1.2 dargestellt. SeMet ist hauptsächlich in Pflanzen vorzufinden und wird im Säugerorganismus unspezifisch in SeMet-haltige Proteine, anstelle der Aminosäure (AS) Methionin, eingebaut (SeMet-Zyklus) (Burk *et al.* 2001). Alternativ dazu kann SeMet durch Transselenierung zu Sec umgewandelt und neben Selenat sowie Selenit zum toxischen Selenwasserstoff (H_2Se) reduziert werden. Die Detoxifizierung erfolgt über Methylierungsschritte, sodass es als Dimethylselenid und Trimethylselenonium-Ion über die Atemluft oder den Urin exkretiert wird. Überschüssiges Se wird auch als Selenozucker über den Urin ausgeschieden. Daneben kann H_2Se in der Leber kotranslational in Selenoproteine eingebaut werden (Selenoprotein-Zyklus). Hierzu wird phosphoryliertes H_2Se mit der zuvor ebenso phosphorylierten und aktivierten $tRNA^{[Ser]Sec}$ zu $Sec-tRNA^{[Ser]Sec}$ vereint, damit es für die Selenoproteinbiosynthese verwendet werden kann (siehe auch Abschnitt 1.2.2) (Hoefig *et al.* 2011).

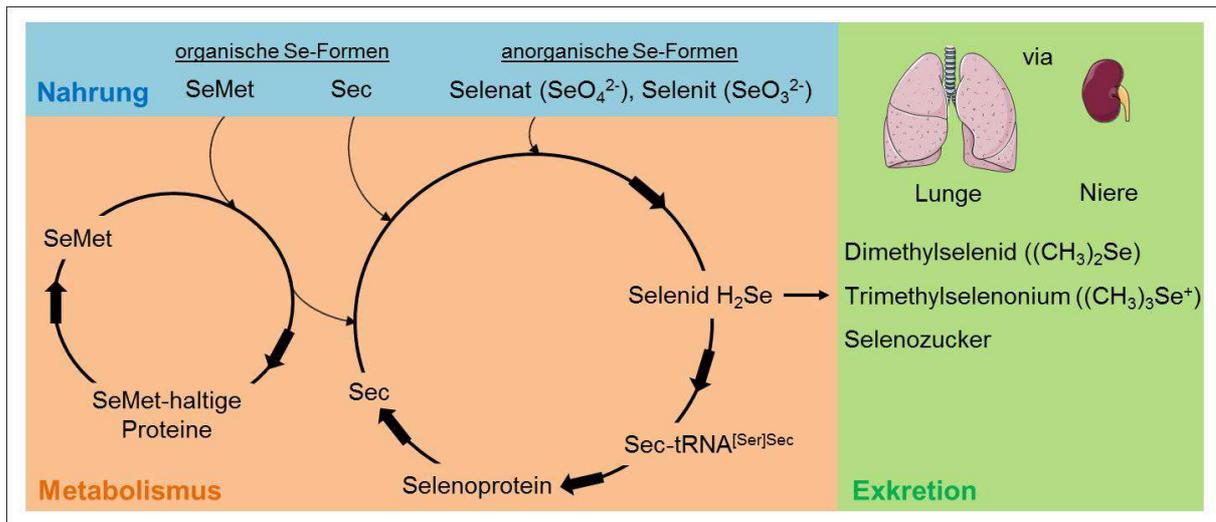


Abb. 1.2: Vereinfachte Darstellung des Se-Stoffwechsels. Se wird in Form der AS Selenomethionin (SeMet) und Selenocystein (Sec) bzw. als anorganisches Selenat und Selenit mit der Nahrung aufgenommen. SeMet kann über den SeMet-Zyklus, anstelle von Methionin, unspezifisch in Proteine eingebaut werden. Daneben kann SeMet mittels Transselenierung zu Sec umgewandelt werden und wird so neben Selenat und Selenit in der Leber zu Selenwasserstoff (H_2Se) reduziert. Das toxische H_2Se kann nun als Dimethylselenid und Trimethylselenonium-Ion über die Atmung oder den Urin ausgeschieden werden. Überschüssiges Se wird in Form von Selenozucker über den Urin exkretiert. Im Selenoprotein-Zyklus werden phosphoryliertes H_2Se sowie $\text{tRNA}^{[\text{Ser}]\text{Sec}}$ zu Sec-tRNA^{[Ser]Sec} vereint, welches dann für die Biosynthese von Selenoproteinen (detaillierte Beschreibung Abb. 1.3) verwendet werden kann. Selen aus Sec von degradierten Selenoproteinen wird vermutlich über die Selenocysteinylase bereitgestellt. Teile der Abb. sind aus der Medical Servier Datenbank. Modifiziert nach (Schauder and Ollenschläger 2006; Suzuki *et al.* 2006; Hoefig *et al.* 2011).

Sec aus degradierten Selenoproteinen kann nun wiederverwendet und in die Produktion neuer Selenoproteine einfließen. Es wird vermutet, dass die Selenocysteinylase die Abspaltung des Se-Atoms aus Sec katalysiert, indem es Se bindet und in den Nucleus für weitere Proteinbiosynthesen transportiert (Kurokawa *et al.* 2011).

1.2 Selenoproteine und Selen-bindende Proteine

1.2.1 Selenoproteine und ihre Funktionen

Selen übt seine Effekte hauptsächlich in Form der 21. proteinogenen AS Sec aus, deren gezielter Einbau in neu synthetisierte Proteine über den genetischen Code festgelegt wird (Bock *et al.* 1991; Hatfield and Diamond 1993). Der Einbau des Sec in die wachsende Polypeptidkette ist ein kotranslatonaler Prozess und führt zu der Bildung der Selenoproteine.

Tab. 1.2: Übersicht der humanen Selenoproteine, deren Lokalisation und Funktion¹.

Selenoprotein		Lokalisation im Gewebe	Funktion
Glutathionperoxidasen			Reduktion von Hydroperoxiden
Zytosolische GPx	GPx-1	ubiquitär	} Antioxidative Enzyme und Strukturprotein in Spermien
Gastrointestinale GPx	GPx-2	gastrointestinal	
Plasma GPx	GPx-3	v.a. Plasma, Niere	
Phospholipidhydroperoxid GPx	GPx-4	ubiquitär	
Glutathionperoxidase 6	GPx-6 [#]	Riechepithel, Embryo	
Iodothyronindejodasen			Schilddrüsenhormon-Metabolismus
5'-Dejodase Typ 1	Dio1	v.a. Schilddrüse, Leber, Niere	Aktivierung und Inaktivierung der Schilddrüsenhormone sowie von deren Metaboliten
5'-Dejodase Typ 2	Dio2	v.a. Gehirn	
5'-Dejodase Typ 3	Dio3	v.a. Gehirn, Plazenta	
Thioredoxinreduktasen			Reduktion von Thioredoxin
Zytoplasmatische/Nukleäre TrxR	TrxR1	weit verbreitet	Redoxregulation
Mitochondriale TrxR	TrxR2	weit verbreitet	
Testikuläre TrxR (TGR)	TrxR3	v.a. Hoden	
Weitere Selenoproteine			Se-Transport und -Speicherung
Selenoprotein P	SePP	v.a. Leber	Speicherung/Transport von Se
			Sec-Synthese
Selenophosphat-Synthetase 2	SPS2	weit verbreitet	Synthese der Selenophosphate
			Antioxidation/Redoxregulation
Selenoprotein H	SeIH	weit verbreitet	Antioxidans
Selenoprotein W	SeIW	weit verbreitet	Redoxregulation
Methionin-R-Sulfoxid (SeIR)	MsrB1	v.a. Leber, Niere	Redoxregulation
			Qualitätskontrolle/Proteinfaltung
Selenoprotein S	SeIS	weit verbreitet	ER-Stress, Proteindegradation
Selenoprotein 15	Sep15	u.a. Leber, Niere	Proteindegradation
Selenoprotein K	SeIK	Herz, Milz, Hoden	Glykoproteinfaltung
			Vermutete Funktionen
Selenoprotein I	SeII	weit verbreitet	Phospholipidsynthese
Selenoprotein M	SeIM	Gehirn	Regulierung Körpergewicht/ Energiemetabolismus
Selenoprotein N	Sepn	v.a. Muskel	Regulation Ca ²⁺ -Mobilisierung
Selenoprotein T	SeIT	weit verbreitet	Regulation Ca ²⁺ -Mobilisierung/ Redox-Funktion
Selenoprotein V	SeIV	Hoden	Redox-Funktion/Spermatogenese
Selenoprotein O	SeIO	unbekannt	unbekannt

¹ (Kryukov *et al.* 2003; Papp *et al.* 2007; Reeves and Hoffmann 2009; Kasaikina *et al.* 2011; Shchedrina *et al.* 2011; Moustafa and Antar 2012; Park *et al.* 2012; Varlamova and Novoselov 2012; Pitts *et al.* 2013).

[#] *Gpx6* codiert ein Cys-Ortholog in Nagetieren, dessen Selenoproteom 24 Proteine umfasst.

Bisher sind mehr als 100 Selenoproteine in mehr als 50 Selenoprotein-Familien bekannt, in allen drei Domänen des Lebens: in Prokaryoten, Eukaryoten und

Archaen (Papp *et al.* 2007; Mariotti *et al.* 2013; Romagne *et al.* 2014). Lediglich Pflanzen und Pilze (z.B. Hefe) können auf den Einbau von Sec verzichten. Die Anzahl der Selenoproteine variiert je nach Organismus. Das größte derzeit bekannte Selenoproteingenom besitzt die Alge *Aureococcus anophagefferens* mit 59 Genen (Gobler *et al.* 2013), während im Menschen ein Set von 25 und in Nagern von 24 Selenoproteingenen bekannt ist (Kryukov *et al.* 2003). Eine Auflistung aller bekannten humanen Selenoproteine und deren Funktionen ist der Tab. 1.2 zu entnehmen. Die bestcharakterisierten Selenoproteine sind die antioxidativ-agierenden GPx und Thioredoxinreduktasen (TrxR) sowie die in dem Schilddrüsenhormon-Metabolismus involvierten Iodothyronindejodasen (Dio); diese Enzyme katalysieren z.B. die Konvertierung des inaktiven 3,3',5,5'-Tetraiod-L-thyronin, T₄, in das aktive Hormon 3,3',5-Triiod-L-thyronin, T₃. Daneben existieren eine Reihe gut untersuchter Selenoproteine mit Funktionen in der Qualitätskontrolle von Proteinen (z.B. SelS, SelK, Sep15) sowie das Se-speichernde und transportierende Selenoprotein P (SePP), welches im Abschnitt 1.3 genauer beschrieben wird. Die Aufgaben einiger Selenoproteine im Organismus sind bis dato noch nicht bzw. nicht vollständig aufgeklärt, so dass noch von weiteren neu zu entdeckenden Funktionen der Selenoproteine ausgegangen werden kann.

1.2.2 Die Synthese von Selenocystein und der Selenoproteine

Die Vielzahl der Selenoproteine nutzt die Eigenschaften des Se- anstelle des S-Atoms im Zentrum der aktiven Domäne um Oxidations- und Reduktionsprozesse zu katalysieren. Die Inkorporation in die Selenoprotein-Polypeptidkette erfordert einen komplexen, spezifischen Mechanismus (Abb. 1.3). Der Einbau von Se muss somit einen klaren Vorteil gegenüber S aufweisen. Eine Idee wäre die "katalytische Erhabenheit" von Sec gegenüber Cys in Enzymen (Hatfield *et al.* 2011). Diese Vorstellung fußt auf den Studien von Sec→Cys-Mutationen in Enzymen, wobei deren katalytische Effizienz (k_{cat}) stark gesunken ist (Berry *et al.* 1992; Zhong and Holmgren 2000). Der Vergleich der physikochemischen Eigenschaften von Se und S zeigt einige Ähnlichkeiten (Tab. 1.3) (Wessjohann *et al.* 2007). Von biochemischer Relevanz ist einzig die erhöhte Polarisierbarkeit von Se und die erniedrigte Gleichgewichtskonstante (pK_s) von Selenol (R-SeH) im Sec im Vergleich zum Thiol

(R-SH) in Cys (Tab. 1.2). Dadurch haben Selenole eine andere pH-Abhängigkeit und sind bei viel niedrigeren, physiologischeren pH-Stufen reaktiver. Enzyme mit eingebautem Sec besitzen somit eine höhere Aktivität als homologe Cys-Vertreter (Johansson *et al.* 2005; Wessjohann *et al.* 2007).

Tab. 1.3: Allgemeine Eigenschaften von Se und S sowie Sec und Cys im Vergleich¹.

	Se	S
Atomradius (Å)	1,17	1,07
Atommasse	78,96	32,07
Elektronegativität	2,4	2,5
Oxidationsstufen	-2, 0, +4, +6	-2, 0, +4, +6
Polarisierbarkeit (Å)	3,8	2,9
	Sec	Cys
Struktur	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{}^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{Se}^- \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{}^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array}$
pK _s	5,2	8,3
Redoxpotentiale	-488 mV (2x Sec vs. Sec; pH7,0)	-233 mV (2x Cys vs. Cys; pH 7,0)
Stopp-Codon	UGA	UGU, UGC

¹(Johansson *et al.* 2005; Wessjohann *et al.* 2007); pK_s: Säurekonstante (Maß der Säurestärke)

Die Synthese von Sec erfolgt ungewöhnlicher Weise auf der eigenen AS-beladenen tRNA, die als tRNA^{[Ser]Sec} bezeichnet wird (Bock *et al.* 1991; Xu *et al.* 2007). In der Abb. 1.3 (A) ist die Sec-Biosynthese in Eukaryoten und Archaeen schematisch dargestellt. Selen wird innerhalb der Zelle freigesetzt und zu Selenid (in Form von HSe⁻) reduziert, worauf es unter ATP-Verbrauch mittels der Se-abhängigen Selenophosphat-Synthetase 2 (SPS2, ebenfalls ein Selenoprotein) zu Selenophosphat (SePO₃) umgewandelt wird (Xu *et al.* 2007). Parallel erfolgt durch Aminoacylierung die Beladung der 90 Nukleotid langen tRNA^{[Ser]Sec} mit einem Seryl-Rest. Diese Reaktion wird durch die Seryl-tRNA-Synthetase (SerRS) katalysiert. Durch Phosphorylierung mit der Phosphoseryl-tRNA-Kinase (PSTK) wird Seryl-tRNA^{[Ser]Sec} wiederum aktiviert (Carlson *et al.* 2004). Die Vereinigung der zwei energiereichen Substrate Selenophosphat und P-Ser-tRNA^{[Ser]Sec} zu Sec-tRNA^{[Ser]Sec} wird durch die Selenocystein-Synthase (SecS) katalysiert (Abb. 1.3 A) (Xu *et al.* 2007). Nach der Beladung mit Sec ist die tRNA komplett und bereit für die Selenoprotein-Biosynthese (Abb. 1.3 B).

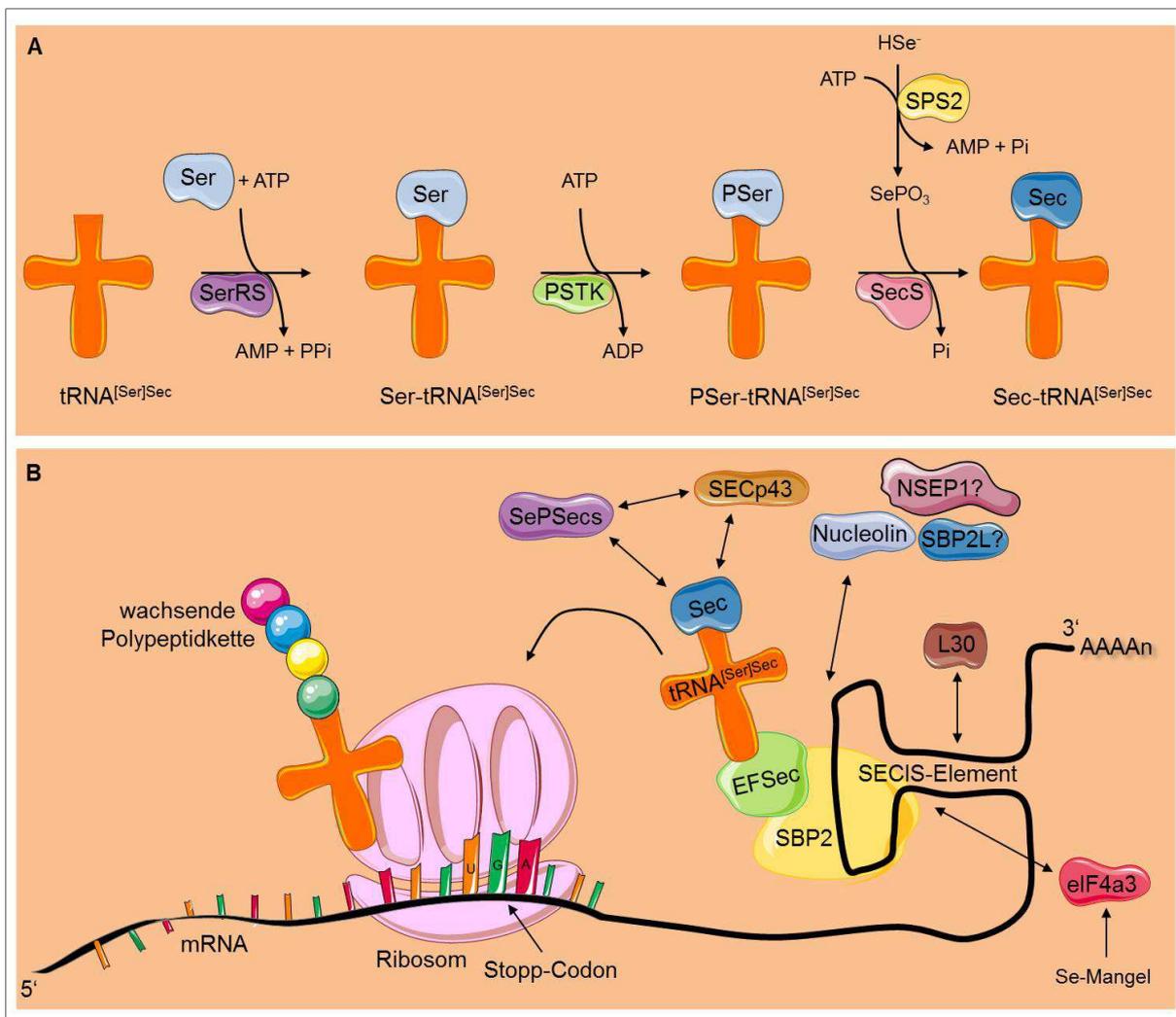


Abb. 1.3: Inkorporation von Se und die Selenoproteinbiosynthese. (A) Die Biosynthese von Sec. Die Beladung der tRNA mit Sec erfordert zunächst einige Aktivierungsprozesse. Während mit der Nahrung aufgenommenes Se zu Seleniden (in Form von HSe^-) reduziert und anschließend durch Selenophosphat-Synthetase 2 (SPS2) phosphoryliert wird, wird $\text{tRNA}^{\text{[Ser]Sec}}$ mittels der Seryl-tRNA-Synthetase (SerRS) mit einem Seryl-Rest beladen ($\text{Ser-tRNA}^{\text{[Ser]Sec}}$). Nach einer weiteren Katalyse durch die Phosphoseryl-tRNA-Kinase (PSTK) werden die zwei Substrate durch die Selenocystein-Synthase (SecS) zu $\text{Sec-tRNA}^{\text{[Ser]Sec}}$ vereint. Die Sec-beladene tRNA ist nun einsatzbereit für die Biosynthese der Selenoproteine **(B)**. Die Proteinbiosynthese stoppt im Allgemeinen, sofern das Ribosom das Stopp-Codon UGA auf der mRNA erreicht. Für die Biosynthese der Selenoproteine ist die Rekodierung von UGA erforderlich. Für die Insertion des Sec in die wachsende Polypeptidkette ist die als SECIS-Element bekannte Haarnadelstruktur notwendig. Nachdem das *SECIS binding protein 2* (SBP2) an das SECIS-Element gebunden hat, interagiert es mit dem *Sec-specific elongation factor* (EFSec), welcher zuvor $\text{Sec-tRNA}^{\text{[Ser]Sec}}$ gebunden hat. Durch diese Wechselwirkung und mit Hilfe des ribosomalen Proteins L30 kann sich die mRNA nun biegen und Sec wird in die Polypeptidkette eingebaut. Weitere *trans*-agierende Faktoren sind die *Sep (O-phosphoserine) tRNA:Sec (selenocysteine) tRNA-Synthase* (SepSecS), *tRNA Selenocysteine Associated Protein* (SECp43) und Nucleolin. Die Interaktion von *nuclease sensitive element binding protein 1* (NSEP1) und *SBP2-like* (SBP2L) ist dagegen noch unsicher. Bei Se-Mangel bindet der *eukaryotic Initiation Factor 4a3* (eIF4a3) selektiv an das SECIS-Element, blockiert die SBP2-Bindung und somit die Selenoproteinbiosynthese hierarchisch niedriggestellter Proteine. Teile der Abb. sind aus der Medical Servier Datenbank. Modifiziert nach (Allmang *et al.* 2009; Hatfield *et al.* 2011; Seeher *et al.* 2012).

Se wird in Form von Sec kotranslational in die wachsende Polypeptidkette des entsprechenden Selenoproteins eingebaut (Zinoni *et al.* 1986; Schomburg and Schweizer 2009). Für die Selenoprotein-Biosynthese ist die Rekodierung des UGA Stopp-Codons in ein Sec-Codon innerhalb des *open reading frame* der Selenoprotein-mRNA erforderlich (Zinoni *et al.* 1986; Mullenbach *et al.* 1988). Dieser Vorgang erfordert die Interaktion einer Vielzahl an der Biosynthese beteiligter sowie Sec-spezifischer *trans*- und *cis*-agierender Faktoren, einschließlich des *Sec insertion sequence* (SECIS)-Elementes auf dem Selenoprotein-Transkript (Berry *et al.* 1991; Allmang and Krol 2006). Ein weiterer wichtiger Faktor stellt die Sec-tRNA^{[Ser]Sec} dar, deren Sec-Beladung in der Abb. 1.3 (A) beschrieben ist. Das SECIS-Element bildet eine Haarnadelstruktur im 3'-Bereich der mRNA, die von dem essentiellen RNA-bindenden *SECIS binding protein 2* (SBP2) erkannt und gebunden wird (Allmang *et al.* 2009). Zwei Klassen an SECIS-Elementen sind in Eukaryoten bekannt: Form 1 mit einer klassischen Haarnadelstruktur (Expression von z.B. Dio1, GPx-1) und Form 2 mit einer zusätzlichen Schleife (Expression von z.B. Dio2, GPx-4) (Grundner-Culemann *et al.* 1999; Papp *et al.* 2007). Das *trans*-agierende SBP2 ist ein sehr wichtiger und limitierender Faktor der Selenoproteinbiosynthese, da es das SECIS-Element bindet, mit dem Ribosom interagiert und an der Sec-Insertion beteiligt ist (Low *et al.* 2000; Hatfield *et al.* 2011). Der *Sec-specific elongation factor* (EFSec) transportiert exklusiv die Sec-tRNA^{[Ser]Sec} zum Ribosom mit Selenoprotein-mRNA, wo es einen Komplex mit SBP2 bildet (Fagegaltier *et al.* 2000b; Tujebajeva *et al.* 2000). Zusätzliche Sec-abhängige Faktoren tragen schließlich zu der Insertion von Sec in die wachsende Selenoproteinkette bei (Abb. 1.3 B) (Allmang *et al.* 2009). Das *tRNA Selenocysteine Associated Protein of 43 kDa* (SECp43) und *Sep (O-phosphoserine) tRNA:Sec (selenocysteine) tRNA-Synthase* (SepSecS) scheinen mit Sec-tRNA^{[Ser]Sec} zu assoziieren (Xu *et al.* 2005), während das ribosomale Proteine L30 (das zweite SECIS-bindende Protein) an den SBP2-SECIS-Komplex bindet und vermutlich eine Biegung des SECIS-Elementes hervorruft. So könnte eine Interaktion zwischen dem Komplex und dem Ribosom ermöglicht werden (Matsumura *et al.* 2003; Chavatte *et al.* 2005). Daneben wird Nucleolin eine selektive Assoziation mit dem SECIS-Element zugesprochen, wodurch es als positiver Regulator der Biosynthese von Selenoproteinen mit essentiellen Funktionen fungiert (Squires *et al.* 2007; Miniard *et*

al. 2010). Die Beteiligung der Faktoren *nuclease sensitive element binding protein 1* (NSEP1) und *SBP2-like* (SBP2L) wird dagegen noch diskutiert (Fagegaltier *et al.* 2000a; Shen *et al.* 2006; Donovan and Copeland 2009).

Die Hierarchie der Selenoproteinexpression ermöglicht, dass bei Se-Mangel ausschließlich die essentiellen Selenoproteine gebildet werden (Schomburg and Schweizer 2009). SBP2 und Nucleolin scheinen teilweise an der bevorzugten Translation einiger Selenoproteine beteiligt zu sein, nur werden diese Proteine nicht durch Se reguliert (Hatfield *et al.* 2011). Die Charakterisierung des *eukaryotic Initiation Factor 4a3* (eIF4a3) konnte diese Lücke schließen. Das durch den Se-Status regulierte Protein kann selektiv die Biosynthese einiger Selenoproteine inhibieren, in dem es bevorzugt das SECIS-Element der Klasse 1 bindet und somit die Interaktion von SBP2 blockiert (Budiman *et al.* 2009).

1.2.3 Selen-bindende Proteine

Neben den SeMet- und Sec-inkorporierenden Proteinen existiert eine dritte Proteingruppe, die Se beinhaltet: die Selen-bindenden Proteine. Hierbei wird Se an das Polypeptid gebunden, aber nicht inkorporiert (Behne and Kyriakopoulos 2001; Kryukov *et al.* 2003). In der Literatur wurden zwei intrazellulär Se-bindende Proteine beschrieben: das 56 kDa große *selenium binding protein 1* (SeBP1) sowie das 14 kDa große *fatty acid binding protein 1* (FABP1) (Bansal *et al.* 1989b). Über die Aufgaben dieser Proteinen ist bis dato wenig bekannt, jedoch wird ihnen eine Funktion im Se-Metabolismus zugeschrieben, da sie in Markierungsexperimenten mit Se-Isotopen diese spezifisch binden (Bansal *et al.* 1989b). Es wird vermutet, dass SeBP1 als Tumorsuppressor agiert, da reduzierte SeBP1-Expressionen im Tumorgewebe (z.B. Darm, Leber) vorzufinden und mit der Tumorprogression assoziiert sind (Yang and Diamond 2013). Daneben interagiert SeBP1 mit dem Selenoprotein GPx1 und diese beiden Proteine werden invers reguliert (Fang *et al.* 2010; Yang and Diamond 2013). Über eine Verbindung von FABP1 und Se ist bis heute noch weniger bekannt. Einzig Bansal *et al.* schließt ebenso auf eine Funktion von FABP1 und Se in der Inhibierung des Zellwachstums in Bezug auf eine Tumorprogression (Bansal *et al.* 1989a).

1.2.4 Hierarchie der Se-Versorgung und Selenoproteinexpression

Die Hierarchie der Selenoproteinexpression sorgt dafür, dass essentielle Selenoproteine begünstigt gebildet, während weniger bedeutende Selenoproteine nur auf relativ geringem Niveau exprimiert werden (Lei *et al.* 1995; Bermano *et al.* 1996; Wingler *et al.* 1999; Weiss Sachdev and Sunde 2001). *Knockout*-Studien in Mäusen konnten belegen, dass die Expression von GPx4, TrxR1 und TrxR2 essentiell für das Überleben ist (embryonale Letalität), während *GPx1*-, *Dio1*- und *Sepp*-defiziente Tiere lebend geboren werden (Schomburg and Schweizer 2009). So scheint die physiologische Bedeutung der Selenoproteine für den Organismus auch ihre hierarchische Einstufung zu bestimmen. Die bevorzugten auch bei Se-Mangel exprimierten Selenoproteine werden dabei als sogenannte *housekeeping* Selenoproteine bezeichnet und die weniger essentiellen, sehr sensitiven Vertreter als Stress-relevante Selenoproteine (Schomburg and Schweizer 2009). Zellen erkennen bei Se-Mangel, wo das essentielle Spurenelement bevorzugt benötigt wird. Eine derartige Regulation des Se-Status konnte neben der Selenoproteinexpression auch auf Organebene beobachtet werden (Arthur *et al.* 1996). Während die Se-Konzentration z.B. im Serum, der Leber und Niere bei reduzierter Se-Einnahme sinkt, sind das Zentralnervensystem und endokrine Organe, wie Hypophyse, Ovar oder Hoden, resistent gegenüber begrenzter Se-Versorgung bzw. einem ausgeprägten Se-Mangel (Behne and Kyriakopoulos 1993). Dieser Mechanismus sorgt dafür, dass selbst in Zeiten akuter Se-Defizienz die wichtigsten Se-abhängigen Prozesse im Organismen ablaufen können (Schomburg and Schweizer 2009).

1.2.5 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Selenoproteinforschung

In der Forschung und für klinische Studien (z.B. Testung neuer Medikamente) wird vornehmlich mit männlichen Versuchstieren bzw. Probanden gearbeitet (Schmucker and Vesell 1993). Doch schon im täglichen Leben und aufgrund der gesammelten Lebenserfahrungen wissen Männer und Frauen, dass sie sich emotional und physiologisch unterscheiden. Entsprechend sollte auf die Mann-Frau-Unterschiede in den Lebenswissenschaften geachtet werden. Bei der Erforschung der Se-Homöostase in Mensch und Tier sind die Wissenschaftler auf weitreichende Unterschiede zwischen den Geschlechtern gestoßen.

Bei der Se-Supplementation in männlichen und weiblichen Se-defizienten Ratten wurde beobachtet, dass Weibchen Se effektiver in den meisten Organen beibehalten als die Männchen, mit Ausnahme der Gonaden (Brown and Burk 1973). Reifende Spermien wurden bevorzugt mit Se versorgt, was z.B. unbewegliche oder abwesende Spermien bei Se-Mangel erklären konnte (McCoy and Weswig 1969; Brown and Burk 1973). Diese bedeutende Rolle von Se konnte jedoch nur für die männliche Reproduktion beschrieben werden. Riese *et al.* beobachteten gewebsspezifische Expressionsunterschiede der Selenoproteine in männlichen und weiblichen Tieren (Riese *et al.* 2006). So hatten weibliche Tiere erhöhte *Dio1* mRNA-Level in der Niere und Leber im Vergleich zu den Männchen. Die Dio1-Aktivität war letztendlich nur in der Niere der Weibchen erhöht, aber nicht in der Leber. Dies lässt auf eine differenzierte Regulation der Selenoprotein-Translation oder –Stabilität in männlichen und weiblichen Geweben schließen. Die Translationseffizienz könnte dabei vom Se-Status und Geschlecht abhängig und auf posttranskriptioneller Ebene reguliert sein (Riese *et al.* 2006; Schomburg *et al.* 2007). Weitere geschlechtsspezifische Unterschiede wurden während der Se-Supplementation in Sepsis-Patienten beobachtet, wobei die Mortalitätsrate um über 40% gesenkt werden konnte (Angstwurm *et al.* 2007). Jedoch war dieser Effekt deutlich stärker in den männlichen Teilnehmern (Schomburg 2007b). Ähnliche geschlechtsspezifische Assoziationen fanden sich bei Studien zum Se-Status und Blutdruck (Nawrot *et al.* 2007; Schomburg 2007a). Dagegen ist ein SNP in SelS ausschließlich in Frauen mit einem erhöhten Risiko an der Entstehung koronarer Herzerkrankungen assoziiert (Alanne *et al.* 2007) und signifikante Assoziationen zwischen Se-Status und Schilddrüsenerkrankungen finden sich durchgehend nur bei Frauen, nicht aber bei Männern (Derumeaux *et al.* 2003; Rasmussen *et al.* 2009; Schomburg 2011).

1.3 Das Selen-transportierende Selenoprotein P

1.3.1 Bedeutung und Funktion von Selenoprotein P (SePP)

Selenoprotein P (SePP) ist ein extrazelluläres, ubiquitär exprimiertes Glykoprotein, dessen Transkript als einziges Selenoprotein 10 Sec-Codons besitzt, die kotranslational mit Hilfe von zwei SECIS-Elementen rekodiert werden. SePP setzt

sich aus zwei Domänen zusammen, wobei der N-terminalen Thioredoxin-ähnlichen Domäne (244 AS) mit einem Sec-Codon eine enzymatische Funktion zugesprochen wird und dem aus neun Sec-Resten bestehenden C-Terminus (121 AS) die Se-Versorgung (Abb. 1.4) (Saito *et al.* 2004).

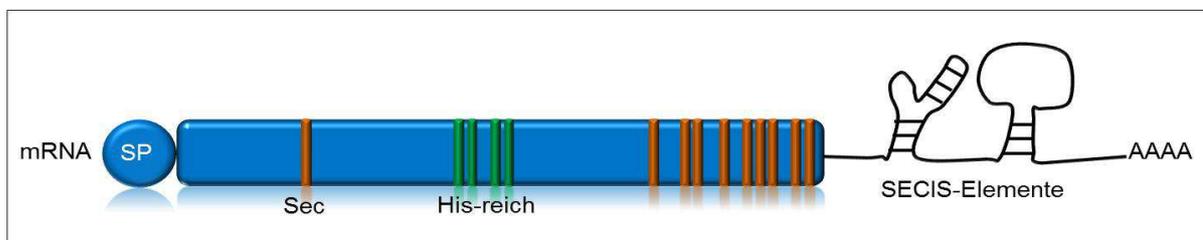


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der SePP-mRNA-Struktur. SePP setzt sich aus zwei Domänen zusammen: dem N-Terminus mit einem Sec-Rest und dem neun Sec-Reste enthaltenden C-Terminus, der die Transportfunktion von Se übernimmt. Das Signalpeptid (SP) am N-Terminus dirigiert die SePP-Biosynthese zum Endoplasmatischen Retikulum. Den zwei His-reichen Domänen wird eine Funktion in der Assoziierung an die extrazelluläre Matrix (ECM) nachgesagt. Eine zusätzliche Besonderheit stellen die zwei SECIS-Elemente dar. Adaptiert aus Hatfield *et al.* (2011).

Als potentielle Funktionen wurden zusätzlich eine Schwermetallbindung (z.B. Cd und Hg) und antioxidativer Schutz der Zellen und ECM während einer Inflammation beschrieben (Suzuki *et al.* 1998; Burk and Hill 2009). In gesunden gut versorgten Individuen umfasst SePP rund 50% des Se im Plasma und ist neben GPx3 das zweite Plasma-Selenoprotein (Burk and Hill 2005). Die Konzentrationen an Se und SePP im Serum korrelieren über einen weiten Bereich mit dem diätisch aufgenommenen Se. Folglich stellt die Bestimmung des Serum SePP-Gehaltes einen geeigneten diagnostischen Biomarker einer adäquaten Se-Versorgung dar. Bei einer ausreichenden Se-Versorgung setzt eine Sättigung der SePP-Biosynthese ein, die dadurch unabhängig von einer weiteren Se-Aufnahme wird (Xia *et al.* 2010). Es wird vermutet, dass der Schwellenwert, an dem die maximale SePP-Expression erreicht wird, auch den optimalen Bereich der diätischen Se-Aufnahme darstellt (Hurst *et al.* 2010). Zudem sind Polymorphismen im humanen Promotorbereich bekannt, die in unterschiedlich starken SePP-Expressionen resultieren und damit in schwankenden Se-Konzentrationen, trotz ähnlicher Ernährungsweisen (Al-Taie *et al.* 2002; Meplan *et al.* 2007).

SePP wird hauptsächlich in den Hepatozyten der Leber gebildet, wo die mit der Nahrung aufgenommenen Se-Komponenten in SePP eingebaut werden. Daneben

wird es auch lokal im Gehirn und den Hoden exprimiert, um die Se-Homöostase aufrechtzuhalten, was v.a. für die bevorzugt mit Se versorgten Organe von Bedeutung ist (Schomburg *et al.* 2003; Scharpf *et al.* 2007; Hatfield *et al.* 2011). Rund 75% des Gesamt-SePP werden von der Leber sezerniert und sind bereit für den Transport und die Verteilung von Se im Organismus (Burk *et al.* 1991; Suzuki *et al.* 1999). Die Leber besitzt mit 30% den höchsten Se-Anteil in Bezug auf den Gesamt-Se-Pool im Organismus, gefolgt von Niere (10%), Hoden (5%) und Gehirn (ca. 1%) (Konferenzbeitrag R. Burk „Strategy of selenium metabolism and transport“, 10th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine 2013).

1.3.2 Selenoprotein P und seine Rezeptoren

Selen wird gezielt durch SePP in verschiedene Organe transportiert. Für die gewebsspezifische Bindung und Aufnahme von SePP sind, soweit bekannt, zwei endozytotische Rezeptoren verantwortlich: ApoER2 (LRP8) und Megalin (LRP2) (Olson *et al.* 2007; Olson *et al.* 2008). Diese Transmembranproteine gehören zu der Familie der *lipoprotein receptor-related proteins* (LRP), welche vielseitige Funktionen im Lipidmetabolismus und intrazellulären Signaltransduktionswegen ausführen, aber auch bei Transportprozessen eine Rolle spielen, in dem sie eine Fülle an verschiedenen Serumproteinen binden und endozytotisch aufnehmen (Abb. 1.5 A) (Herz and Bock 2002; Willnow and Nykjaer 2010). Megalin wird u.a. in den Epithelien der Lunge und den proximalen Tubuli der Niere exprimiert. Zu den Liganden von Megalin zählen z.B. Transferrin sowie das Vitamin-D-bindende Protein (VDBP) (Herz *et al.* 2000; Hatfield *et al.* 2011). Die Entdeckung, dass Megalin als SePP-Rezeptor in der Niere dient, war eher zufälliger Natur (Abb. 1.5 B) (Olson *et al.* 2008; Chiu-Ugalde *et al.* 2010). In Abwesenheit eines funktionalen Megalin geht SePP über den Urin verloren, sodass die Plasma SePP- und Se-Level signifikant sinken. Megalin ist somit für die Rückaufnahme von filtriertem SePP in das renale Glomerulum-Filtrat zuständig (Chiu-Ugalde *et al.* 2010). ApoER2 (Apolipoprotein E Rezeptor 2) wird u.a. im Hoden (Sertoli-Zellen) und Gehirn gebildet, wo es neben Reelin auch SePP bindet und aufnimmt (Abb. 1.5 A-B) (Burk *et al.* 2007; Olson *et al.* 2007). Als dritter SePP-Rezeptor wird LRP1 vermutet, jedoch wird diese Funktion noch kontrovers diskutiert (Kurokawa *et al.* 2012).

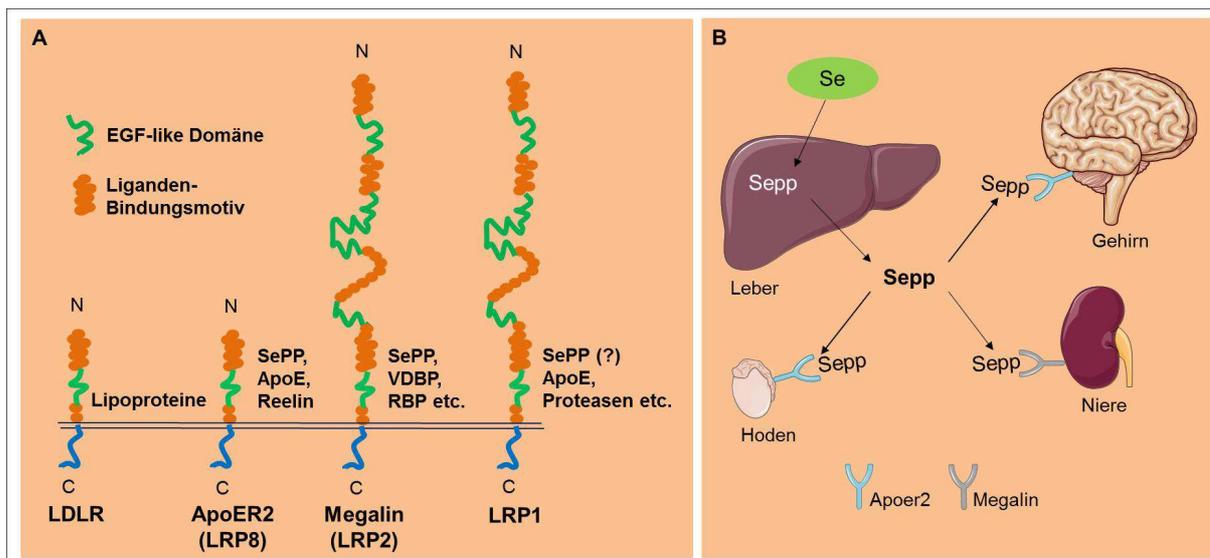


Abb. 1.5: SePP und seine Rezeptoren. (A) Schematische Darstellung der *lipoprotein receptor-related proteins* (LRP) Familie, mit seinen Liganden. Bekannte SePP-Rezeptoren aus der LRP-Familie sind ApoER2 (LRP8) und Megalin (LRP2). Daneben wird LRP1 als potentiell dritter SePP-Rezeptor vermutet. (B) Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die SePP-Rezeptoren Apoer2 und Megalin für die bevorzugte Se-Versorgung einiger Organe sorgen. So wird mit der Nahrung aufgenommenes Se in der Leber in das Se-speichernde und -transportierende Protein SePP eingebaut und von dort peripher an die Organe verteilt. Megalin stellt den SePP-Rezeptor der Niere dar, während Gehirn und Hoden den Rezeptor Apoer2 exprimieren. Somit wird die SePP-Aufnahme in diese Organe erleichtert. Eine kürzlich erschienene Studie belegt zudem, dass SePP nicht nur für eine unterstützende *Gpx4*-Biosynthese in die Hoden transportiert, sondern auch in die Seminalflüssigkeit sekretiert wird, wo es als Biomarker der Spermienqualität herangezogen werden kann (Michaelis *et al.* 2013). EGF: *epidermal growth factor*, LDLR: *low density lipoprotein receptor*, ApoER2: *Apolipoprotein E Rezeptor 2*. Teile der Abb. sind aus der Medical Servier Datenbank. Modifiziert aus Hatfield *et al.* 2011 (A) und Burk and Hill 2009 (B).

Mausmodelle mit modifizierter *Sepp*-, *Megalin*- und *Apoer2*-Expression ermöglichten die genaue Charakterisierung der physiologischen Bedeutung von SePP und seinen Rezeptoren (Conrad and Schweizer 2010). Durch das Vorhandensein des SePP-Rezeptors Apoer2 in Gehirn und Hoden werden diese Organe bei begrenztem Se-Angebot bevorzugt mit Se beliefert. Es wird vermutet, dass die Apoer2-Expression der Grund für die Se-Speicherung in beiden Organen ist, denn die Ausschaltung von Apoer2 hebt diese Fähigkeit während einer Se-Defizienz auf (Olson *et al.* 2007).

Die Abfolge aus SePP-Biosynthese, -Sekretion und -Wiederaufnahme kann als SePP-Zyklus angesehen werden (Schomburg *et al.* 2004). So wird das Gehirn vor Se-Mangel geschützt und die Niere vor überschüssigen Se-Verlust durch renale SePP-Synthese bewahrt (Hatfield *et al.* 2011).

1.3.3 Das Selenoprotein P-Knockout-Mausmodell

Die Generierung einer homozygoten *Sepp*-KO-Maus erfolgte parallel von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen. Beide charakterisierten einen ähnlichen geschlechtsspezifischen Phänotyp mit gewebsspezifischem Se-Mangel, Wachstumsdefekten, Ataxien, männlicher Infertilität und plötzlichem Tod zwischen P30-P40 (Abb. 1.6 A-C) (Hill *et al.* 2003; Schomburg *et al.* 2003). Der Phänotyp konnte, bis auf die Infertilität, durch Se-Supplementation über das Trinkwasser aufgehoben werden. Der neurologische Phänotyp ist vergleichbar mit dem des *Apoer2*-KO-Mausmodells. Die Tiere litten ebenso an eingeschränkter motorischer Koordination sowie Tremor und einer Abhängigkeit der Se-Versorgung (D'Arcangelo *et al.* 1995; Schweizer *et al.* 2004; Burk *et al.* 2007).

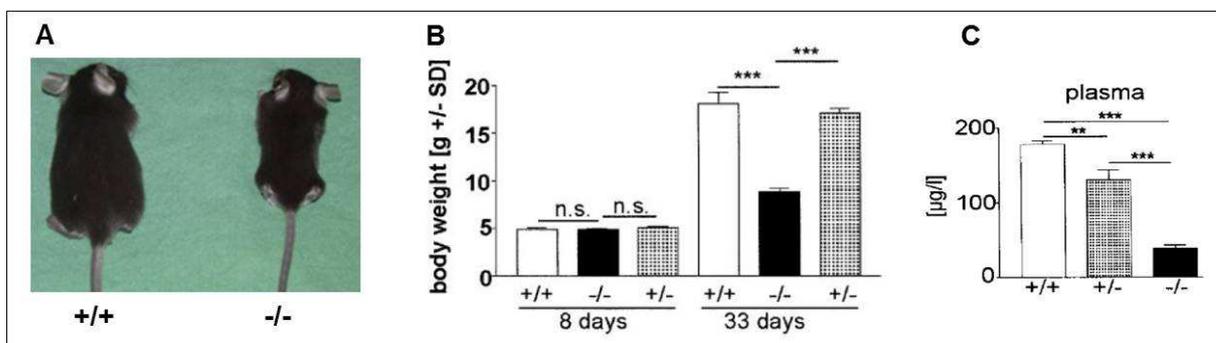


Abb. 1.6: Die *Sepp*-KO-Maus. (A) Die reduzierte Körperlänge der fünf Wochen alten *Sepp*-KO-Mäuse (rechts) im Vergleich zu den *Sepp*-WT-Tieren (links) ist deutlich erkennbar. (B) Kurz nach der Geburt (P8) ist kein Unterschied im Körpergewicht der unterschiedlichen *Sepp*-Genotypgruppen erkennbar. Dieser kristallisiert sich erst bei den juvenilen, sich im Wachstum befindenden Tieren (P33) heraus, wobei die *Sepp*-KO ein signifikant geringeres Körpergewicht aufweisen als die *Sepp*-WT- und -HET-Mäuse. (C) Mit sinkender Anzahl der *Sepp*-Allele fällt die Plasma-Se-Konzentration drastisch ab, was die zentrale Bedeutung von *Sepp* als Hauptplasma-Selenoprotein bestätigt. Modifiziert aus Schomburg *et al.* (2003).

Neben einer drastischen Reduktion an zirkulierendem Se in den *Sepp*-KO-Mäusen (64% der WT-Tiere), ist die Se-Versorgung auch in hierarchisch gut versorgten Organen reduziert (z.B. Gehirn 45% vom WT). Es wurde beobachtet, dass die Se-Konzentrationen in den der Leber nachgeschalteten Organen sinken, während es in der Leber selbst zu einer Se-Akkumulation kommt, da dessen Transporter SePP fehlt (Schomburg *et al.* 2003; Burk and Hill 2009). Die Bedeutung der Leber für die hierarchische Zielgewebsversorgung mit Se konnte in einem transgenen *Sepp*-KO-Mausmodell (*Sepp*^{-tg}) bestätigt werden, welches humanes SePP ausschließlich in

den Hepatozyten der Leber exprimiert (Renko *et al.* 2008). Der Phänotyp in Gehirn und Hoden (Fertilität) der *Sepp*-KO-Tiere konnte in den *Sepp*^{-/-tg}-Mäusen aufgehoben werden. Dies bekräftigt die privilegierte Position der entsprechenden Organe und unterstreicht die Bedeutung des von der Leber produzierten SePP als zentralen Se-Transporter und dessen Rezeptor-vermittelte Se-Aufnahme als grundlegendes Prinzip.

1.4 Die Rolle von Selen im Knochen

1.4.1 Knochenaufbau und -Entstehung

Der Knochen, als Teil des menschlichen Skeletts, erfüllt als dynamisches Organ eine Vielzahl wichtiger Funktionen für den Organismus (Abb. 1.7). Neben dem Knorpel zählt der Knochen zu den konnektiven Geweben. So bietet er strukturelle Unterstützung, schützt die inneren Organe, ermöglicht die Fortbewegung und passt sich verändernden Kräfteinwirkungen an (Das Wolffsche Transformationsgesetz) (Huiskes *et al.* 2000).



Abb. 1.7: Das dynamische menschliche Skelett (Vesalius 1551).

Zusätzlich dazu ist der Knochen essentiell für die Blutzellbildung im Knochenmark (Hämatopoese) und ein wichtiger Mineralspeicher, der 99% des Gesamt-Ca speichert. Knochen bestehen zu ca. 55% aus einer anorganischen Matrix (überwiegend Calcium-Hydroxyapatit $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ und Spuren von Fluoriden sowie Karbonat, etc.), 25% organischen Matrix (u.a. Kollagen Typ I,

Glukosaminoglykane, Knochenzellen, nicht-kollagene Protein) und 20% Wasser. Der menschliche Körper besitzt über 200 Knochen, die sich in Form und Funktion unterscheiden, wobei in dieser Arbeit die Röhrenknochen im Fokus stehen, zu denen auch Femur und Tibia zählen. In der Abb. 1.8 (A) ist der Aufbau eines Röhrenknochens dargestellt.

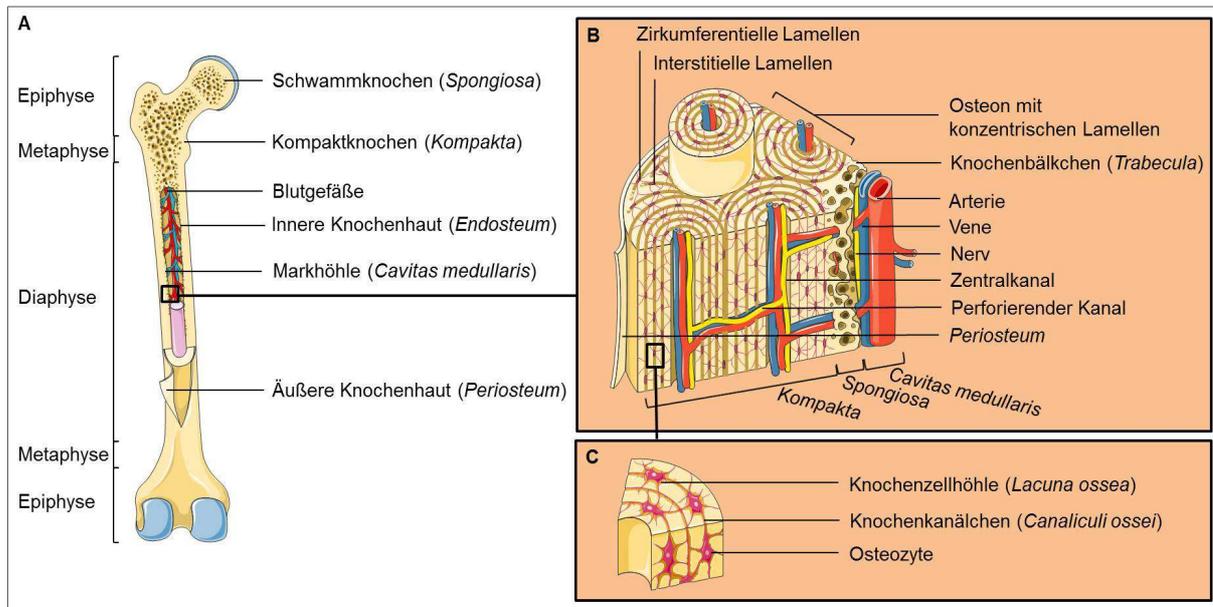


Abb. 1.8: Schematischer Aufbau eines Knochens. (A) Der Röhrenknochen besteht aus einem länglichen Schaft (*Diaphyse*), gefolgt von der *Metaphyse* und den verdickten *Epiphysen* an den Enden. Im Innern ist die schwammartige Knochenstruktur (*Spongiosa*) mit der Markhöhle und den darin verlaufenden Blutgefäßen zu erkennen. Nach außen wird der Knochen von der *Kompakta* begrenzt. Eine innere und äußere Knochenhaut schützt den Knochen und sorgt für die Nährstoffversorgung. (B) In der *Kompakta* verlaufen die Gefäße in Zentralkanälen, die lamellenartig von kollagenen Fasern umgeben sind. Dies stellt die Baueinheit des kompakten Knochens dar, das Osteon. (C) Im Osteon befinden sich die Osteozyten, die reifen Zellen des Knochens. Die Abb. wurde mit Teilen aus der Medical Servier Datenbank erstellt.

Der längliche, röhrenförmige Schaft (*Diaphyse*) wird an den beiden Enden von der verdickten *Epiphyse* begrenzt. Dazwischen liegt die *Metaphyse*. Während der Knochen nach außen eine sehr dicke, starre und kompakte Struktur aufweist (Kompaktknochen, *Kompakta*), befindet sich im Innern eine schwamm- bzw. Bälkchen-ähnliche Gestaltung des Knochens (*Spongiosa*, mit Knochenbälkchen, *Trabecula*) (Schäffler and Schmidt 2003). Ersteres ist beständig gegenüber Biegung und letzteres gegenüber Kompressionen. Somit sind die funktionellen Anforderungen gegeben, d.h. biegsame, bewegliche und Kraft transformierende Knochen trotz einer kompakten, relativ bruchresistenten Struktur (Schäffler and Schmidt 2003). Die

richtige Komposition aus Knochenmorphologie, -Qualität und -Stärke ist Voraussetzung für einen gesunden Knochen. Die *Spongiosa* mit ihrer Hohlraumstruktur bietet zusätzlich der blutbildenden Knochenmarkshöhle (*Cavitas medullaris*) Platz und wird von der inneren Knochenhaut (*Endosteum*) abgegrenzt. Die äußere Hülle des Knochens stellt die äußere Knochenhaut (*Periosteum*) dar, welche mit Osteoprogenitorzellen eine wichtige Rolle in der Frakturheilung, aber auch Nährstoffversorgung spielt (Schäffler and Schmidt 2003).

Im Innern der Markhöhle befindet sich ein Netz aus Nervenfasern und Blutgefäßen, die innerhalb der *Kompakta* in Zentralkanälen (Havers-Kanal) weiterverlaufen, welche durch perforierende Kanäle (Volkmann-Kanal) miteinander verbunden sind (Abb. 1.8 B). Kollagene Fasern haben sich um die Zentralkanäle zu Lamellen formiert und bilden somit die Baueinheit der *Kompakta*, das Osteon. Dies stellt die organisierte Zusammensetzung eines reifen lamellaren Knochens mit wenig Knochenzellen (Osteozyten), aber viel Kollagen dar (Schäffler and Schmidt 2003) (Abb. 1.8 C).

Die Knochenbildung wird als Ossifikation (Verknöcherung) bezeichnet. Dabei kommt es durch Einlagerung von Hydroxyapatit zur Mineralisierung und damit Verhärtung des Knochens (Datta *et al.* 2008). Es wird zwischen der desmalen (direkte) und chondralen (indirekte) Ossifikation unterschieden, aber beides beginnt mit embryonalem Bindegewebe. Während der desmalen Ossifikation wird Knochen direkt aus dem Mesenchym gebildet (z.B. Schlüsselbein, Gesichtsschädel), doch bei der chondralen Verknöcherung erfolgt die Knochenbildung über Knorpelzwischenstufen (Voss 1968). Da Femur und Tibia mittels chondraler Ossifikation gebildet werden, wird dieser Prozess im Folgenden erklärt (Abb. 1.9). Der Knorpel, Proteoglykan-Aggregate in der ECM, ist hart, aber biegsam. Begrenzt vom *Periosteum* ernährt er sich via Diffusion von dessen äußerer Hülle. Der hyaline (glasartige) Knorpel stellt die fetale Form des Knochens dar, welcher innerhalb mehrerer Entwicklungsstufen durch Knochen ersetzt wird. Die Verknöcherung erfolgt im Innern des Knochens (endochondral) und auf dessen Oberfläche (perichondral). Der hyaline Knorpel bildet ein primäres Ossifikationszentrum aus, indem Knorpel aufgelöst und Knochen aufgebaut wird. Indem Blutgefäße immer weiter zu den Knochenenden vordringen, entsteht ein zweites Ossifikationszentrum und die

Epiphysen bilden sich aus (Blumer *et al.* 2008). Bei der perichondralen Ossifikation bildet sich außen eine Hülle aus den Knochen-bildenden Zellen, den Osteoblasten (OB), die mit dem primären und sekundären Ossifikationszentrum zur *Kompakta* verschmilzt.

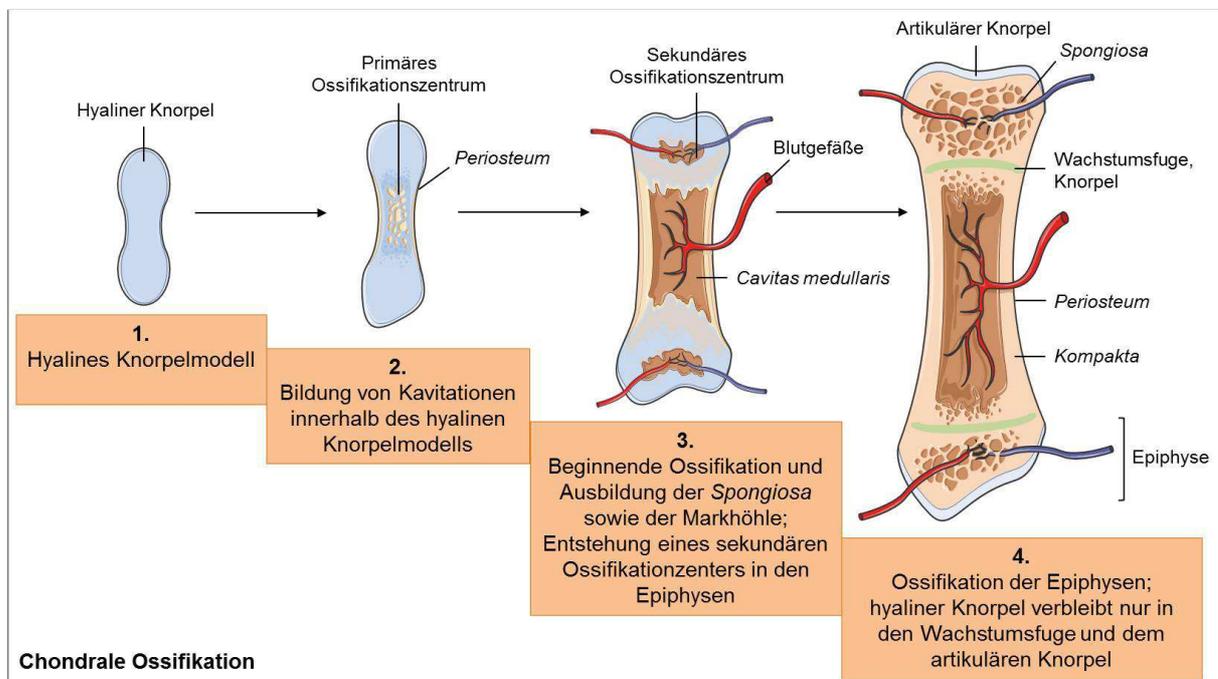


Abb. 1.9: Knochenentwicklung am Beispiel eines Röhrenknochens. Bei der chondralen Ossifikation wird hyaliner (glasartiger) Knochen (1.) über Kavitationen (2.) und Ossifikationen (3.) sukzessive verknöchert (4.). Innerhalb des hyalinen Knorpels entsteht ein primäres Ossifikationszentrum durch Beladung mit Kalksalzen, wodurch Knorpel durch Knochen ersetzt wird (2.). Im Folgenden Zwischenschritt beginnen sich die *Spongiosa* und Markhöhle auszubilden (3.). Zudem durchdringen Blutgefäße die Epiphysen, wodurch ein zweites Ossifikationszentrum entsteht. Im finalen Abschnitt verknöchern auch die Epiphysen (4.). Einzig der Gelenkknorpel (artikulär) und die Wachstumsfuge verbleiben aus Knorpel. Sofern das Längenwachstum abgeschlossen ist, verknöchert auch die Wachstumsplatte. Die Abb. wurde mit Teilen aus der Medical Servier Datenbank erstellt. Adaptiert nach (Lüllmann-Rauch 2006).

Es kommt zur weiteren Ausbildung von Hohlräumen, die *Spongiosa* entsteht. Im letzten Schritt verbleibt einzig hyaliner Knorpel im Gelenkknorpel und in der *Epiphysen-* bzw. Wachstumsfuge, die für das Längenwachstum verantwortlich ist (Blumer *et al.* 2008; Staines *et al.* 2013). Dieser Prozess erfolgt in verschiedenen, klar abgegrenzten Knorpeldifferenzierungszonen (Abb. 1.10) (Staines *et al.* 2013). Auf die Reservezone mit rundlichen, fetalen Knorpelzellen, den Chondrozyten, schließt sich die Proliferationszone an. Die stark mitotischen Chondrozyten lagern sich hier longitudinal in Form von Säulen an. Endokrin sekretierte

Wachstumsfaktoren wie *bone morphogenetic proteins* (BMP), *fibroblast growth factor* (FGF) oder *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) sind an diesem Prozess beteiligt (Naski and Ornitz 1998; Minina *et al.* 2001). Hierauf folgt die hypertrophe Zone, in der die Chondrozyten durch H₂O-Aufnahme zu hypertrophem Blasenknorpel anschwellen, verstärkt Wachstumshormone (z.B. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) sekretieren, die das Längenwachstum kontrollieren, sowie Hydroxyapatit für die Verknöcherung bilden (Zelzer *et al.* 2002; Amizuka *et al.* 2012).

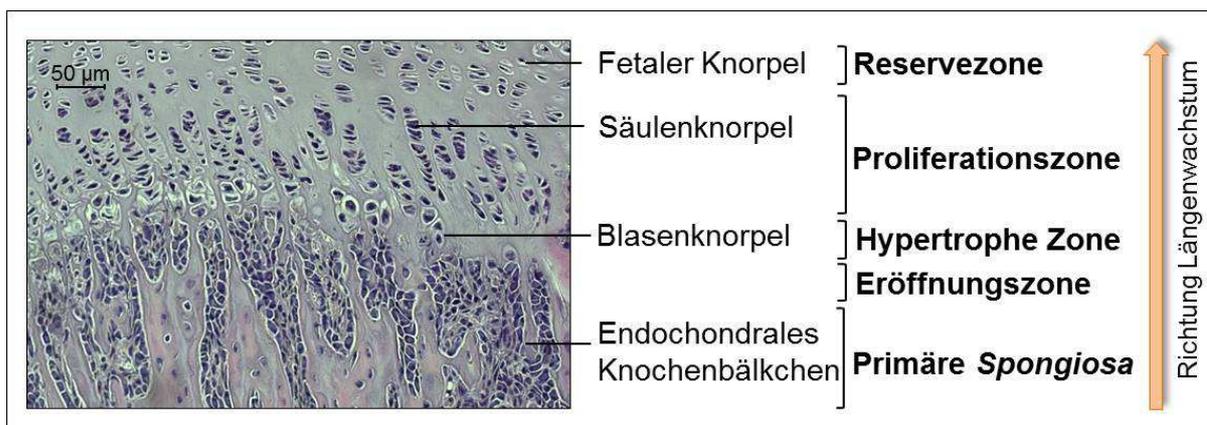


Abb. 1.10: Längenwachstum von Knochen in der Wachstumsfuge. Die Wachstums-/Epiphysenfuge besteht während des Längenwachstums des Knochens noch aus Knorpel. In der Reservezone befinden sich kleine, fetale Knorpelzellen (Chondrozyten) und deren Vorläufer, die sich in der Proliferationsphase in länglichen Säulen anordnen. Durch H₂O-Aufnahme schwellen die Chondrozyten zu Blasenknorpel in der hypertrophen Zone an. Die Eröffnungszone repräsentiert die beginnende Phase des Knorpelab- und Knochenaufbaus. Die primäre *Spongiosa* zeigt den verknöcherten Bereich. Mit Abschluss des Längenwachstums verknöchert auch die Wachstumsplatte vollständig. HE-Färbung der Wachstumsfuge einer männlichen *Sepp-KO*-Maus. Adaptiert nach (Lüllmann-Rauch 2006).

In der Eröffnungsphase ist eine beginnende Kalzifizierung des Knorpels zu beobachten, d.h. OB und die Knochen-resorbierenden Zellen, die Osteoklasten (OC), beginnen mit der Remodellierung des Knorpels in einen lamellaren Knochen, und die primäre *Spongiosa* entsteht. Sofern das Längenwachstum abgeschlossen ist, verknöchert auch die Wachstumsfuge.

1.4.2 Der Knochen lebt- die Knochenhomöostase

Knochen werden im Allgemeinen als starres und inaktives Gerüst angesehen, doch dem ist nicht so, denn der Knochen lebt! In einem gesunden Knochen herrschen Wachstum, Umformung/Remodellierung (*remodeling*), Formung (*modeling*), Mikroverletzungen sowie Frakturheilung, die den Knochen zu einem dynamischen

Gewebe machen. Unter *remodeling* versteht man das Gleichgewicht zwischen den OB und den OC, wobei die Knochenmasse beibehalten wird (Abb. 1.11 B). Dieser Prozess findet stetig statt, von der Phase des Wachstums bis zum Tod. Alle sieben Jahre wird so der Knochen einmal komplett durch neuen Knochen ersetzt. Beim *modeling* wird auf schon existierenden Knochen neuer Knochen geformt, so dass dieser Prozess sowohl während des Wachstums als auch bei der (Fraktur-) Heilung auftritt. Hierbei agieren die OB und OC an unterschiedlichen Stellen.

Der Prozess der Knochen-Remodellierung (*turnover*) findet in sogenannten Knochenbaustellen (*basic multicellular unit, BMU*) statt, wobei die wandernden OC zum einen Knochen abbauen und zum anderen die OB Knochen wieder neu formen (Abb. 1.11 A-B) (Hadjidakis and Androulakis 2006; Datta *et al.* 2008).

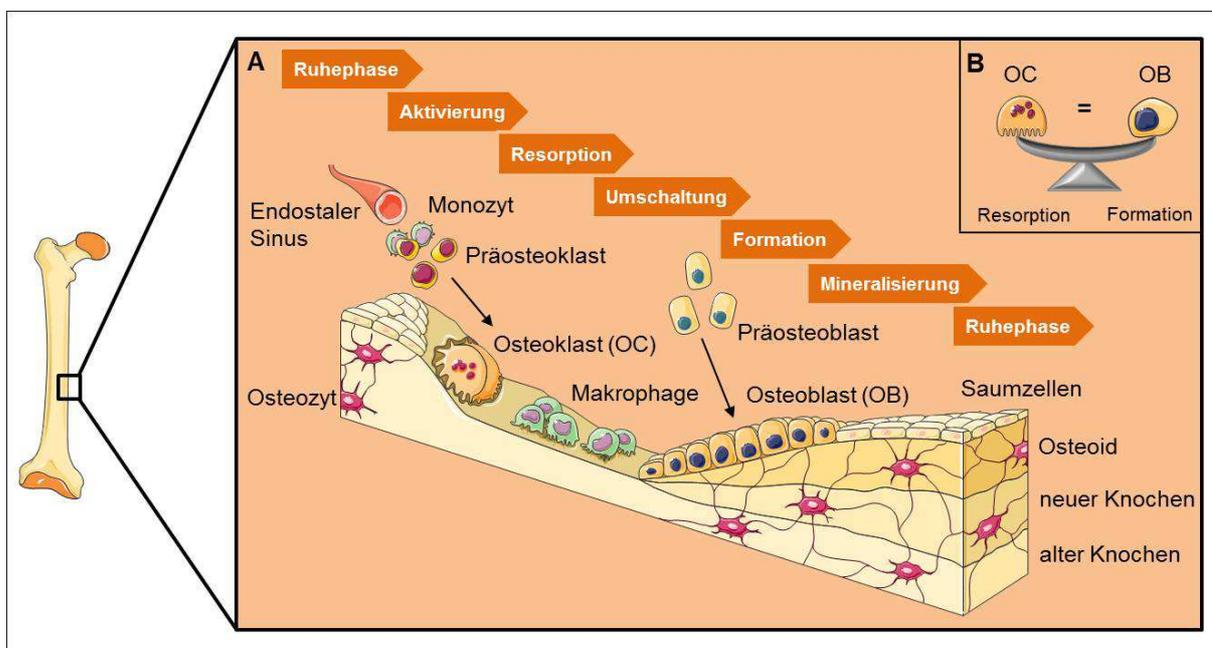


Abb. 1.11: Remodellierung von Knochengewebe (*turnover*). (A) Die Remodellierung von Knochen erfolgt innerhalb einer Knochenbaustelle, der *basic multicellular unit* (BMU). Dabei wird Knochengewebe gleichzeitig von den Knochen-resorbierenden Zellen, den Osteoklasten (OC), abgebaut und von den Knochen-formierenden Zellen, den Osteoblasten (OB), aufgebaut. Ausgehend von der Ruhephase, fusionieren hämatopoetische Stammzellen (Monozyten-Vorläufer) zu multinukleären Präosteoklasten, die im aktivierten Zustand als OC an den Knochen mit ihrer Bürstensaumstruktur binden, Knochenmatrix resorbieren und Knochengewebe abbauen. Parallel dazu differenzieren aus mesenchymalen Stammzellen entwickelte Präosteoblasten zu OB, welche neues Knochengewebe bilden und mineralisieren. Die OB unterliegen der Apoptose, werden als Osteozyten in den Knochen eingebaut oder liegen dem Knochen als Saumzellen auf. Der Zyklus ist abgeschlossen. (B) In einem gesunden Knochen herrscht ein Gleichgewicht zwischen den Protagonisten OC und OB. Ist das Verhältnis gestört, entstehen Knochenerkrankungen. Die Abb. wurde mit Teilen aus der Medical Servier Datenbank erstellt.

Osteozyten agieren aufgrund ihrer Neuronen-artigen Struktur als Mechanosensoren, indem sie Mikrofrakturen und mechanische Beanspruchungen wahrnehmen und somit die OC rekrutieren (Datta *et al.* 2008). Hämatopoetische Stammzellen entwickeln sich über multinukleäre Präosteoklasten zu den OC. Die Osteoklastogenese wird über die OB gesteuert, welche den *receptor activator of nuclear factor- κ B* Liganden (RANKL) bilden, der an seinen Rezeptor RANK auf den OC bindet und so den OC aktiviert (Martin 2013). Der aktivierte OC beginnt mit seiner Bürstensaumstruktur die Knochenmatrix zu resorbieren und Knochengewebe abzubauen. Um einem einseitigen Knochenabbau entgegenzuwirken, produzieren OB zusätzlich Osteoprotegerin (OPG), welches die OC-Differenzierung und – Formation blockiert. Aus mesenchymalen Stammzellen differenzieren sich über Präosteoblasten die OB, welche das Osteoid (nicht-mineralisierter Knochen) bilden und ablagern (Datta *et al.* 2008). OB sezernieren u.a. die alkalische Phosphatase (ALP), welche ein klassischer Marker der OB-Aktivität und damit der Knochenmineralisierung darstellt. Nach der Mineralisierung werden die OB als Osteozyten in den neu gebildeten Knochen eingelagert, formieren sich zu Saumzellen oder sterben ab (Apoptose). Der Zyklus der Knochen-Remodellierung ist damit beendet (Abb. 1.11 A). Die Balance zwischen der Knochenformation und – Resorption wird durch das Verhältnis von RANKL und OPG bestimmt (Mayahara *et al.* 2012; Martin 2013). So resultieren Schwankungen in der RANKL-OPG-Homöostase oft in Knochenerkrankungen (Sinningen *et al.* 2012). Ein gestörtes Verhältnis führt z.B. zu Osteoporose (erhöhter Knochenabbau) oder Osteopetrosis (erhöhter Knochenaufbau). Bei Östrogenmangel, z.B. postmenopausal, steigt die Anzahl der BMU, jedoch mit einem Wechsel hin zum Knochenabbau, die Knochendichte sinkt und die Prävalenz osteoporotisch bedingter Frakturen steigt (Seeman 2004).

Die Knochendichte kann z.B. mittels der Dual-Röntgen-Absorptiometrie (DEXA) ermittelt werden, aber auch im Serum sind Knochen *turnover* Marker vorzufinden. Hierzu zählen u.a. Telopeptide (N- oder C-terminale Kollagenbruchstücke). Serum Typ I Kollagen C-terminales Telopeptid (β CTx) dient als Knochenresorptionsmarker und entsteht beim Knochenabbau durch die OC (Takahashi 2013). Ein weiterer Marker für den Knochenabbau ist das aus dem Urin gewonnene Kollagen I N-

terminales Telopeptid (uNTx). Als Knochenformationsmarker im Serum dient u.a. das von proliferierenden OB gebildete Prokollagen Typ I N-terminales Propeptid (PINP) sowie Osteocalcin (Takahashi 2013). So haben postmenopausale Frauen mit erhöhten s β CTx- und uNTx-Werten auch ein erhöhtes Frakturrisiko (Garnero *et al.* 2000). Die diagnostische Bestimmung der Knochenmarker ermöglicht somit die Beurteilung des primären Knochenmetabolismus oder sekundärer Effekte und damit einhergehend der Knochengesundheit.

1.4.3 Knochenendokrinologie

Als neu definiertes endokrines Organ sekretiert der Knochen den *Fibroblast growth factor 23* (FGF23) sowie Osteocalcin (Fukumoto and Martin 2009; Karsenty 2011). Ersteres wird von Osteozyten gebildet und sekretiert, wobei es u.a. das Parathormon (PTH) und die Vitamin D Biosynthese reguliert, während Osteocalcin, von den OB sekretiert, den Insulinmetabolismus beeinflusst (Shimada *et al.* 2004; Fukumoto and Martin 2009; Karsenty 2011). Schilddrüsenhormone sind wichtige Regulatoren der Skelettentwicklung und Knochenhomöostase (Bassett *et al.* 2007). Die Schilddrüse sezerniert T4 und geringe Mengen an T3 als Antwort auf die Stimulierung durch TSH. Das aktive Schilddrüsenhormon T3 wird hauptsächlich durch Konvertierung aus T4 mittels der Selenoproteine Dio1 und Dio2 gewonnen (Murphy and Williams 2004). T3 übernimmt eine wichtige Rolle z.B. in der Aktivierung von Wachstumsfaktoren (z.B. FGF-Stimulierung durch FGFR1-Aktivierung), Markern des Knochen *turnover* und ist notwendig für die Entwicklung der Wachstumsfuge (Stevens *et al.* 2003; Murphy and Williams 2004; Bassett *et al.* 2007). Für TSH wird eine Funktion als negativer Regulator des Knochen *turnover* postuliert (Abe *et al.* 2003).

1.4.4 Knochen, Kupfer und Zink?

Kupfer (Cu) und Zink (Zn) zählen neben Se ebenfalls zu den essentiellen Spurenelementen, die als Kofaktoren in einer Vielzahl von (Redox-) Enzymen wichtige Funktionen übernehmen. Als Bestandteil der Cu-/Zn-Superoxiddismutase agieren sie in der Abwehr gegenüber oxidativem Stress (*reactive oxygen species*, ROS) (Pena *et al.* 1999; Song *et al.* 2009). Daneben sind sie Bestandteil von Enzymen, die an der Synthese der Knochenmatrix und der Regulation des Knochen

turnover beteiligt sind (Lowe *et al.* 2002). Mangelerscheinungen stehen in Verbindung mit Wachstumsdefekten und Osteoporose, was auf eine Bedeutung der Minerale für die Knochengesundheit und –Homöostase schließen lässt (Opsahl *et al.* 1982; Sandstead 1985; Milne and Nielsen 1996; Tapiero and Tew 2003; Aaseth *et al.* 2012). Der Einfluss von Cu und Zn in gesunden postmenopausalen Frauen wurde schon in einigen Studien untersucht, jedoch mit widersprüchlichen Ergebnissen. Während einige Studien keinen Unterschied von Zn und Cu zwischen postmenopausalen gesunden und osteoporotischen Frauen entdecken konnten, sahen andere Studien einen positiven Effekt von Zn, aber nicht Cu, auf die Knochenmineraldichte (*bone mineral density*, BMD) in gesunden postmenopausalen Frauen (Mutlu *et al.* 2007; Odabasi *et al.* 2008; Arikan *et al.* 2011; Nielsen *et al.* 2011). In einem Punkt stimmen die meisten Arbeiten zu dem Thema überein, nämlich dass mehr Studien mit einer größeren Probandenanzahl notwendig sind, um den potentiellen Einfluss von Cu und Zn auf die Knochengesundheit zu verifizieren.

1.4.5 Knochen und Selen?

Eine bedeutende Rolle von Se für die Knochengesundheit wird schon seit einiger Zeit aufgrund diverser tierexperimenteller und humaner Studien vermutet (Zeng *et al.* 2013). Im Folgenden erfolgt eine Zusammenfassung der wichtigsten Erkenntnisse in Bezug auf Se und die Knochengesundheit.

In einer Studie wurde die Abhängigkeit des Knochenmineralgehalts (*bone mineral content*, BMC) und BMD vom Se-Status in Ratten demonstriert (Moreno-Reyes *et al.* 2006). So entwickelten die Tiere bei einer Niedrig-Se-Diät einen Knochenphänotyp, der durch Wachstumsdefekte und eine schwach ausgeprägte kortikale und trabekuläre Mineralisierung gekennzeichnet war.

Das in Abschnitt 1.3.3 beschriebene *Sepp*-KO-Mausmodell wurde nach der Generierung in Zusammenarbeit mit der *German Mouse Clinic* (c/o Helmholtz Zentrum München) untersucht. Dabei zeigte sich neben einem eingeschränkten Wachstum auch eine reduzierte BMD, BMC und eine verminderte Aktivität der ALP in männlichen Tieren im Vergleich zu den WT- und HET-Mäusen. Männliche KO-Mäuse litten unter einer Osteopenie, der Vorstufe einer Osteoporose. Ein Unterschied zwischen *Sepp*-WT- und HET-Mäusen konnte nicht beobachtet werden.

Einen direkten Einfluss der Selenoproteine auf die Knochengesundheit konnte von einigen Arbeitsgruppen präsentiert werden. Die Selenoproteine GPx degradieren Peroxide, Vorstufen von ROS, welche während der Knochen-Remodellierung entstehen (Almeida *et al.* 2007). Indem ROS u.a. RANKL stimuliert, fördert es die Anzahl und Aktivität der OC (Manolagas 2010). Dies könnte in einem Anstieg der Superoxid-Anionen resultieren und/oder der Inhibierung der Superoxiddismutase sowie GPx, einhergehend mit einer Knochenzerstörung (Sheweta and Khoshhal 2007). Dreher *et al.* und Jakob *et al.* konnten nachweisen, dass Selenoproteine wie GPx und TrxR die Knochenzellen gegenüber ROS schützen können (Dreher *et al.* 1998; Jakob *et al.* 2002).

Bassett *et al.* studierten die Rolle des lokal produzierten Schilddrüsenhormons T3 im Knochen, welches wichtige physiologische Funktionen im skeletalen Wachstum und der Entwicklung übernimmt (Bassett and Williams 2003; Williams and Bassett 2011). Dafür studierten sie die *Dio2*-KO-Maus, da dieses Enzym T3 aus der Vorstufe T4 bildet (Bassett *et al.* 2010). Interessanterweise litt die *Dio2*-KO-Maus unter brüchigen Knochen, einer reduzierteren Knochenhärte und erhöhten Anfälligkeiten für Knochenbrüche, was auf eine gesteigerte Mineralisierung und eine um 50% reduzierte Knochenformation zurückzuführen ist (Bassett *et al.* 2010). Dies lässt auf eine bedeutende Rolle von *Dio2* im Knochen für die Knochenstärke und – Mineralisierung schließen (Bassett *et al.* 2010).

Eine gewebsspezifische Inaktivierung des *Trsp* Gens (kodiert für die Sec-tRNA^{[Ser]Sec}, Abschnitt 1.2.2) in skeletalen Progenitorzellen resultierte in einem ausgeprägten Wachstumsdefizit, Chondronekrosen in allen knorpeligen Geweben (einschließlich der tibialen Wachstumsfuge) und plötzlichem Versterben am Tag 28-35 (Downey *et al.* 2009). Diese Mausmutante stellt somit ein mögliches Modell zur Untersuchung der humanen KBD dar (Downey *et al.* 2009). Die Ausbildung von KBD sowie der Keshan-Krankheit ist u.a. in Teilen Chinas und Tibets mit Se- und Iod-armen Böden prävalent (siehe Abschnitt 1.1.1) (Moreno-Reyes *et al.* 1998). KBD ist charakterisiert als eine endemische degenerative Osteoarthritis, die mit Osteonekrosen und einer eingeschränkten enchondralen Ossifikation einhergeht (Moreno-Reyes *et al.* 1998; Moreno-Reyes *et al.* 2001a). Die Betroffenen leiden unter deformierten Gelenken und Extremitäten sowie eingeschränkter skeletaler Verknöcherung und Wachstum

(Kleinwüchsigkeit). Die Funktion der Wachstumsfuge scheint eingeschränkt zu sein (Abb. 1.12 A) (Sokoloff 1987; Moreno-Reyes *et al.* 1998; Guo *et al.* 2006).

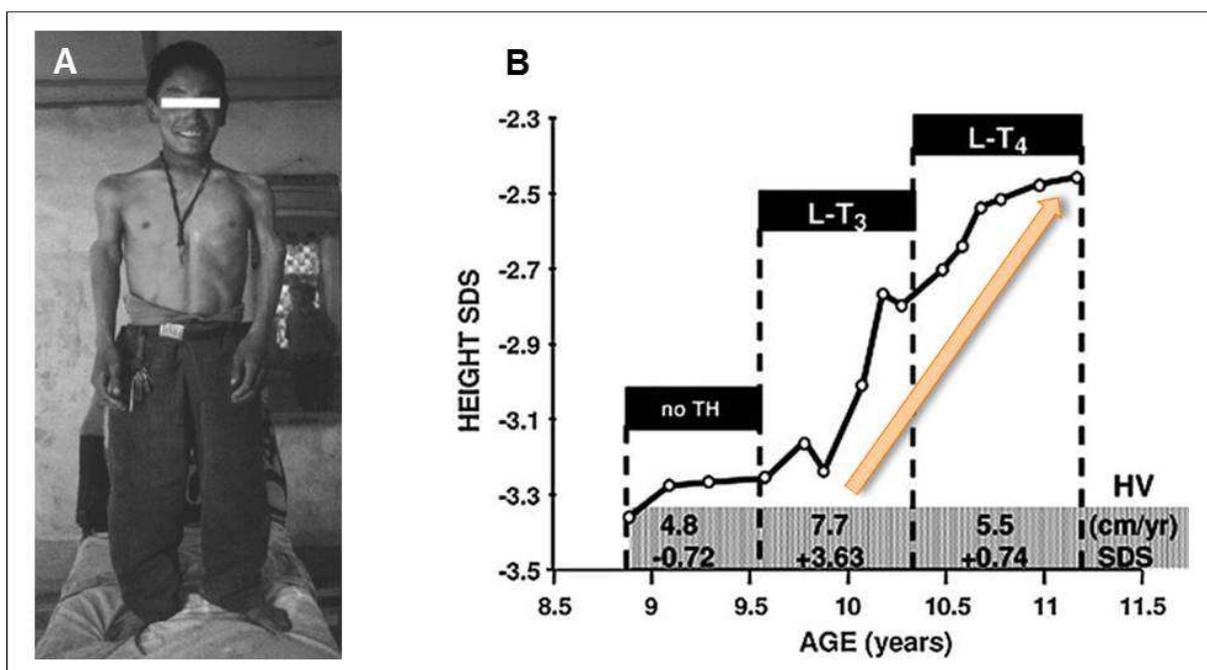


Abb. 1.12: Einfluss von Se auf die Knochengesundheit. (A) In Se-Mangelgebieten Chinas ist die *Kashin Beck disease* (KBD) eine verbreitete Erkrankung. KBD ist eine degenerative Osteoarthritis, wobei die Betroffenen an einem deformierten Knochenwachstum und verminderter Statur leiden. Eine Se-Supplementation vermag die Bildung von KBD zu verhindern. **(B)** Mutationen in dem Gen des SECIS-Element-bindenden Protein *SBP2* verursachen in Kindern einen gestörten Schilddrüsenhormonstatus und führen somit zu einem verminderten Knochenalter und Knochenwachstum. Die Supplementation mit Schilddrüsenhormonen (T3 und T4) konnte die Wachstumsgeschwindigkeit erhöhen und das Knochenalter verbessern. TH: Schilddrüsenhormon. Adaptiert aus Zou *et al.* 2009 (A) und Dumitrescu *et al.* 2010 (B).

Interessanterweise konnten Se-Supplementationen die Ausbildung von KBD verhindern (Zou *et al.* 2009; unknown authors 1979). Aufgrund der Tatsache, dass die Betroffenen keine pathologischen Auffälligkeiten in anderen Organen entwickelten, scheint in Regionen mit der höchsten KBD-Prävalenz der Knorpel und somit das skeletale System am empfindlichsten auf die Se-Armut zu reagieren (Hatfield *et al.* 2011). Es scheint jedoch, dass die Ausbildung von KBD multifaktoriell und die Se-Defizienz als Umweltfaktor allein nicht ausreichend ist (Xiong *et al.* 2010). Xiong *et al.* postulieren zudem einen Polymorphismus im *Gpx1*-Gen als einen Risikofaktor für KBD, der die endemische Verbreitung erklären könnte.

Vor wenigen Jahren wurden die ersten Kinder mit einer Mutation im *SBP2*-Gen identifiziert. Diese Kinder zeigen eine generell reduzierte Selenoproteinexpression,

einschließlich eines SePP-Defizits. Daneben führt die *SBP2*-Mutation zu gestörten Schilddrüsenhormon-Konzentrationen, demzufolge zu einer verzögerten Knochenentwicklung und kleinen Statur (Dumitrescu *et al.* 2005; Di Cosmo *et al.* 2009; Azevedo *et al.* 2010; Dumitrescu and Refetoff 2011). So litt ein knapp 9 Jahre alter Junge mit der *SBP2*-Mutation an einem um ca. 3 Jahre verzögerten Knochenalter (Dumitrescu *et al.* 2010). Die beobachtete gestörte Selenoproteinbiosynthese-Maschinerie und der pathologische Schilddrüsenhormonstatus konnten nicht durch Se-Supplementation behoben werden (Schomburg *et al.* 2009). Einzig die Gabe der Schilddrüsenhormone T4 und T3, deren Aktivierung bzw. Abbau über die Selenoproteingruppe der Dejodasen bestimmt wird, führte zu einer beschleunigten Wachstumsgeschwindigkeit und einem Fortschritt im Knochenalter (Abb. 1.12 B) (Dumitrescu *et al.* 2010).

Studien deuten an, dass ROS auch eine wichtige Rolle in der Entstehung von Osteoporose einnimmt (Bai *et al.* 2005; Samelson and Hannan 2006). In der groß angelegten europäischen Kohorten-Studie OPUS (*Osteoporosis and Ultrasound Study*) wurden 1565 postmenopausale, euthyreote Frauen untersucht (Abschnitt 3.16). Dabei zeigte sich, dass der Se-Status einen Einfluss auf den Knochen *turnover* hat (Hoeg *et al.* 2012). Die Serum Se-Level korrelieren positiv mit SePP und sind invers mit dem Schilddrüsenhormonstatus verbunden. Folglich beeinflusst Se auch den Knochen *turnover*, jedoch nicht das Frakturrisiko. Physiologische Schwankungen des Schilddrüsenhormonstatus stehen in Verbindung mit der BMD und Frakturen in gesunden, postmenopausalen Frauen. So führt ein leicht erhöhter Schilddrüsenhormonstatus zu einer geringeren BMD und einem gesteigerten Risiko extravertebraler (nicht wirbelsäulenbedingte) Frakturen (Hoeg *et al.* 2012).

Zusammengenommen weisen die hier aufgelisteten Studien auf eine kritische Abhängigkeit der Knochengesundheit vom Se-Status und von einer ungestörten Selenoproteinexpression sowie –Funktion hin. Allerdings sind die Mechanismen des Se-Transports zum Knochen, des Se-Metabolismus im Knochen und das Spektrum der im Knochen exprimierten Selenoproteine nicht charakterisiert.

2 Zielstellung der Arbeit

Der Knochen ist in seiner Dynamik und metabolischen Aktivität ein oft unterschätztes Organ im menschlichen Körper. Er übernimmt wichtige Funktionen, indem er die inneren Organe schützt, als Mineralspeicher und –Reservoir dient und eng mit Hämatopoese und Immunsystem verknüpft ist. Zudem gilt der Knochen als ein Risikoorgan im Alter z.B. in Bezug auf Frakturen. Eine zunehmende Anzahl tierexperimenteller Arbeiten und humaner Studien hat eine Verbindung zwischen einem ausreichenden Se-Status und der Knochengesundheit dargelegt. Allerdings sind die zugrunde liegenden physiologischen Prozesse nicht charakterisiert.

Die *Sepp*-KO-Maus stellt ein geeignetes Mausmodell für die Untersuchung der Bedeutung von Se und Selenoproteinen für die Knochengesundheit dar, zumal diese Tiere unter einem ausgeprägten Wachstumsdefizit ab dem juvenilen Alter leiden. Für die Untersuchungen wurde mit drei *Sepp*-Genotypen gearbeitet. Die WT-Tiere dienten als Referenz für eine gesunde Se-Homöostase, die *Sepp*-HET-Tiere reflektieren den humanen Se-Status in Mangelregionen und die *Sepp*-KO-Mäuse sind ein Modell des genetisch gestörten Se-Metabolismus, der den Extremfall einer Se-Armut darstellt. Da der Se-Metabolismus ausgeprägte Mann-Frau-Unterschiede aufweist, wurden neben den drei Genotypen auch Geschlechtsunterschiede im Mausmodell untersucht. Diese Arbeiten sollen durch Zellkulturexperimente und anhand von Analysen einer humanen Kohorte ergänzt werden.

Folgende Hypothese wurde im Rahmen der Dissertation getestet:

Eine gleichmäßige und uneingeschränkte Selenoproteinexpression ist von entscheidender Bedeutung für Knochenhomöostase und Knochengesundheit.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden folgende Detailfragestellungen bearbeitet:

1. Gibt es histologische Unterschiede in der Knochenmorphologie und dem Mineralisierungsgrad zwischen den *Sepp*-Tiergruppen?

2. Wo ist Se im Knochen lokalisiert und ist dessen Konzentration messbar?
3. Wird der Knochen in Zeiten einer Se-Defizienz bevorzugt mit Se versorgt?
4. Welche Selenoproteine und Faktoren des Selenoproteinmetabolismus werden im Knochen exprimiert?
5. Wird Sepp im Knochen exprimiert, wo ist es lokalisiert und vermittelt es den Se-Transport von der Leber in den Knochen?
6. Sind Sepp-Rezeptoren an der Aufnahme von Sepp im Knochen beteiligt?

Und schließlich:

7. Verglichen zu Se, zeigen die Spurenelemente Cu und Zn ebenso einen Einfluss auf die Knochengesundheit in gesunden, postmenopausalen Frauen?

Angesichts der bislang spärlichen Literatur von Selen, Selenoproteinen und Knochen soll in dieser Arbeit somit ein umfassender Überblick zur Interaktion Selen-Knochen während der Entwicklung (unter Zuhilfenahme primärer mesenchymaler Zellen), Reifung und Qualität (mittels des *Sepp*-Mausmodells) und unter Aspekten der Humanrelevanz (anhand der OPUS-Kohortenstudie) gewonnen werden.

3 Material und Methoden

„Picofox ist Knochenarbeit.“

Dr. Eddy Rijntjes

3.1 Laborgeräte

Tab. 3.1: Verwendete Laborgeräte und deren Hersteller.

Geräte	Hersteller
Analysenwaage A120S analytic	Sartorius, Göttingen
Autoklav Varioklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
CO ₂ -Inkubator (HeraCell)	Heareus Sepatec GmbH, Hanau
Dampfgartopf Tefal Diffusal 10L	Groupe SEB, Offenbach
Elektrophoresekammer (horizontal) Blue Marine 200	Roth, Karlsruhe
Faxitron MX-20	Quados, Berkshire
Geldokumentationssystem Alphamager [®] EC	Alpha Innotec, San Leandro
Laborwasserbad 1083	GFL GmbH, Burgwedel
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Induktionsherdplatte SIKP 2000 B2	SilverCrest, Bochum
Kettenluminometer Berthold LB 952 T716	BRAHMS AG, Hennigsdorf
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Leica ASP300 Entwässerung/EG 1160 Einbettung	Leica Microsystems, Nussloch
Magnetrührer R3T	MLW, Würzburg
Microdismembrator Modell U	B. Braun Biotech, Melsungen
Mikroskop Axioskop 2 mot plus	Carl Zeiss, Oberkochen
Mini-PROTEAN [®] 3 Cell	Bio-Rad Laboratories, München
Netzgerät BluePower PLUS	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Netzgeräte EPS 601	Amersham Pharmacia, Piscataway
PCR-Cycler Primus 25 und 96plus	MWG Biotech, Ebersberg
pH-Meter inoLab Benchtop	WTW, Weilheim
Spektrophotometer NanoDrop 1000	PEQLAB GMBH, Erlangen
Paraffinstreckbad	MEDAX, Neumünster
Pipetten 0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe accu-jet [®] pro	Brand, Wertheim
Plattenphotometer Model 3550 Microplate Reader	Bio-Rad Laboratories, München
Plattenschüttler Titramax 1000	Heidolph Instruments, Schwabach
Präparierbesteck	FST GmbH, Heidelberg
iCycler TM Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, München
Rolleninkubator TRM-V	IDL, Nidderau
Röntgenfilmkassette	Kodak, Rochester
Rotationsmikrotom RM 2125 RT	Leica Microsystems, Nussloch
Spektrometer SPECORD [®] 205	Analytik Jena, Wembley
Sterilbank Model 1.2 (HeraSafe)	Heraeus Sepatec GmbH, Hanau
S2-Picofox	Bruker Nano GmbH, Berlin
Tischschüttler KS 260 basic	IKA [®] -Werke, Staufen
Tissuelyser	Qiagen, Hilden
TRANS-BLOT [®] SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, München
Ultraschallgerät Labsonic [®] M	B. Braun Biotech, Melsungen
Vortex REAX 2000	Heidolph Instrument, Schwabach
Waagen CP 2201, CP 323S	Sartorius, Göttingen
Zellkulturmikroskop Wilovert 30 Standard	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heareus Sepatec GmbH, Hanau

3.2 Software und Datenbanken

Tab. 3.2: Software und Datenbanken.

Software und Datenbank	Hersteller
AxioVision Rel. 4.7	Carl Zeiss Micro-imaging, Göttingen
BIOGPS	http://biogps.org
Bio-Rad iCycler iQ 3.0	Bio-Rad Laboratories, Hercules
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
BLAT Search	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat
Electronic-PCR	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/e-pcr/
EndNote X6	Thomson Reuters, New York
Faxitron Digitale Bildbearbeitung	Qados, Cross Technologies plc, Berkshire
GraphPad Prism 4	GraphPad Software, La Jolla
ImageJ 1.45 software	http://rsb.info.nih.gov/ij/
Microsoft Office 2010	Microsoft Deutschland, Unterschleißheim
Mouse Genome Informatics	http://www.informatics.jax.org/
National Center for Biotechnology	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Picofox-Software	Bruker Nano GmbH, Berlin
Primer 3 Version 4.0	http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
Servier Medical Art	LES LABORATOIRES SERVIER, Suresnes cedex
SPSS 19	IBM Deutschland GmbH, Ehningen

3.3 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Verbrauchsmaterialien für den Laborbedarf wurden, insoweit nicht weiter vermerkt, von folgenden Herstellern bezogen: Amersham (München), Braun Biotech International (Melsungen), Bio-Rad Laboratories (München), Carl Roth (Karlsruhe), Eppendorf (Hamburg), GE Healthcare (München), Hartenstein (Würzburg), Life Technologies (Darmstadt), Merck Biosciences (Schwalbach), PEQLAB Biotechnologie (Erlangen), Sarstedt (Nümbrecht), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) sowie VWR (Darmstadt).

Chemikalien wurden in *pro analysi*-Qualität, sofern nicht gesondert angegeben, von nachfolgenden Herstellern erworben: Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostik (Mannheim), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim).

3.4 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme (Kits)

Tab. 3.3: Gebrauchsfertige Reaktionssysteme und deren Hersteller.

Reaktionssystem	Hersteller
Absolute™ QPCR SYBR® Green Fluorescein Mix	ThermoFisher Scientific, Winsford
Pierce® BCA Assay Kit	ThermoFisher Scientific, Winsford
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories, München
Dako Cytomation Biotin Blocking System	DAKO, Carpinteria
Dako Liquid DAB+Substrate Chromogen System	DAKO, Carpinteria
ECL Western-Blot Detection Reagents	GE Healthcare, Waukesha
iScript cDNA Synthese Kit	Bio-Rad Laboratories, München
Phase Lock Gel Heavy 2 mL	5Prime, Hamburg
RNAi Human/Mouse Starter Kit	Qiagen, Düsseldorf
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Düsseldorf
Vectastain ABC Kit PK-6101, Rabbit IgG	Vector Laboratories Inc, Burlingame

3.5 Antikörper

Tab. 3.4: Verwendete Antikörper und deren Verdünnung.

Antikörper	WB	IHC	Hersteller
<i>primärer Antikörper</i>			
anti-Selenoprotein P AB IG617 (rabbit)	1:400	1:100	ImmunoGlobe GmbH, Himmelstadt
anti-SePP monoklonal 2B5 (mouse)	1:1000		ICI GmbH, Berlin
anti-Selenium Binding Protein 1 (rabbit)	1:500	1:300	Abcam, Cambridge
anti-LRP1 (rabbit)	1:10000		Abcam, Cambridge
anti-LRP2 (rabbit)	1:1000		Abcam, Cambridge
anti-LRP8 (rabbit)	1:2000		Prof. Joachim Herz, Dallas
anti-Apoer2/LRP8 (rabbit)	1:1000		Abcam, Cambridge
<i>sekundärer Antikörper</i>			
Polyclonal goat anti-rabbit HRP	1:2000	1:2000	Dako, Hamburg
Polyclonal sheep anti-mouse HRP	1:2000		GE Healthcare, Buckinghamshire

3.6 Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Puffer und Lösungen sind im jeweiligen Methodenteil aufgelistet, inklusive deren Zusammensetzung. Für die Herstellung wurde Reinstwasser (dH₂O) aus der „Easypure™ UV“-Anlage (Barnstead International, Dubuque) verwendet.

3.7 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Tab. 3.5: In der Zellkultur verwendete Medien und Zusätze.

Bestandteile Zellkultur	Hersteller
Dulbecco`s MEM (DMEM) mit NaHCO ₃ , L-Gln, 4,5 g/L D-Gluc	Biochrom, Berlin
Minimum Essential Medium Eagle (MEM) mit NaHCO ₃	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fötales Kälberserum (FBS)	Biochrom, Berlin
TrypLE™ Express	Life Technologies, Darmstadt
Lipofectamine® 2000 Reagent, 1 mg/mL	Life Technologies, Darmstadt
100x L-Glutamin (L-Gln)	Biochrom, Berlin

3.8 Eukaryotische Zelllinien

Tab. 3.6: Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Zelltyp	Bezug	Kultivierungsmedium
Raw264.7	Murine Makrophagen, Tumorzelllinie	ATCC-Nr.TIB-71	DMEM mit 10% (v/v) FBS
MC3T3	Murine Präosteoblasten, Fötale Kalvaria Fibroblasten	DSMZ-Nr.ACC210	MEM mit 10% (v/v) FBS, 4 mM L-Gln
HepG2	Humane Leberkarzinom-Zelllinie	DSMZ-Nr. ACC180	DMEM:F12 mit 10% (v/v) FBS
Hela	Humane Zervixkarzinom-Zelllinie	DSMZ-Nr. ACC136	DMEM mit 10% (v/v) FBS

Hungermedium wurde ohne FBS angesetzt.

Konservierungsmedium mit 20% (v/v) FBS und 10%(v/v) DMSO.

ATCC: *American Type Culture Collection*.

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

3.9 Tierexperimentelle Arbeiten

3.9.1 Mauslinien und Zucht

Sowohl die Tierhaltung als auch die tierexperimentellen Eingriffe erfolgten nach Vorgaben der lokalen Behörden (LAGeSo, Berlin) und wurden durch diese geprüft sowie genehmigt.

Die Mäuse wurden in einem automatisch kontrollierten Tag/Nacht-Rhythmus (12 h/12 h) und bei konstanter Temperatur in einer Pathogen-freien Umgebung gehalten. Die Standard-Nager-Diät (Haltungsfutter 1326, Zuchtfutter 1314, Altromin, Lage) und Wasser erhielten die Tiere *ad libitum*. Als Versuchstiermodell diente die

vorab generierte *Sepp-knockout* (*Sepp*^{-/-}, KO)-Mauslinie, welche einen veränderten Se-Transport von der Leber zu den Zielgeweben aufweist (Schomburg *et al.* 2003). Zusätzlich dazu wurde mit transgenen homozygoten *Sepp*^{-/-} (*Sepp*^{-/-tg}, KOtg)-Mäusen gearbeitet, die humanes SePP ausschließlich in den Hepatozyten der Leber exprimieren (Renko *et al.* 2008).

Als Nachkommen sind folgende Genotypen entstanden: *Sepp*^{+/+} (Wildtyp, WT), *Sepp*^{+/-} (heterozygot, HET), *Sepp*^{-/-} und *Sepp*^{-/-tg}. Alle Mausmodelle haben einen einheitlichen genetischen C57/BL6-Hintergrund.

Um einen geschlechtsspezifischen Einfluss des Se-Status auf die Knochenhomöostase zu untersuchen, wurde in jeder Tiergruppe mit der gleichen Anzahl an männlichen (♂) als auch weiblichen (♀) Mäusen gearbeitet (Abb. 3.1 A).

3.9.2 Spezialdiät

Jungtiere wurden am postnatalen Tag 21 (P21) von der Mutter abgesetzt und bis zur Tötung an den Tagen P35-40 mit einer speziellen Nager-Diät gefüttert (Abb. 3.1 B). Diese enthielt einen definierten Se-Gehalt, entsprechend der RDA für Mäuse (Altromin C1045, Lage, supplementiert auf 0,15 ppm Natriumselenit (Na₂SeO₃)).

3.9.3 Organpräparation und Probenvorbereitung

Die Tötung aller Versuchstiere erfolgte durch Begasung mit CO₂. Mittels Durchtrennung der Lebervene konnte das Vollblut gewonnen werden. Dieses inkubierte 1 h auf Eis und wurde zentrifugiert (10 min, 4 °C, 10 000 rpm) zur Gewinnung des Serums (obere Phase). Es wurden Leber, Niere, Hoden, Kleinhirn und Hirnrinde entnommen. Die unteren Extremitäten, bestehend aus Oberschenkel (Femur) sowie Unterschenkel (Tibia), wurden mit einer Schere vom Hüftknochen getrennt. Das Fell wurde abgezogen und die Muskeln sowie Sehnen anfangs grob abgeschnitten. Der Fuß wurde durch gegenläufige Biegung von der Tibia getrennt, ebenso wie Femur von Tibia. Anschließend konnten die restlichen Muskelfasern mit einem in PBS-getränktem Zellstofftuch abgerieben werden. Die freipräparierten Knochen (Abb. 3.1 C) wurden in flüssigem Stickstoff (N₂) schockgefroren und bis zur RNA-Gewinnung (Abschnitt 3.10.2.1/2), Proteinisolierung (Abschnitt 3.11.1.1) sowie Dekalzifizierung (Abschnitt 3.9.3.1) bei -80 °C eingelagert.

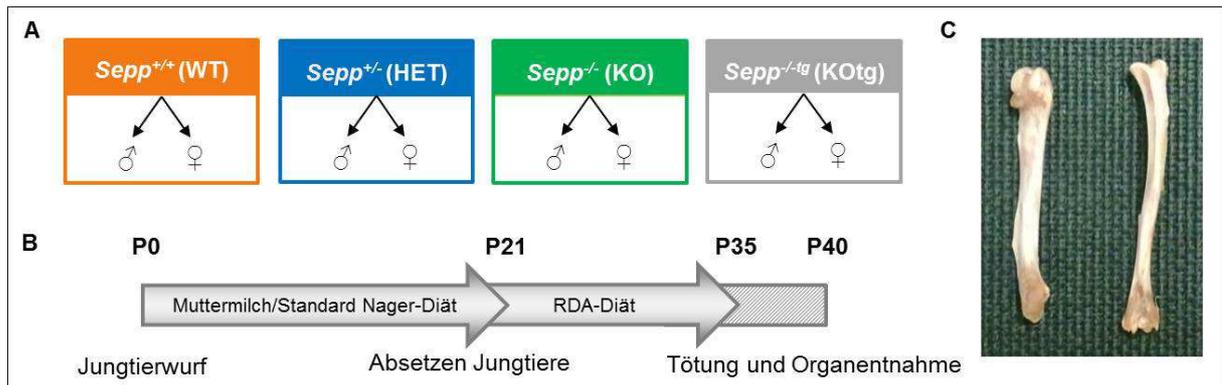


Abb. 3.1: Versuchstiergruppen und experimentelles Design. (A) Zur Untersuchung einer physiologischen Bedeutung des Se-Status im Knochen von Männchen und Weibchen wurde mit Wildtyp-Tieren ($Sepp^{+/+}$, WT), heterozygoten ($Sepp^{+/-}$, HET) und homozygoten $Sepp$ -KO- ($Sepp^{-/-}$, KO) Mäusen gearbeitet. Als zweites Mausmodell diente die transgene homozygote $Sepp$ -KO- ($Sepp^{-/-tg}$) Mauslinie, die humanes SePP ausschließlich in der Leber produziert. (B) Nach dem Absetzen der Jungtiere am postnatalen Tag P21 wurden die Tiere auf eine Se-spezifische Diät gesetzt, entsprechend der *recommended daily allowance* (RDA) mit 0,15 ppm Natriumselenit. Tötung und Organentnahme erfolgten an den Tagen P35-40. (C) Freipräparierte Oberschenkel (Femur, links) und Unterschenkel (Tibia, rechts).

3.9.3.1 Knochendekalzifizierung

Die Dekalzifizierung (Entmineralisierung) ist eine Methode um aus dem starren, unbiegsamen Knochen ein biegsames und flexibles Präparat zu machen, das anschließend weiter verarbeitet werden kann (Abb. 3.2 A, C). Bei der Dekalzifizierung werden dem Knochen mineralische Bestandteile (anorganische Matrix) entfernt. Femur und Tibia wurden für die Herstellung von Gewebeschnitten in der Immunhistochemie (Abschnitt 3.12.2) bzw. einer Knochenlösung für die spektrometrische Konzentrationsbestimmung von Spurenelementen (Abschnitt 3.14.1) demineralisiert.

Für die Gewinnung von Gewebeschnitten wurden Knochen von $Sepp^{+/-}$ - und $Sepp^{-/-}$ -Tieren 8 h in 10 mL 10% NBF bei 4 °C fixiert und 5 Tage in 10 mL Dekalzifizierungslösung (1:1, 10% NBF und 10% Ameisensäure) entkalkt (nach 2 Tagen wurde die Lösung gewechselt). Anschließend wurden die Knochen in 1 x PBS gespült und in Paraffin eingebettet (Abschnitt 3.12.1).

Für die spektrometrische Konzentrationsbestimmung von Spurenelementen wurden die Knochen in 1,5 mL-Reaktionsgefäßen gewogen und 2 bis 3 h in 2,5% Salpetersäure (HNO_3) entmineralisiert (Abb. 3.2 B). Verblieben ist die organische Matrix, die Knochen sind nun biegsam (Abb. 3.2 C).

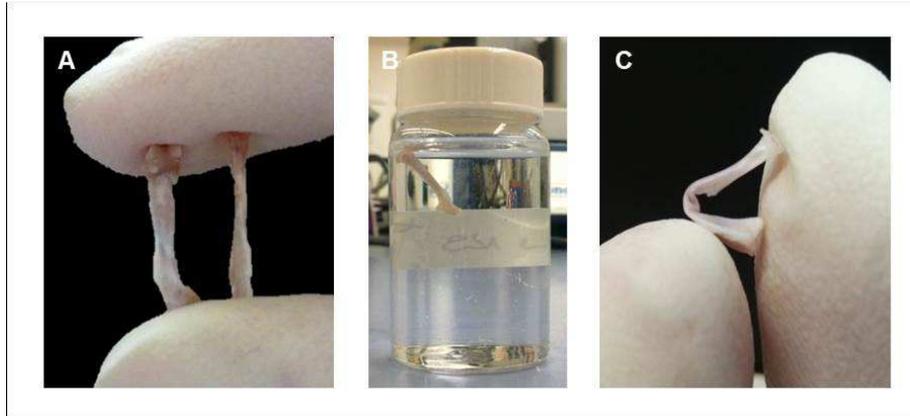


Abb. 3.2: Dekalzifizierung muriner Knochen. Die starren Knochen **(A)** wurden 2 bis 3 h in 2,5% HNO₃-Lösung entmineralisiert **(B)**, damit am Ende ein biegsamer Knochen **(C)** zur Herstellung von Gewebeschnitten bzw. Knochenlösungen für die spektrometrische Spurenelementanalyse (TRFA) zur Verfügung stand.

3.9.3.2 Proteinase K-Verdau von Knochenpulver

Zusätzlich zur Dekalzifizierung wurden 10 bis 30 mg Knochenpulver in einer 2-fachen Menge an Extraktionspuffer über Nacht bei 56 °C leicht schüttelnd verdaut (Loreille *et al.* 2007). Am nächsten Tag wurde der Ansatz kurz zentrifugiert. Der Überstand (organische Matrix) sowie das Knochenpellet (anorganische Matrix) wurden zur Quantifizierung der Spurenelemente verwendet (Abschnitt 3.14.2).

Tab. 3.7: Zusammensetzung des Extraktionspuffers.

Extraktionspuffer	10 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 8,0, 0,5% (v/v) SDS, 200 µL Proteinase K (10 µg/µL)
-------------------	---

3.9.3.3 Knochenfixierung für die mikroradiographische Untersuchung

Die freipräparierten Oberschenkel (mit femoralem Kopf!) und ein Schwanzabschnitt, bestehend aus den proximalen vier Schwanzwirbeln, wurden bis zum Röntgen im Faxitron (Abschnitt 3.15) in 70% Ethanol bei 4 °C gelagert (Beibehaltung biomechanischer Eigenschaften).

3.10 Molekularbiologische Methoden

3.10.1 Genotypisierung Sepp-defizienter Mäuse

Zur Bestimmung des Sepp-Genotyps wurde die Gesamt-DNA aus murinen Ohrstanzen gewonnen. Diese wurde mit 50 µL ALK-Puffer versetzt und für 2 h bei

95 °C im Thermocycler geschüttelt. Das Lysat wurde resuspendiert, mit der gleichen Menge NEUT-Puffer versetzt und nochmals gemischt. Hiervon wurden 1 µL DNA-Lysat zu 25 µL Mastermix pipettiert und mittels PCR vervielfältigt (Tab. 3.8).

Nach erfolgter PCR wurde der gesamte Reaktionsansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.10.3.1).

Tab. 3.8: Genotypisierungs-PCR.

DNA-Isolationspuffer			
Alkalische Lyse Puffer (ALK)	25 mL dH ₂ O, 62,5 µL 10 M NaOH, 10 µL 0,5 M EDTA, pH 12		
Neutralisationspuffer (NEUT)	24 mL dH ₂ O, 1 mL 1 M Tris-HCl, 45 µL 37% HCl, pH 5		
Pipettierschema Mastermix		PCR-Programm	
dH ₂ O	18,25 µL	Initiale Denaturierung	94 °C 5 min
10x PCR-Puffer	2,50 µL		45 Zyklen
25 mM MgCl	1,00 µL	Denaturierung	94 °C 15 s
10 mM dNTPs	0,50 µL	Annealing	53 °C 15 s
10 µM Primer 1/2/3	je 1,00 µL	Elongation	72 °C 15 s
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µL)	0,20 µL		
DNA	1,00 µL	Finale Elongation	72 °C 3 min
Gesamtes Reaktionsvolumen	26,45 µL		
Primer		Fragmentgröße	
Fw-SePPvorn	ATAGGACAACCTCAGCAATGTG		
Rev-SePP-vorne-P200	CAAGTATCAGCTGGCTTGAAGA		wt 200 bp
RevlacZ-P262	CGGGCCTCTTCGCTATTAC		het 262 bp

3.10.2 Quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

3.10.2.1 RNA-Isolierung aus murinen Knochen

Die RNA-Isolierung erfolgte auf Eis mit in flüssigem N₂ bzw. auf Trockeneis vorgekühlten Materialien.

Die tiefgefrorenen Ober- und Unterschenkelknochen wurden in Alufolie gewickelt und mit einem Hammer in kleine Stücke zerkleinert. Die Fragmente wurden in einem Teflon-Probenbehälter mit einer Stahlkugel für 1 min bei 2000 rpm im Mikrodismembrator pulverisiert. Anschließend wurde das Knochenpulver im Probenbehälter mit 1 mL TRIzol[®] Reagenz (1 mL TRIzol[®] auf 50-100 mg Gewebe) bedeckt und inkubierte 5 min bei Raumtemperatur (RT) unter dem Abzug. Die viskose Masse wurde (inklusive der Stahlkugel) in ein 2 mL-Reaktionsgefäß überführt und zweimal für 30 s (mit Kühlunterbrechung auf Eis) im *TissueLyser* bei 15 Hz

homogenisiert. Nach 3 min Inkubation auf Eis wurden 200 μ L Chloroform (0,2 mL/1 mL TRIzol[®]) zu dem Ansatz pipettiert und 10 s im *TissueLyser* vermischt. Das Homogenat wurde auf das Gel der gebrauchsfertigen 2 mL Phase Lock-Tubes geschüttet, welche Interphasenkontaminationen sowie den Kontakt mit der giftigen organischen Phase verhindert. Der Ansatz wurde mehrmals invertiert und inkubierte 10 min auf Eis, gefolgt von einer 5-minütigen Zentrifugation bei 12800 rpm (Wiederholung des Schrittes ab Chloroform). Die obere, Nukleinsäure-enthaltende Phase wurde 1:1 mit 75% Ethanol (in DEPC-H₂O) vermischt und auf die Qiagen RNeasy Säule pipettiert. Die weitere Durchführung erfolgte gemäß der Herstellerangaben des Qiagen RNeasy Mini Kits. Die RNA wurde abschließend in 50 μ L DEPC-H₂O eluiert.

3.10.2.2 RNA-Isolierung aus Leber, Niere, Gehirn und Hoden

Zur Homogenisierung wurden zwei Spatelspitzen Gewebepulver mit 1 mL TRIzol[®] versetzt, mit einer Stahlkugel im *TissueLyser* geschüttelt (5 min, 15/s) und 3 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 200 μ L Chloroform wurde der Ansatz auf die 2 mL Phase Lock-Tubes überführt, schüttelte weitere 15 sek im *TissueLyser* und inkubierte 3 min bei RT, gefolgt von einem Zentrifugationsschritt (5 min, 12 000 g, RT). Die obere Phase wurde mit 500 μ L Isopropanol vermischt und lagerte 10 min auf Eis. Nach einer weiteren Zentrifugation (10 min, 12 000 g, 4 °C) wurde die präzipitierte RNA zweimal mit 1 mL 75% Ethanol (in DEPC-H₂O) gewaschen. Abschließend trocknete die RNA bei RT und wurde in 50 μ L DEPC-H₂O gelöst.

3.10.2.3 RNA-Isolierung aus Zellen

Für die RNA-Extraktion aus MC3T3- sowie Raw264.7-Zellen (Aussaat im 6-Well-Format) wurde der Mediumüberstand abgenommen und die Zellen mit 1 mL TRIzol[®] bedeckt. Nach 5 min bei RT wurde die viskose Masse auf das Gel der Phase Lock-Tubes pipettiert und mit 200 μ L Chloroform vermischt. Der Ansatz inkubierte 7 min auf Eis und zentrifugierte 10 min bei 12000 g. Die obere Phase wurde mit 500 μ L Isopropanol vermischt und inkubierte 10 min auf Eis. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde die RNA mit 1 mL 75% Ethanol (in DEPC-H₂O) gewaschen. Das Pellet wurde 5 min bei 60 °C getrocknet und in 30 μ L DEPC-H₂O eluiert. Die RNA-Isolierung aus Zellen im 24-Well-Format erfolgte analog, es wurden

lediglich 1/5 der angegebenen Volumina eingesetzt. Die RNA wurde in 20 µL DEPC-H₂O aufgenommen.

Die RNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch mit dem NanoDrop® bestimmt und die Integrität der RNA gelelektrophoretisch kontrolliert (Abschnitt 3.10.3.2).

3.10.2.4 cDNA-Synthese

Die zuvor isolierte RNA wurde mit dem *iScript* cDNA Synthese Kit gemäß Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben (Tab. 3.9). Die Inkubationsschritte erfolgten im Thermocycler.

Tab. 3.9: cDNA-Synthese.

Mastermix cDNA-Synthese		cDNA-Synthese	
5xReaction Mix	4 µL	5 min	25 °C
<i>iScript reverse transcriptase</i>	1 µL	30 min	42 °C
RNA (100 ng/1 µg)	10/1 µL	5 min	85 °C
DEPC-H ₂ O	ad 20 µL	cDNA 1:10 mit DEPC-H ₂ O verdünnen	

3.10.2.5 qRT-PCR-Primerdesign

Geeignete Primer für die 24 murinen Selenoprotein-Gene sowie wichtige Faktoren des Selenoprotein-Metabolismus wurden mit der webbasierten *pimer3plus*-Software generiert. Die Primer wurden Intron-Intron-überspannend entworfen um Treffer im Genom auszuschließen. Exon-Intron-Grenzen wurden mittels *Blat Search* bestimmt. Alle Primer wurden unter den gleichen Standardbedingungen konstruiert und mit *reverse ePCR* überprüft. Die lyophilisierten Primer wurden gemäß Herstellerangaben in DEPC-H₂O gelöst und für den Einsatz in der qRT-PCR 1:10 verdünnt (Gebrauchslösung 10 µM). Die Effizienz der Primerpaare wurde vorab mittels einer cDNA-Verdünnungsreihe (1:5, 1:25, 1:125) in der qRT-PCR überprüft.

Alle verwendeten Primer und deren Sequenz sind im Anhang Tab. 7.1 aufgeführt.

3.10.2.6 qRT-PCR

Die qRT-PCR ist eine Methode zur Untersuchung von Genexpressionsmustern z.B. in Organen. Die cDNA aus zweimal drei Tieren pro Gruppe wurde vereinigt und im Doppelansatz untersucht. Als dazugehörige Negativkontrolle diente HPLC-H₂O anstelle der cDNA und als Positivkontrolle ein Organpool aus cDNA von Wildtyp-

Hoden, -Leber, -Niere, -Gehirn sowie -Femur und -Tibia. Alle Analysen erfolgten in 96-Well-Platten mit dem Sybr[®]Green Kit gemäß Herstellerangaben (Tab. 3.10).

Tab. 3.10: qRT-PCR-Reaktionsansatz und PCR-Programm.

Mastermix (MM)-Ansatz		PCR-Programm		
SybrGreen Reaktionsmix	12,50 µL	Initiale Denaturierung	95 °C	15 min
H ₂ O (HPLC-Qualität)	7,00 µL			40 Zyklen
Primer <i>forward</i> (10 µM)	0,25 µL	Denaturierung	95 °C	15 s
Primer <i>reverse</i> (10 µM)	0,25 µL	Annealing	58 °C	30 s
Endvolumen	20,00 µL	Elongation	72 °C	30 s
				Schmelzkurve
20 µL MM wurden pro Kavität vorgelegt und mit 5 µL cDNA gemixt.		Denaturierung	95 °C	1 min
Der Ansatz wurde kurz abzentrifugiert und mit Klebefolie versiegelt.		Starttemperatur	62 °C	1 min
				71 Zyklen
		Schmelzschrift	60 °C	10 s

Die Platte wurde kurz zentrifugiert, mit einer Klebefolie (ABsolute[™] QPCR Seal) versiegelt und im iQ5-Cycler analysiert. Eine Schmelzkurvenanalyse folgte auf jede RT-PCR-Messung, um die Primer-Spezifität und die der Amplikons zu gewährleisten. Die von der iCycler iQ 3.0 Software ermittelten CT (*cycle of threshold*)-Werte wurden auf die *housekeeper*-Gene 18S rRNA (qRT-PCR mit Knochen und Zellen) bzw. *Hprt* (qRT-PCR mit Raw264.7-Zellen und deren *siRNA*-vermittelten *knockdown* von *Apoer2*) normalisiert und mit einer Referenzkondition verglichen (Referenz Knochen: *Sepp*^{+/+} des jeweiligen Geschlechts; Referenz Zellen: Kontrolle ohne Na₂SeO₃-Behandlung). Relative Änderungen in der Genexpression wurden mittels der 2^(-ΔΔCT)-Methode bestimmt.

3.10.3 Agarosegelelektrophorese mit DNA und RNA

3.10.3.1 DNA-Gelelektrophorese

Zur exakten Größenbestimmung wurden die PCR-Reaktionen (Abschnitt 3.10.1) sowie die qRT-PCR-Ansätze (Abschnitt 3.10.2.6) nach erfolgreicher Vervielfältigung gelelektrophoretisch in einem mit Ethidiumbromid-versetzten Agarosegel in 1 x TAE-Puffer aufgetrennt (Tab. 3.11). Je nach Größe der zu erwartenden DNA-Fragmente wurden 1-2%ige Agarosegele hergestellt. Die DNA-Proben wurden mit 6 x DNA-Probenpuffer versetzt und neben einem DNA-Größenstandard (Gene Ruler[™] 1 kb

DNA ladder plus, Fermentas, Burlington) bei 120 V für 1 h aufgetrennt. Die Geldokumentation erfolgte durch Photographie unter UV-Licht.

3.10.3.2 RNA-Gelelektrophorese

Die Integrität der RNA wurde mittels eines 1%igen RNA-Agarosegels in 1 x MOPS-Puffer kontrolliert (Tab. 3.11). Ein 10 µL-Ansatz, bestehend aus 500-1000 ng RNA, 5 x RNA-Probenpuffer und DEPC-H₂O wurde 4 min bei 65 °C erhitzt und gelelektrophoretisch für 2 h bei 70 V aufgetrennt. Die RNA wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

Tab. 3.11: Zutaten der DNA- und RNA-Agarosegele.

DNA-Agarosegel	
50 x TAE-Puffer	242 g Tris, 57,1 mL Eisessig, 18,5 g Na ₂ EDTA x 2H ₂ O, dH ₂ O ad 1 L Gebrauchslösung: 1:50-Verdünnung des 50 x TAE-Puffers in dH ₂ O
6 x DNA-Probenpuffer	0,25% (w/v) Bromphenolblau, 30% (w/v) Glycerin in dH ₂ O
RNA-Agarosegel	
DEPC-H ₂ O	0,1 % DEPC in dH ₂ O, ÜN unter dem Abzug rühren, autoklavieren
20 x MOPS-Puffer	83,72 g MOPS, 8,2 g NaOAc, 20 mL 0,5 M EDTA pH 7,0, dH ₂ O ad 1 L
RNA-Gel	Agarose in 90 mL dH ₂ O aufkochen, kurz abkühlen, 6,25 mL 20 x MOPS, 2,5 µL Ethidiumbromid (10 mg/mL) und 10,5 mL 37% Formaldehyd
5 x RNA-Probenpuffer	80 µL 500 mM EDTA pH 8,0, 720 µL 37% Formaldehyd, 2 mL 20x MOPS-Puffer 3084 µL Formamid, 2 mL 100% Glycerin, DEPC-H ₂ O ad 10 mL, Spatelspitze Bromphenolblau

3.11 Proteinbiochemische Methoden

3.11.1 Proteinextraktion

3.11.1.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Knochen

Die gesamte Proteinisolierung erfolgte auf Eis. Wie in Abschnitt 3.10.2.1 beschrieben, wurden die Knochen zerkleinert und im 2 mL-Reaktionsgefäß mit einer Stahlkugel im *TissueLyser* für 1 min (20 Hz) pulverisiert. Das Gewebepulver wurde in 200 µL Homogenisationspuffer aufgenommen und mit Ultraschall aufgeschlossen (10 Pulse/Amplitude 100%/0,6). Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 14000 rpm) wurde der Überstand (zytosolische Fraktion) abgenommen. Das Zellpellet wurde in

100 μ L RIPA-Puffer homogenisiert und inkubierte 30 min auf Eis. Nach einer weiteren Zentrifugation (20 min, 14000 rpm) wurde die Membranfraktion gewonnen.

3.11.1.2 Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen

Proteine wurden aus MC3T3- sowie Raw264.7-Zellen isoliert. Die Zellen wurden mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und mit 300 μ L Homogenisationspuffer abgeschabt. Der weitere Ablauf erfolgte analog zur Proteinisolierung aus Knochen.

Tab. 3.12: Zusammensetzung der Puffer für die Proteinisolierung.

Puffer	Zusammensetzung
20x PBS	160 g NaCl, 4 g KCl, 28,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 4 g KH_2PO_4 , dH_2O ad 1 L, pH 7,5; Gebrauchslösung: 1:20 verdünnen mit dH_2O
Homogenisationspuffer	0,25 M Saccharose, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA pH 7,4
RIPA-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 0,1% (v/v) SDS, 0,5% (v/v) Na-Deoxycholat

3.11.1.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung der zytosolischen Fraktion erfolgte mit dem BIO-RAD Assay und die der Membranfraktion mit dem BCA™ Protein Assay Kit gemäß Herstellerangaben. Für die zytosolische Fraktion wurde eine BSA-Standardreihe (0-2 000 μ g/ μ L) mit dem Homogenisationspuffer und für die Membranfraktion mit dem RIPA-Puffer erstellt. Die Absorption wurde bei 595 nm im *PlateReader* ermittelt.

3.11.2 Western Blot

3.11.2.1 SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Das Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) bindet Proteine und verleiht ihnen nach außen eine negative Ladung. Die Proteine können somit relativ einheitlich im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden (Laemmli 1970).

Die in der Tab. 3.13 angegebenen Proteinmengen wurden mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und mit dH_2O auf 10 μ L Gesamtvolumen aufgefüllt. Dieser Ansatz

denaturierte 4 min bei 95 °C. Die Proteinauftrennung erfolgte bei 80 V für das Sammelgel und bei 120 V für das Trenngel, bis die untere Proteinmarker-Bande (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, ThermoScientific, Schwerte) das Gel verlassen hat (Tab. 3.13).

Tab. 3.13: Puffer, Lösungen und Proteinkonzentrationen für die SDS-PAGE.

Puffer/Lösung		Zusammensetzung	
4 x Laemmli-Probenpuffer		200 mM Tris-HCl pH 7,5, 40% (w/v) Glycerol, 16% (w/v) SDS, 20% (w/v) β-Mercaptoethanol, 0,02% (w/v) Bromphenolblau	
20% Gellösung		162,3 mL 30% Acrylamid, 65 mL 2% Bisacrylamid, 22,7 mL dH ₂ O	
Trenngelpuffer pH 8,8		45,42 g Tris Base, dH ₂ O ad 150 mL, pH 8,8	
Sammelgelpuffer pH 6,8		2 mL 20% SDS, 50 mL 1 M Tris-HCl pH 6,8, dH ₂ O ad 100 mL	
10x Laufpuffer		1,92 M Glycin, 0,25 M Tris, 1% (w/v) SDS in dH ₂ O Gebrauchslösung: 1:10-Verdünnung des 10 x Laufpuffers in dH ₂ O	
SDS-Gel	Trenngel 12,5%	Sammelgel 5%	Proteinmenge
dH ₂ O	1,25 mL	2,0 mL	Femur, Tibia, Zellen 20 µg
Trenngelpuffer pH 8,8	2,5 mL	-	
Sammelgelpuffer pH 6,8	-	1,0 mL	Leber, Niere, Hoden, 50 µg
20% Gellösung	6,25 mL	1,0 mL	Hirnrinde, Kleinhirn
10% APS	100 µL	40 µL	
TEMED	10 µL	4 µL	Serum (auf 10 µL) 0,2 µL

3.11.2.2 Western Blot und Immundetektion

Nach der Größenaufreinigung der Proteine im SDS-Gel erfolgte deren Transfer und Immobilisierung auf eine Nitrozellulosemembran (Whatman®) nach dem *Semidry Blotting*-Verfahren. Alle Reagenzien sind der Tab. 3.14 zu entnehmen.

Tab. 3.14: Reagenzien für den Western Blot und die Immundetektion.

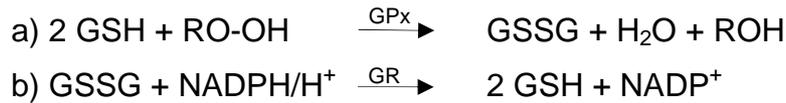
Reagenzien	Zusammensetzung
10 x Transferpuffer	30 g Tris, 142 g Glycin, dH ₂ O ad 1 L
1 x Transferpuffer	100 mL 10 x Transferpuffer, 100 mL Methanol, dH ₂ O ad 1 L
20 x PonceauS-Lösung	10 g PonceauS, 50 mL Eisessig, dH ₂ O ad 500 mL
1 x PonceauS-Lösung	25 mL 20 x PonceauS-Lösung, 25 mL Eisessig, dH ₂ O ad 500 mL
Blockierungslösung	5% (w/v) Magermilchpulver in 1 x Waschpuffer
10x Waschpuffer	33 g Tris, 74 g NaCl, 30 mL Tween20, dH ₂ O ad 1 L, pH 8,0 Gebrauchslösung: 1:10-Verdünnung mit dH ₂ O
Entwickler- und Fixierlösung	1:5-Verdünnung mit dH ₂ O

Zur Vorbereitung auf den Proteintransfer wurden das Gel, die Membran sowie zwei Lagen *Blotting*-Papier (A. Hartenstein, Würzburg) in 1 x Transferpuffer angefeuchtet. Der *Western Blot* erfolgte bei 25 V und 25 mA für 1 h. Ein erfolgreicher Proteintransfer wurde mit einer PonceauS-Rot-Färbung (30 s) überprüft. Die Membran, mit den angefärbten Proteinbanden, wurde eingescannt und diente zusätzlich als Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinbeladung im SDS-Gel. Zur Verhinderung unspezifischer Antikörperbindungen schwenkte die Membran 1 h bei RT in Blockierungslösung. Anschließend inkubierte der primäre Antikörper über Nacht bei 4 °C in der Blockierungslösung (Antikörperverdünnungen siehe Tab. 3.4). Nachdem der Antikörper am folgenden Tag weitere 30 min bei RT inkubierte, wurde die Membran 3 x à 10 min in Waschpuffer gewaschen. Der sekundäre Antikörper inkubierte 45 min bei RT in der Blockierungslösung, worauf drei Waschschrte folgten. Die Detektion der Proteine erfolgte basierend auf *enhanced chemiluminescence (ECL)* mit dem *ECL™ Western Blotting Detection*-Kit gemäß Herstellerangaben. Die Membran wurde 1 min in dem Detektionsreagenz geschwenkt, in eine Röntgenfilmkassette überführt und die Proteine wurden mit einem autoradiographischen Film detektiert. Die Belichtungszeit war abhängig von dem Probenmaterial, der eingesetzten Proteinmenge sowie dem Antikörper. Die Filmentwicklung wurde mit dem Entwicklungsgerät X-OMAT 1000 (Kodak Company, Rochester) durchgeführt bzw. manuell. Dabei wurde der Film rund 30 s in Entwicklerlösung geschwenkt (bis die Proteinbanden sichtbar wurden), kurz in dH₂O gewaschen, 3 min in Fixiererlösung fixiert (beide Röntgenchemikalien Kodak, A.Hartenstein, Würzburg), nochmals gespült und abschließend bei RT getrocknet.

3.11.3 Enzym-Aktivitätstests

3.11.3.1 Bestimmung der Glutathion-Peroxidase (GPx)-Aktivität

Die Glutathion-Peroxidasen (GPx) übernehmen als Selenoenzyme wichtige Aufgaben im Schutz vor Oxidationsschäden. So wandeln sie schädliche Peroxide (RO–OH), in Abhängigkeit des Tripeptids Glutathion (GSH), in Alkohole (ROH) und oxidiertes Glutathion (GSSG) um (a). Unter NADPH-Verbrauch wird GSSG wiederum via Glutathion-Reduktasen (GR) zu GSH reduziert (b).



Die Ermittlung der GPx1, 3 und 4-Aktivität (cGPx, pGPx und PHGPx) kann in einem *in vitro* System nachgestellt werden, z.B. im Serum und Zelllysaten (Flohe and Gunzler 1984). Die Messung erfolgt indirekt über die Ermittlung der Oxidation von NADPH/H⁺ im Spektralphotometer bei 340 nm. Zwei Küvetten wurden mit 500 µL Reaktionsmix, 500 µL dH₂O und 0,8-1 µL Proteinlysate aus Femur (zytosolische Fraktion) vermischt (ungehemmt, Tab. 3.15).

Tab. 3.15: Reagenzien für den GPx-Aktivitäts Assay.

Reagenzien	Ungehemmt (2x)	Gehemmt (1x)
Reaktionsmix	500 µL	500 µL
Mercapto-Succinat (cGPx/pGPx)	-	100 µL
Cumolhydroperoxid (PHGPx)	-	100 µL
dH ₂ O	500 µL	400 µL
Reaktionsmix	0,2 M Tris, 1 mM EDTA, 0,33 mg/mL NADPH, 1,42 mg/mL GSH, 2 U/mL GR	

Um unspezifische Umsätze von NADPH auszuschließen, wurde GPx (cGPx, pGPx) in einem Ansatz spezifisch mit Mercapto-Succinat gehemmt. Dieser Umsatz wurde am Ende von dem ungehemmten Ansatz subtrahiert. Die Quantifizierung der PHGPx-Aktivität geschah analog, jedoch mit Cumolhydroperoxid als PHGPx-Inhibitor. Als Startreagenz dienten 10 µL 0,07% tertiär-Butylhydroperoxid. Der Abfall von NADPH wurde über einen Zeitraum von 3 min verfolgt und sieben Messpunkte dokumentiert. Die Extinktionsänderung darf dabei vom Anfang bis zum Ende der Reaktion nur zwischen 10-15% liegen (ggf. Anpassung des Probenvolumens).

Unter Einbeziehung des Lambert-Beer'schen Gesetzes konnte daraufhin die GPx-Aktivität erfasst werden:

$$\frac{\text{GPx-Aktivität}}{[\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})]} = \frac{\Delta E_{340}/\text{min} \cdot V_{\text{Ansatz}} [\text{l}]}{6200 [\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] \cdot d [\text{cm}] \cdot m_{\text{Protein}} [\text{mg}]} = \frac{\Delta E_{340} \cdot [\text{mol}] \cdot 10^6}{\text{min} \cdot 6200 \cdot m_{\text{Protein}} [\text{mg}] \cdot 2}$$

V_{Ansatz} : Gesamtansatzvolumen (1 mL = 1 cm³)

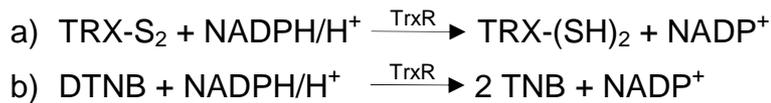
ΔE_{340} : Extinktionsänderung pro min bei 340 nm

m_{Protein} : Protein im Ansatz in mg

d : Küvettendurchmesser (1 cm)

3.11.3.2 Bestimmung der Thioredoxin-Reduktase (TrxR)-Aktivität

Thioredoxin-Reduktasen (TrxR) zählen wie GPx zu den Selenoenzymen mit wichtigen antioxidativen Eigenschaften. TrxR reduzieren *in vivo* Thioredoxin (TRX) unter NADPH-Verbrauch (a). Im künstlichen System wird als Substrat 5,5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure) (DTNB) genutzt, welches zu 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure (TNB) reduziert wird (b).



Der Abfall von NADPH wurde photometrisch bei 412 nm über einen Zeitraum von 1 min gemessen (alle 10 s). Die TrxR-Aktivität wurde im zytosolischen Proteinlysate aus Femur ermittelt (Doppelansatz). Das Lysat wurde mit 900 µL Reaktionsmix und 100 µL Homogenisationspuffer (Tab. 3.12) vermischt (Tab. 3.16). Als Referenz diente der Ansatz ohne das Lysat. Zur Ermittlung der TrxR-Aktivität wurde folgende Formel herangezogen:

$$\frac{\text{TrxR-Aktivität}}{[\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})]} = \frac{\Delta E_{412}/\text{min} \cdot V_{\text{Ansatz}} [\text{l}]}{13600 [\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] \cdot d [\text{cm}] \cdot m_{\text{Protein}} [\text{mg}] \cdot 2} = \frac{\Delta E_{412} \cdot [\text{mol}] \cdot 10^6}{\text{min} \cdot 600 \cdot m_{\text{Protein}} [\text{mg}] \cdot 2}$$

V_{Ansatz} : Gesamtansatzvolumen (1 mL = 1 cm³)

ΔE_{412} : Extinktionsänderung pro min bei 412 nm

m_{Protein} : Protein im Ansatz in mg

d: Küvettendurchmesser (1 cm)

Faktor 2: stöchiometrisches Verhältnis der Umsetzung von DTNB zu TNB

Tab. 3.16: Reagenzien für den TrxR-Enzymassay.

Reaktionsmix	100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, 10 mM EDTA pH 8,0, 0,2 mg/mL NADPH bzw. 0,2 mg/mL BSA in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, 2 mg/mL DTNB in 100% EtOH
--------------	--

3.12 Histologie und Immunhistochemische Untersuchungen

3.12.1 Einbetten von Knochen und Herstellung von Paraffinschnitten

Für die (immun-) histologische Untersuchung wurden dekalzifizierte murine Knochen (Abschnitt 3.9.3.1) in Paraffin eingebettet. Die Knochen (je ein Ober- und Unterschenkel) wurden in Paraffin-Kassetten eingelegt, und die Entwässerung sowie

die Paraffinisierung erfolgten in der Forschungsabteilung der Experimentellen Geburtsmedizin der Charité unter Anleitung der Arbeitsgruppe Plagemann. Bis zur weiteren Verarbeitung lagerten die Paraffinblöcke bei 4 °C.

Aus den Paraffinblöcken wurden 1 µm dicke Gewebeschnitte mit einem Rotationsmikrotom gefertigt, anschließend im 37 °C warmen Wasserbad gestreckt, auf einen Objektträger überführt und ÜN bei 37 °C getrocknet.

3.12.2 Alcian Blau-Färbung

Der Farbstoff Alcian Blau färbt Knorpel blau an und ermöglicht den Vergleich der Knochenbildung in *Sepp^{+/+}*-, *Sepp^{+/-}*- sowie *Sepp^{-/-}*-Mäusen zum Zeitpunkt P35-40. Die Schnitte wurden nach der Entparaffinisierung 30 min in einer Alcian Blau-Lösung geschwenkt, 3 min in dH₂O gespült und abschließend paraffinisiert (Tab. 3.17).

Tab. 3.17: Zusammensetzung der Alcian Blau-Lösung.

Alcian Blau	0,03% Alcian Blau, 80% Ethanol, 20% Essigsäure
-------------	--

3.12.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die gebräuchlichste Übersichtsfärbung in der Histologie ist die HE-Färbung. Dabei färbt der Farbstoff Hämatoxylin alle negativ geladenen, basophilen Zellbestandteile blau (z.B. Zellkerne, Knorpel). Der Farbstoff Eosin hingegen färbt alle positiv geladenen, azidophilen Zellstrukturen rot (z.B. Binde- und Muskelgewebe).

Die Präparate inkubierten 10 min bei 55 °C im Trockenschrank, woraufhin sie in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (entparaffinisiert) wurden. Es folgte eine 5-minütige Färbung in einer Hämalaunlösung, welche unter warmem, laufendem Leitungswasser (5 min) gebläut wurde. Anschließend wurden die Präparate in einer Eosinlösung, wie oben beschrieben, gefärbt. Nach der Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Paraffinisierung) wurden die Schnitte mit Entellan[®] Neu (Merck, Darmstadt) eingedeckt und für 1-2 h bei RT getrocknet. In der Tab. 3.18 sind alle Schritte der HE-Färbung erklärt.

3.12.4 Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen

Die Immunhistochemie ermöglicht es, Proteine im Gewebe zu lokalisieren. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Sepp sowie Sebp1 in Femur und Tibia von *Sepp*^{+/-}- und *Sepp*^{-/-}-Mäusen nachgewiesen. Die Liste der verwendeten Antikörper ist der Tab. 3.4 zu entnehmen und die der Puffer sowie Schritte der (Ent-) Paraffinisierung in der Tab. 3.18.

Tab. 3.18: Entparaffinisierung und Paraffinisierung von Gewebsschnitten.

Absteigende Alkoholreihe/Entparaffinisierung		Aufsteigende Alkoholreihe/Paraffinisierung	
Xylol	3 x 10 min	dH ₂ O	1 x 1 min
EtOH 100%	2 x 5 min	EtOH 40% ²	1 x 1 min
EtOH 96%	2 x 5 min	EtOH 70% ²	1 x 1 min
EtOH 70%	2 x 5 min	EtOH 96%	2 x 1 min
EtOH 40% ¹	2 x 5 min	EtOH 100%	2 x 1 min
dH ₂ O	3 x 3 min	Xylol	2 x 1 min
Hämalaunlösung	0,2% (w/v) Mayer's Hämatoxylin (Chroma, Münster), 6,25% (w/v) Kalialaun, 6,25% (w/v) Chloralhydrat, 0,125% (w/v) Zitronensäure, kristallin, 0,025% (w/v) Natriumjodat		
Eosinlösung	1,25% (w/v) Eosin Yellowish (Chroma, Münster), 70% (v/v) EtOH, vor Gebrauch 4% (v/v) Eisessig		
10 mM Citratpuffer	9 mL Stammlösung A und 41 mL Stammlösung B zu 450 mL dH ₂ O, pH 6,0 Stammlösung A: 0,1 M Zitronensäure; Stammlösung B: 0,1 M Natriumcitrat		
3% H ₂ O ₂ -Lösung	30% H ₂ O ₂ -Lösung 1:10 mit dH ₂ O verdünnen		
0,1 M PBS	20 x PBS 1:20 in dH ₂ O verdünnen		
0,1 M PBS-T	0,1 M PBS mit 0,5% Tween		
0,1 M PBS-B	0,1 M PBS mit 0,1% BSA		

¹dieser Schritt entfällt bei der Entparaffinisierung für die HE- und Alcian Blau-Färbung

²dieser Schritt entfällt bei der Paraffinisierung für die HE- und Alcian Blau-Färbung

Als Positivkontrollen dienten vorhandene Schnitte (2 µm) von Hoden, Nieren und Leber aus WT-Mäusen. In der Negativkontrolle wurde kein Erstantikörper verwendet, die Präparate wurden aber ebenso behandelt wie die übrigen Schnitte.

Die Knochenpräparate wurden entparaffiniert, worauf eine Antigen-Demaskierung mit Citratpuffer im Dampfkochtopf für 5 min bei 100 °C erfolgte. Nach dem Abkühlen des Citratpuffers wurden die Präparate dreimal 3 min in dH₂O auf dem Schüttler gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit 0,1 M PBS-T gewaschen und die endogene Peroxidase-Aktivität mittels 3%iger H₂O₂-Lösung gehemmt (10 min Schüttler). Die Schnitte wurden einmal in 0,1 M PBS-T und zweimal in 0,1M PBS à 3 min gewaschen. Anschließend wurden sie mit einem PAP-Pen (Sigma-Aldrich,

Taufkirchen) umrandet, der eine hydrophobe Abgrenzung darstellt und das Auslaufen der Antikörperlösungen verhindert. Ab diesem Schritt lagerten die Präparate in einer feuchten Kammer. Zur Reduktion falsch-positiver Ergebnisse sowie unspezifischer Färbungen durch endogenes Biotin wurden die Schnitte 10 min in unkonjugiertem Avidin blockiert, dreimal gewaschen, gefolgt von einer ebenso langen Inkubation in einer unkonjugierten Biotin-Lösung. Nach drei weiteren Waschschrritten wurden unspezifische Antikörperbindungen mit 1,5% *Normal Goat Serum* (Vectastain[®] ABC-Kit) in 0,1 M PBS für 30 min bei RT blockiert. Die Antikörper inkubierten über Nacht in 0,1 M PBS-B bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Präparate 3x gewaschen und anschließend inkubiert der Zweitantikörper in 0,1 M PBS für 30 min bei RT. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden die Reagenzien A (Avidin DH) und B (biotinylierte *Horseradish Peroxidase*, Vectastain ABC Kit) zu gleichen Teilen gemischt, 1:250 in 0,1 M PBS verdünnt und, nach einer 30-minütigen Vorinkubation im Dunkeln, für 30 min auf die Schnitte gegeben. Anschließend wurden die Präparate gewaschen. Zur Sichtbarmachung der Antikörper-Antigen-Bindung wurde das *Dako Liquid DAB+Substrate Chromogen System* gemäß Herstellerangaben verwendet, welches dabei eine braune Färbung hervorruft. Die Farbreaktion wurde unter dem Mikroskop beobachtet und in dH₂O abgestoppt. Hierauf wurden die Präparate dreimal in dH₂O gewaschen und in Hämalaulösung (1:5 in dH₂O verdünnt) für 2 min gegengefärbt. Das Bläuen der Schnitte erfolgte kurz unter warmem Leitungswasser. Nach einem kurzen Spülen mit dH₂O wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe paraffinisiert, mit Entellan eingedeckt und nach dem Trocknen der Präparate konnten diese unter dem Axioskop 2 mot plus Mikroskop analysiert werden.

3.13 Zellkultur

3.13.1 Kultivierung

Die Kultivierung der eukaryotischen Zelllinien erfolgte in einem Inkubator bei 37 °C mit 5% CO₂-Begasung und einer Luftfeuchtigkeit von 95%. Alle verwendeten Zelllinien sind in der Tab. 3.6 aufgelistet und Medien sowie Zusätze in der Tab. 3.5. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde unter einer Sterilbank gearbeitet. Alle

Materialien waren entweder steril verpackte Einmalartikel oder sie wurden im Autoklaven bei 120 °C sterilisiert.

3.13.1.1 *Passagieren von Zellen*

Die Arbeit mit Knochen-ähnlichen Zelllinien diente der Expressionsanalyse von Sepp und Apoer2. Die OB-ähnliche Zelllinie MC3T3 sowie die OC-ähnliche Zelllinie Raw264.7 wurden in einer T75-Zellkulturflasche im jeweiligen Erhaltungsmedium kultiviert. Bei einer Konfluenz von rund 90% wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurden sie mit 10 mL 1 x PBS (Tab. 3.12) gewaschen und mit 1 mL Trypsin für 2 min (MC3T3) bzw. 10 min (Raw264.7) trypsinisiert. Dieser Prozess wurde mit 9 mL Kultivierungsmedium gestoppt, und die Zellen wurden auf neue Zellkulturflaschen vereinzelt. Der Verdünnungsgrad richtete sich nach den individuellen Wachstumsbedingungen der Zelllinien (MC3T3 1:4, Raw264.7 1:10).

3.13.1.2 *Zellzählung*

Nachdem die Trypsinisierung der Zellen mit Kultivierungsmedium gestoppt wurde, wurden 10 µL des Ansatzes in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Vier Großquadrate wurden ausgezählt, gemittelt, und die Zellzahl/mL wurde mit folgender Formel ermittelt:

$$\text{Mittelwert} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl/mL}$$

3.13.1.3 *Auftauen und Einfrieren von Zellen*

Das Auftauen von Zellen geschah schnell bei 37 °C. Die Zellsuspension wurde in ein 15 mL-Röhrchen überführt und mit 10 mL Kultivierungsmedium versetzt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 1000 rpm wurde der Überstand abgenommen und mit 12 mL Kultivierungsmedium versetzt und in eine Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen frisches Kultivierungsmedium ausgetauscht. Zur Konservierung wurden konfluente Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen, trypsinisiert und 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 8 mL Konservierungsmedium aufgenommen. Jeweils 1 mL Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen aliquotiert, über Nacht bei -80 °C und anschließend im Stickstofftank (ARPEGE 140, Air Liquide) gelagert.

3.13.2 Stimulierung mit Natrium-Selenit

Zur Untersuchung, ob die Zugabe von Se einen Einfluss auf die Expression von Sepp und Apoer2 hat, wurden die Zellen mit Na₂SeO₃ stimuliert. Hierzu wurden 1-2 x 10⁶ Zellen/mL pro Vertiefung einer 6-Well-Platte in Kultivierungsmedium ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen einmal gewaschen und in Hungermedium ohne (Kontrolle) bzw. mit 100 nM Na₂SeO₃ (stimuliert) kultiviert. Pro Ansatz erfolgte eine Sechsfach-Bestimmung. Nach 6 h (RNA-Isolierung, Abschnitt 3.10.2.3) bzw. 24 h (Protein-Isolierung, Abschnitt 3.11.1.2) wurden die Zellen geerntet und weiter verarbeitet.

3.13.3 siRNA-vermittelter knockdown von Apoer2 in Raw264.7-Zellen

Das Aussäen und die Transfektion der Raw264.7-Zellen wurden am selben Tag durchgeführt. Die vier, in der Tab. 3.19 aufgelisteten, siRNA-Oligonukleotide (Qiagen, Hilden) wurden bezüglich ihrer knockdown-Effizienz getestet (laut Herstellerangaben: 77% knockdown-Effizienz bei 25 nM siRNA in Raw264.7-Zellen). Dazu wurden 2 x 10⁵ Zellen/100 µL in einer 24-Well-Platte ausgesät. Während der Vorbereitung der Transfektionsreaktion lagerten die Zellen bei 37 °C. Die siRNA-Oligonukleotide gegen den Sepp-Rezeptor Apoer2 wurden auf eine Ausgangskonzentration von 10 µM eingestellt und 50 nM (entsprechen 375 ng) siRNA-Oligonukleotide wurden pro Transfektion eingesetzt (empfohlene Konzentration laut Qiagen). Als Referenz diente ein schein-transfizierter Ansatz (Mock). Die Transfektion zur Runterregulierung von Apoer2 wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt (Qiagen „HiPerFect Transfection Reagent Handbook“). Als Transfektionsreagenz diente dabei Lipofectamine[®] 2000. Nach 48 h wurde die RNA isoliert, und die knockdown-Effizienz wurde mittels qRT-PCR bestimmt (Abschnitt 3.10.2.6).

Tab. 3.19: Auflistung der verwendeten siRNA-Oligonukleotide gegen Apoer2.

siRNA-Oligonukleotide	Ziel-Sequenz	
siRNA_2	CAGCCAAATCTGCGTGAATTA	1 nmol lyophilisierte siRNA wurde in 100 µL sterilem, RNase-freiem H ₂ O gelöst (10 µM Stock)
siRNA_3	CTCAGTCTACCTCAACTACAA	
siRNA_5	TCCCAGCATTATGGGAATGAA	
siRNA_6	CTGGTTTCAGACAACATTGAA	

Im Hauptversuch wurden die zwei *siRNA*-Oligonukleotide verwendet, die *Apoer2* am effektivsten runterreguliert haben (*siRNA_3* und *_6*). Alle Reaktionen wurden als 8fach-Bestimmungen angesetzt (vier Ansätze für lumineszenz-markiertes SePP und vier Ansätze für kaltes/unmarkiertes SePP, Abschnitt 3.13.4). Hierzu wurden in einer 96-Well-Platte 6×10^4 Zellen/30 μL ausgesät. Die Transfektion erfolgte wie oben beschrieben. Nach 24 h wurde das Kultivierungsmedium gegen Hungermedium mit 1% BSA ausgetauscht. Der Ansatz inkubierte weitere 24 h und wurde für den *in vitro* Assay zum *SePP-Uptake* vorbereitet (Abschnitt 3.13.4).

3.13.4 *in vitro* Assay zum SePP-Uptake mittels Luminometer

Mit dem Assay und dem vorangegangenen *siRNA*-vermittelten *knockdown* von *Apoer2* (Abschnitt 3.13.3) sollte *in vitro* die Bindung von SePP an seinen Rezeptor *Apoer2* in Knochen-ähnlichen Zellen bestätigt werden.

Im Vorversuch wurde untersucht, ob der Assay prinzipiell mit murinen Zelllinien möglich ist. Dazu wurde eine humane Zelllinie gewählt, die laut *in silico* Analysen den SePP-Rezeptor *Apoer2* exprimiert (Hela-Zelllinie) und eine, die *Apoer2* nicht exprimiert (HepG2-Zelllinie). Raw264.7-, MC3T3-, HepG2- und Hela-Zellen wurden im 96-Well-Format ausgesät (1×10^5 Zellen/100 μL). Nach 24 h wurde das Kultivierungsmedium gegen Hungermedium (mit 1% BSA) ausgetauscht, und die Zellen inkubierten weitere 24 h bei 37 °C. Am nächsten Tag wurde alles für den Assay vorbereitet. Dazu wurden 1200 μL Hungermedium mit 24 μL Acridiniumester-markiertem humanen SePP (= Lumi-SePP) vermischt. Dieser Ansatz wurde aufgeteilt: eine 600 μL -Reaktion (Lumi-SePP) und eine 600 μL -Reaktion mit Lumi-SePP plus 120 μL rekombinantem, humanem, Sec-freiem SePP (0,1 mg/mL; kaltes SePP) im Überschuss. Nach einer 3-stündigen Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen vorsichtig sechsmal mit Hungermedium gewaschen und die Adhärenz unter dem Mikroskop kontrolliert. Anschließend wurden die Zellen in 50 μL 1 x PBS mit 1% TritonX-100 lysiert. Gebundenes, markiertes SePP wurde mit dem Berthold Luminometer gemessen.

Der Hauptversuch wurde nur mit den Zelllinien Raw264.7 und MC3T3 durchgeführt. Nach dem *siRNA*-vermittelten *knockdown* von *Apoer2* (Abschnitt 3.13.3), wurde das Medium abgenommen und die Zellen, wie oben beschrieben, im Assay bearbeitet.

Es wurden drei verschiedene Transfektionen (zwei verschiedene *siRNA*-Oligonukleotide sowie Mock-Transfektion) als 8fach-Bestimmung angesetzt. Je vier Ansätze wurden mit 50 μL Lumi-SePP bzw. kaltem SePP versehen.

3.14 Spektrometrische Konzentrationsbestimmung

Zur Ermittlung der Konzentration von Spurenelementen (Se, Cu, Zn) in murinen Knochen und Sera wurde die Total-Reflektions-Röntgenfluoreszenz-Analytik (TRFA) verwendet. Sämtliche Analysen wurden mit dem Picofox S2 Spektrometer durchgeführt. Die TRFA ist eine sensitive Methode zur simultanen Multielement-Mikroanalyse z.B. aus Flüssigkeiten (u.a. Urin), Suspensionen sowie Matrix-reicher Flüssigkeiten (u.a. Blutserum, Gewebe) (Stosnach 2005). Somit können selbst kleinste Mengen an Spurenelementen nachgewiesen und quantifiziert werden. Zudem werden nur geringe Probenvolumina benötigt, was die TRFA besonders in der klinischen Diagnostik geeignet macht (10 μL Serum reichen für eine Doppelbestimmung). Ein interner Gallium (Ga)-Standard (10 mg/L, TraceCERT[®], Fluka) wurde für die Quantifizierung der zu untersuchenden Probe hinzugefügt. Die Funktionsweise des Spektrometers ist in der Abb. 3.3 dargestellt.

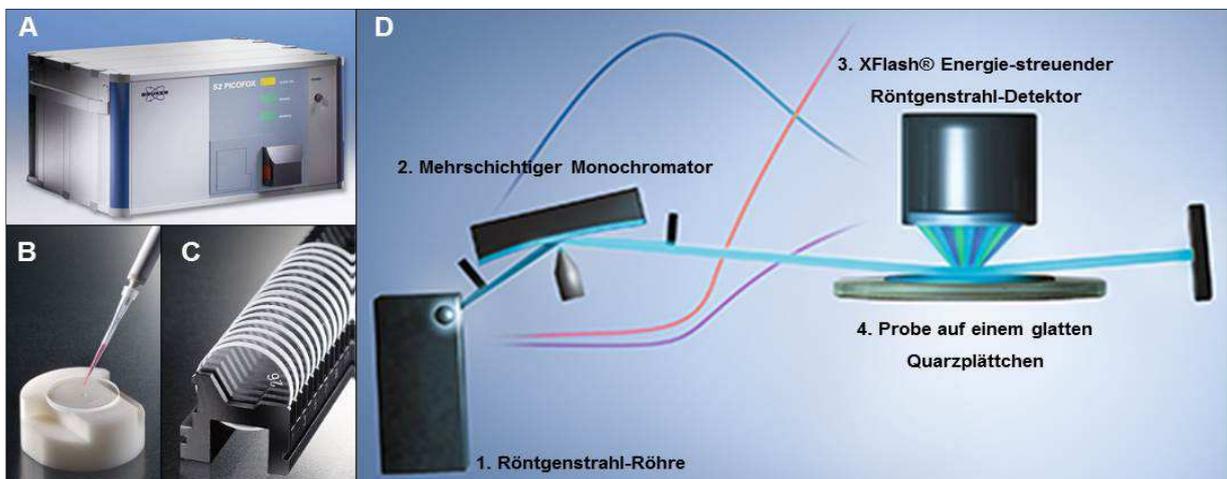


Abb. 3.3: Die Total-Reflektions-Röntgenfluoreszenz-Analytik (TRFA). (A) Die Analyse der Spurenelemente wurde im Picofox S2 Spektrometer durchgeführt. (B) Die zuvor hergestellte Knochenlösung wurde, versetzt mit einem internen Ga-Standard, auf ein Quarzplättchen pipettiert. (C) Nach dem Eintrocknen der Lösungen konnten zeitgleich zwölf Proben als Duplikate analysiert werden. (D) Röntgenstrahlen werden am mehrschichtigen Monochromator abgeleitet und bestrahlen in sehr flachem Winkel die zu untersuchende Probenlösung auf dem Quarzplättchen. Die charakteristische Wellenlänge und Fluoreszenzintensität eines jeden Elements wird vom Detektor analysiert (modifiziert nach Stosnach et al., 2005, und www.bruker.com).

Das Spektrometer arbeitet mit Röntgenstrahlung. Diese wird am Monochromator abgeleitet (80% Reflektivität), bestrahlt im sehr flachen Winkel die eingetrocknete Probe auf einem Quarzplättchen (Totalreflexion) und wird an der Strahlblende gestoppt. Dabei hat jedes Element eine charakteristische Wellenlänge, und die Gesamtenergie der Fluoreszenzstrahlung eines jeden Elements ist direkt proportional zu dessen Konzentration. Diese charakteristischen Parameter werden aus der Probe vom energiedispersiven Detektor analysiert und digital weitergeleitet. Die Auswertung erfolgt mittels der gelieferten Software.

3.14.1 Analyse von Knochen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Konzentrationsbestimmung von Spurenelementen aus Knochen mit TRFA etabliert. Die dekalzifizierten und verdauten, proteinfreien Knochenreste (Abschnitt 3.9.3.1/2) wurden pro mg Knochen, mit 2 µl 65% HNO₃ (Ga-Standard, 1000 µg/L) versetzt. Der Ansatz inkubierte unter dem Abzug im Thermomixer für 30 min bei 70 °C und 500 rpm. Für eine bessere Fixierung der Probenlösung wurden 4 µL Silikon mittig auf die Quarzplättchen pipettiert. Darauf wurden 8 µL Knochenlösung gegeben und der Ansatz trocknete ÜN unter dem Abzug. Am folgenden Tag wurden die Proben als Duplikate im S2 Picofox für jeweils 1600 s vermessen.

3.14.2 Analyse von Serum und Lösungen

Zur Quantifizierung der Spurenelemente im murinen Serum, der zytosolischen Proteinfraction, der proteinhaltigen Lösung nach dem Verdau von Knochenpulver und der Dekalzifizierungslösung (2,5% HNO₃) (Abschnitt 3.9.3.1/2) wurden die Ansätze pro µL mit 1 µL Ga-Lösung (1000 µg/L) versetzt. Die weitere Verarbeitung entspricht der in Abschnitt 3.14.1, jedoch ohne Fixierung mit Silikon. Die Serumproben wurden jeweils 1000 s vermessen, die restlichen Proben 1600 s.

3.15 Mikroradiographische Untersuchung muriner Knochen

Die relative Knochenmineralzusammensetzung präparierter Oberschenkel wurde mit dem Faxitron Röntgenapparat (*Faxitron digital X-ray point projection microradiography*) untersucht (Abb. 3.4 A). Dabei wurde ein 16-bit-Graustufenbild

des Knochens, bei einer Pixel-Auflösung von 10 μm erstellt. Die Durchführung der Röntgenmessung erfolgte gemäß Herstellerangaben. Zur Kalibrierung der Graustufen wurde neben den Knochen ein jeweils 1 mm dicker Stahl- und Aluminiumdraht (Hollinbrow Precision Products Ltd., Shropshire) sowie eine 1 mm dicke Polyesterfaser auf eine Polykarbonat-Probenplatte positioniert. Nach einer 15-sekündigen Exposition bei 26 kV wurde das Graustufenbild für die weitere Bearbeitung verwendet. Die Kalibrierung des Bildes erfolgte mit dem Programm ImageJ. Die minimalen und maximalen Graustufen der Polyesterfaser sowie des Stahldrahtes wurden notiert (der Aluminiumdraht diente als interne Referenz für die folgende Graustufen-Streckung, „stretch“). Das Bild wurde in eine 8-bit Tiff-Datei konvertiert (256 Graustufen), wobei dem Plastik die Graustufe „0“ und dem Stahl die Graustufe „255“ zugewiesen wurde. Im nächsten Schritt wurde das Graustufenbild in ein Pseudo-Farbbild (16 Farben) umgewandelt (Abb. 3.4 B).

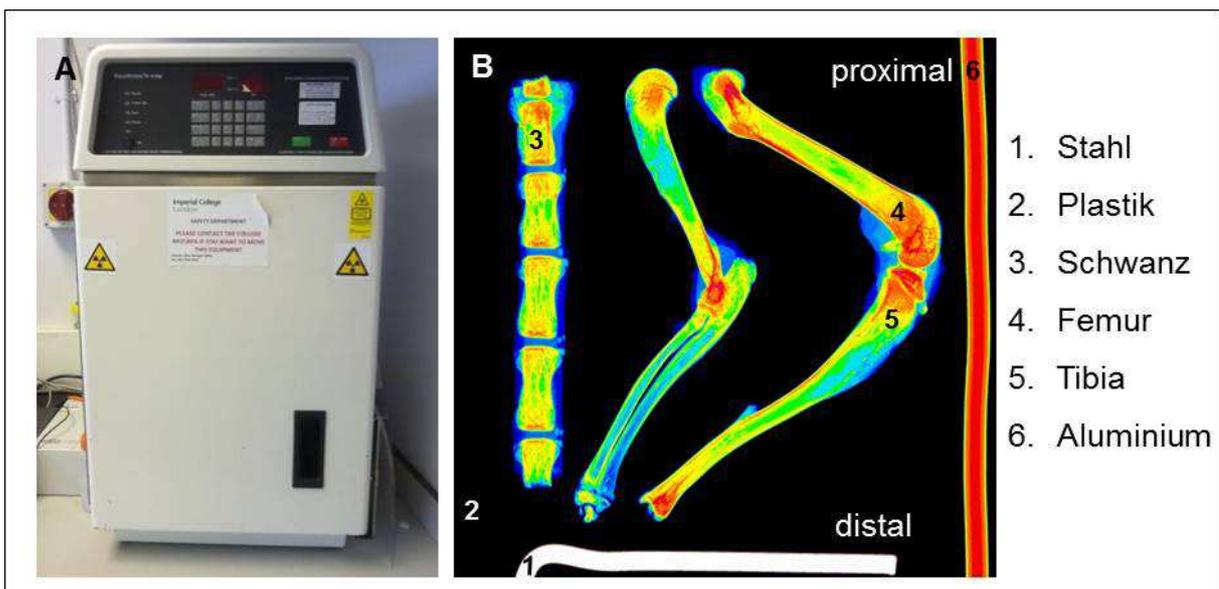


Abb. 3.4: Mikroradiographische Untersuchung der Knochenmineralisierung. (A) Faxitron Röntgengerät zur Analyse des Mineralgehaltes in Knochen. **(B)** Umwandlung des Graustufenbildes in ein 8-bit-16-Farben-Bild. Zur Kalibrierung der Graustufen werden neben dem Femur noch eine Plastikfaser (schwarz), ein Aluminium- (rot) sowie ein Stahldraht (weiß) geröntgt. Die blau dargestellten Muskelreste wurden in der anschließenden Bildmontage entfernt. Bei einer geringen Mineralisierungsdichte ist das Objekt schwarz und bei einer hohen Dichte weiß.

In einer abschließenden Bildmontage wurden potentiell vorhandene Muskelreste um den Knochen entfernt. In Excel wurde hierauf die Anzahl der Pixel in jedem der 16 Graustufeneinheiten ermittelt (Werte aus dem Histogramm in ImageJ). Die

Häufigkeitsverteilung besteht somit aus den addierten Graustufenwerten der untersuchten Knochen.

3.16 Analyse der OPUS-Auswahlkohorte

In einer sechs Jahre andauernden prospektiven Studie wurden 1278 gesunde, euthyreote, postmenopausale Frauen aus Europa untersucht. Dabei wurde der Frage nachgegangen, ob eine Verbindung zwischen dem Schilddrüsenhormonstatus (T3, T4) und damit einhergehend mit Se sowie der Knochenmineraldichte (BMD) besteht (Murphy *et al.* 2010; Hoeg *et al.* 2012). Die Arbeitsgruppe von Prof. Lutz Schomburg war an der Vermessung und Auswertung dieser Studie beteiligt, sodass uns der gesamte Datensatz zur Verfügung stand. Es wird in dieser Arbeit eine weitere Analyse durchgeführt, in der ein potentieller Einfluss weiterer Spurenelemente (Cu, Zn) auf die Knochengesundheit in derselben Population untersucht wird. Nach Ausschluss von Personen mit Erkrankungen (Krebs, renale und Knochenerkrankungen, Malabsorptionen, rheumatoide und Osteoarthritis, Magenoperationen), mit Medikamenteneinnahmen (Hormone, Thyroxine, Steroide, Vitamin D, Calcium, Antiepileptika sowie einer Vielzahl weiterer, den Knochenmetabolismus beeinflussender Medikamente), Se-Konzentrationen über 200 µg/L und Zn-Konzentrationen über 3000 µg/L sowie anormalen Schilddrüsenhormonwerten ($fT3 < 2.5$ pmol/L und $TSH > 10$ mU/L, $fT4 < 9$ pmol/L und $TSH > 10$ mU/L, $TSH < 0.1$ mU/L und $fT3 \geq 6$ pmol/L), verblieben 732 Studienteilnehmer zwischen 55-81 Jahren. Wie in der Publikation von Murphy *et al.* beschrieben wurde der BMD der Lendenwirbelsäule (*lumbar spine*), der Hüfte (*hip*) und des Oberschenkelhalses (*femoral neck*, FN) mit dem *Dual Energy X-ray Absorptiometry* (DEXA) *Scan* bestimmt. Aus dem humanen Serum wurde die Konzentration von Se, Cu und Zn mit der TRFA-Technologie ermittelt (siehe Abschnitt 3.14). Der Schilddrüsenhormonstatus (TSH, freies T4 und freies T3) war zuvor schon mit dem ARCHITECT-System bestimmt worden. Die SePP-Konzentration wurde mit dem sehr sensitiven immunoluminometrischen Sandwich Assay ermittelt (Hollenbach *et al.* 2008). Die Knochenformationsmarker Prokollagen Typ I N-terminales Propeptid (PINP) und Osteocalcin sowie die Knochenresorptionsmarker Typ I Kollagen C-terminales Telopeptid (sβCTx) waren bereits von der Londoner Arbeitsgruppe mit dem

Immunoassay ECLIA (*electrochemiluminescence immunoassay*) im Serum bestimmt, und der Knochenresorptionsmarker uNTx (Verhältnis Urin Kollagen I N-terminales Telopeptid (uNTX) zu Kreatin) mit der *dry-slide* Technologie von Ortho-Clinical Diagnostics gemessen worden. Die aufgetretenen Frakturen (Hüfte, vertebral, nicht vertebral) wurden 5-8 Jahre danach im *follow-up* durch die klinischen Partner ermittelt. Dabei hatten 51 Personen eine Fraktur, eine Person zwei Frakturen und zwei Personen drei Frakturen erlitten. Die statistischen Analysen sind im folgenden Abschnitt beschrieben.

3.17 Statistische Analysen

Statistische Analysen erfolgten mit der GraphPad Prism v.4.0- und der IBM SPSS Statistics 19-Software.

Die Ergebnisse der TRFA-Studien wurden als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) bzw. Standardfehler (SEM) dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit dem Student t-Test untersucht. Die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und der Bonferroni- bzw. Dunnett- *Post-Hoc*-Test wurden angewendet, um Unterschiede zwischen mehreren Gruppen zu identifizieren.

Zur Ermittlung einer Korrelation der Se-Konzentration zwischen Femur und Tibia sowie zwischen Serum und Knochen wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman erfasst. Der zweiseitige t-Test wurde durchgeführt, um Unterschiede in den Expressionsmustern in *Sepp*^{+/-} versus *Sepp*^{-/-}-Mäusen zu identifizieren. Geschlechtsspezifische Differenzen wurden mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) ermittelt. Um Unterschiede zwischen unabhängigen Stichproben zu ermitteln, wurde in der OPUS-Studie der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test angewendet. Korrelationen zwischen den Spurenelementen und den zu untersuchenden Parameter wurde nach Pearson berechnet. Ein nach Poisson generalisiertes Modell wurde angewendet, um das voraussichtliche Frakturrisiko in der OPUS-Kohorte für die Se-, Cu- und Zn-Quintile mit unterschiedlichen Kovarianten (Länge *follow-up*, BMI, Alter, fT3, TSH) zu ermitteln.

Eine statistische Signifikanz lag vor, sofern $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) bzw. $p < 0,001$ (***).

4 Ergebnisse

Der Knochen als metabolisch privilegiertes Organ in der Se-Hierarchie.

4.1 Das Spurenelement Selen im murinen Knochen

Über die Bedeutung des Spurenelementes Se für die Knochenhomöostase ist bis heute nur wenig bekannt. Ebenso unklar ist, in welcher Konzentration es im Knochen vorhanden ist bzw. ob es sich in der anorganischen Matrix befindet oder in der organischen, gebunden an Proteine.

Als Modellknochen wurden Oberschenkel- und Unterschenkelknochen der Maus gewählt, da diese leicht zu präparieren sind, eine geeignete Größe für biochemische und Spurenelement-Analysen haben sowie von Bedeutung sind für das Skelett und die Mineralhomöostase.

4.1.1 Analyse der Ossifikation in allen *Sepp*-Mausgruppen

Zu Beginn wurde die Knochenlänge von Femur und Tibia aller *Sepp*-Genotypen ermittelt. Dabei ergab sich keine Längendifferenz zwischen *Sepp*^{+/+}- und *Sepp*^{+/-}-Mäusen (Tab. 4.1). Die KO-Tiere zeigen ein vermindertes Längenwachstum, jedoch erreichten diese Werte keine statistische Signifikanz.

Tab. 4.1: Vergleich der Knochenlänge von *Sepp*-Mäusen¹.

Genotyp	Knochenlänge in cm	
	Femur	Tibia
<i>Sepp</i> ^{+/+}	1,16 ± 0,10	1,55 ± 0,05
<i>Sepp</i> ^{+/-}	1,15 ± 0,09	1,51 ± 0,06
<i>Sepp</i> ^{-/-}	1,05 ± 0,10	1,45 ± 0,05

¹MW (n=6) aus männlichen und weiblichen Knochen pro Genotyp.

Die Knochenmorphologie von männlichen *Sepp*-Mäusen wurde mittels HE- und Alcian Blau-Färbung untersucht. Dabei wurde kein Unterschied in der Knochenentwicklung zwischen *Sepp*^{+/+}- und *Sepp*^{+/-}-Mäusen festgestellt (Abb. 4.1 A-D). Die Knochen befinden sich am postnatalen Tag P35-40 noch im Längenwachstum, die Ausbildung der *Spongiosa* und *Kompakta* ist aber bereits deutlich. Klar abgegrenzt ist die Epiphysenfuge, welche als einziger Teil des Knochens aus Knorpel bestehen bleibt (hypertrophe Wachstumszone), bis zum Abschluss des Längenwachstums. Dagegen ist der knorpelige Anteil im Knochen der *Sepp*^{-/-}-Mäuse deutlich ausgeprägter als die Knochensubstanz *per se* (Abb. 4.1 E-F). Eine beginnende Ossifikation mit Ausbildung der *Spongiosa* ist zu erkennen.

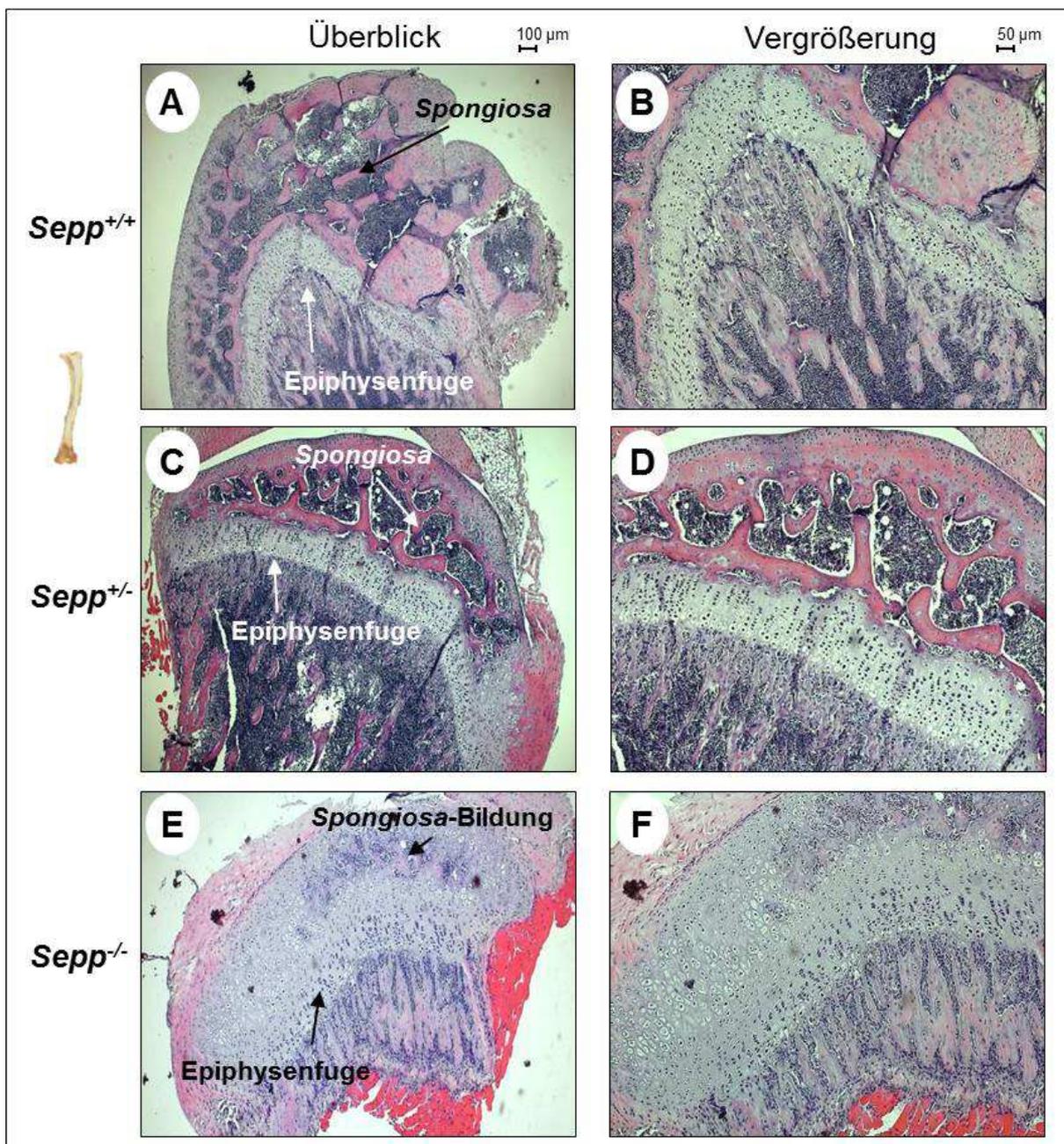


Abb. 4.1: HE-Färbung der Knochen von männlichen *Sepp*-Mäusen (P35-40). (A-B) In dem Knochen des WT-Tieres ist die Ausbildung der *Spongiosa* sowie der knorpeligen Wachstumsfuge deutlich sichtbar. (C-D) Ein ähnliches Bild zeigt sich in den *Sepp*-HET-Tieren, die keine morphologischen Unterschiede zu den WT-Mäusen aufweisen. (E-F) Dagegen scheinen die Knochen in den homozygoten *Sepp*-KO-Tieren im Vergleich zu den beiden anderen Tiergruppen in der Entwicklung erkennbar verzögert zu sein. Die Formation der *Spongiosa* befindet sich am Anfang und die Epiphyse ist noch nicht in dem Ausmaß verknöchert wie die der zwei anderen Tiergruppen.

Im nächsten Schritt wurde der knorpelige Anteil im Knochen der *Sepp*-WT- und -KO-Tiere mit der Alcian Blau-Färbung analysiert (Ausschluss der *Sepp*-HET-Mäuse, da sich kein Unterschied zu den WT-Tieren in der HE-Färbung zeigte). Die Abb. 4.2 (A-

D) bestätigt, dass der Anteil an Knorpel in den homozygoten *Sepp*-KO-Tieren ausgeprägter ist. Die beginnende Ausbildung der *Spongiosa* in der Epiphyse wird hierbei auch deutlich (Abb. 4.2 C-D). In den WT-Mäusen sind vereinzelt noch knorpelige Bereiche außerhalb der Epiphysenfuge und des artikulären Knorpels sichtbar, was auf das junge Alter der Tiere zurückzuführen ist (Abb. 4.2 A-B). Der Knochen der *Sepp*-KO-Tiere scheint in der Knochenentwicklung eine Stufe hinter dem der *Sepp*-WT- und -HET-Tiere zu sein. Während sich die *Sepp*-KO-Mäuse scheinbar in der dritten Stufe (beginnende Ossifikation) der Knochenentwicklung befinden, sind die WT-Tiere womöglich bereits in der vierten Entwicklungsstufe (Ossifikation der Epiphysen) angekommen.

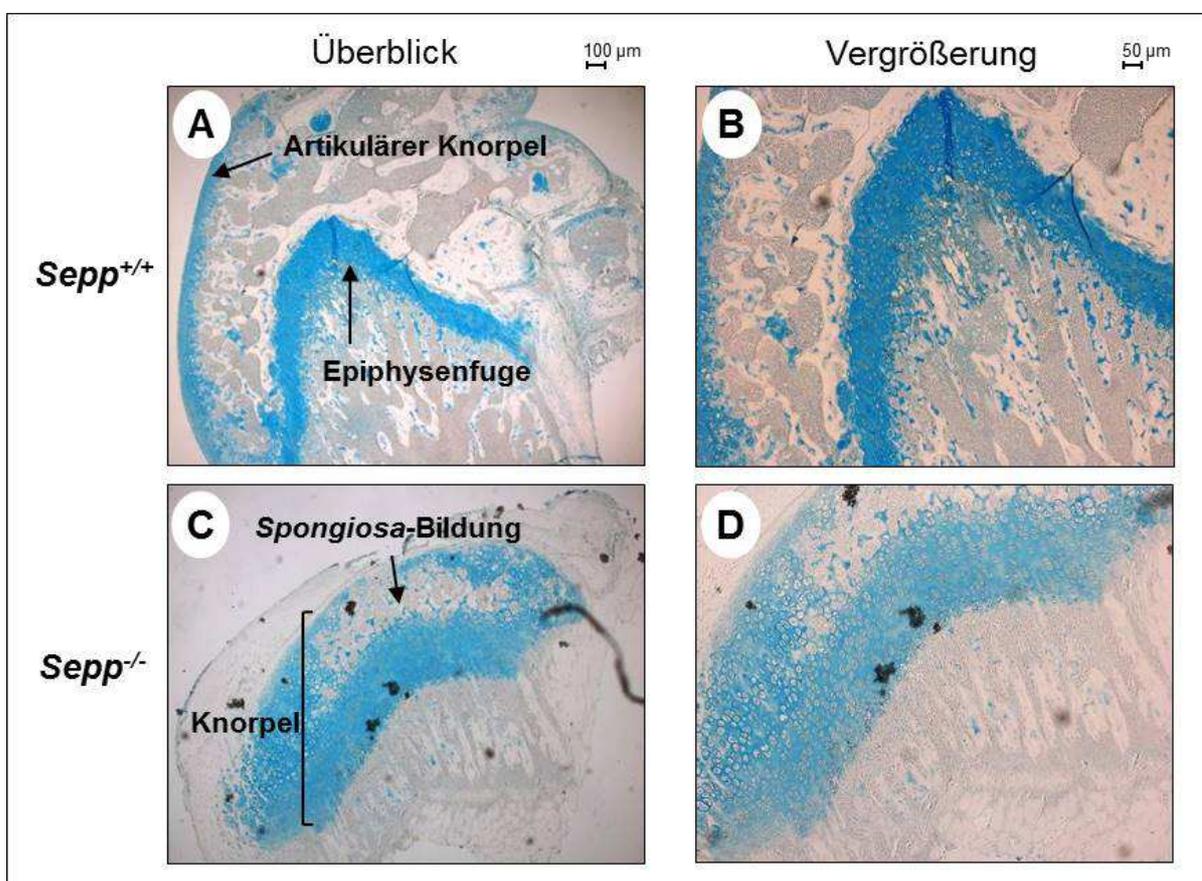


Abb. 4.2: Alcian blau-Färbung der Knochen von *Sepp*^{+/+}- und *Sepp*^{-/-}-Mäusen. Untersuchung der knorpeligen Bereiche der Wachstumsfuge. (A-B) Während in den WT-Mäusen die Epiphyse deutlich verknöchert ist und nur eine schmale Epiphysenfuge sowie artikulärer Knorpel erkennbar sind, ist die Epiphyse in den KO-Tieren noch verstärkt mit Knorpel ausgestattet (C-D). Jedoch ist die beginnende Ossifikation in allen Genotypen durch Ausbildung der *Spongiosa* sichtbar.

4.1.2 Ermittlung der Se-Konzentrationen im Knochen von *Sepp*-Mäusen

Nach der ersten morphologischen Analyse der Knochen aller *Sepp*-Genotypen, wurde untersucht, ob die Se-Konzentration im Knochen mit der TRFA bestimmt werden kann und ob diese sich zwischen den *Sepp*-Genotypen unterscheidet.

Der Se-Status im Serum wird von seinem Transportprotein *Sepp* reguliert. Somit weisen *Sepp*^{+/-}- und *Sepp*^{-/-}- Mäuse beider Geschlechter im Vergleich zu den WT-Tieren eine dramatische Reduktion im Se-Spiegel auf (Abb. 4.3 A). Die Analyse von murinen Knochen ergab einen Se-Gehalt von rund 0,135 µg/g (Tibia) und 0,145 µg/g (Femur) in männlichen WT-Tieren, wobei sich die Se-Konzentrationen innerhalb einer Tiergruppe zwischen den Knochen ähnelte (Abb. 4.3 E). Zwischen Männchen und Weibchen des gleichen *Sepp*-Genotyps konnte kein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Se-Konzentration beobachtet werden. Auffällig ist eine starke Minderung des Se-Gehaltes in *Sepp*^{+/-}- und *Sepp*^{-/-}-Mäusen, jedoch ausschließlich in Männchen (Abb. 4.3 B). Die Se-Konzentration der Knochen in Weibchen ist allein in *Sepp*^{-/-}- Nachkommen signifikant reduziert im Vergleich zu den WT-Tieren.

Die Analyse der Zn- und Cu-Konzentrationen ergab im Vergleich zu den ermittelten Se-Werten eine starke Streuung der Daten innerhalb der einzelnen Gruppen (Abb. 4.3 C-D). Des Weiteren steigt die Konzentration der beiden Spurenelemente nur in den Knochen männlicher *Sepp*^{-/-}-Mäuse an, während sich die übrigen Gruppen (einschließlich der Weibchen) vom *Sepp*-Genotyp unbeeinflusst zeigen. Eine Änderung der Zn- bzw. Cu-Konzentrationen im Serum der *Sepp*-Mäuse konnte mit abnehmender *Sepp*-Allelzahl nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Die Se-Konzentrationen in Sera und Knochen (MW Femur und Tibia) aller *Sepp*-Tiergruppen korreliert positiv ($r^2=0,9240$) (Abb. 4.3 F). Jedoch ist der Anstieg des Graphen asymmetrisch und die Unterschiede in der Serum Se-Konzentration werden nicht linear im Knochen widerspiegelt. Die Konzentrationsunterschiede zwischen den Genotypen im Serum sind ausgeprägter als im Knochen (25-facher Unterschied zwischen *Sepp*^{+/+} und *Sepp*^{-/-} im Serum versus 2,5-fache Differenz im Knochen). Dies deutet auf eine relative Resistenz des Knochens gegenüber niedrigen Serum Se-Konzentrationen hin.

Somit konnte die Bestimmung der Spurenelementkonzentrationen aus murinen Knochen mittels der TRFA in dieser Arbeit etabliert und optimiert werden.

Serum ein ausgeprägter Se-Mangel mit abnehmender Anzahl der *Sepp*-Allele zu beobachten ist (25-facher Unterschied zwischen *Sepp*^{+/+} und *Sepp*^{-/-}), weist der Knochen (MW aus Femur und Tibia) einen mäßigen Abfall bezüglich des Se-Gehaltes zwischen *Sepp*^{+/+} und *Sepp*^{-/-} auf (2,5-fach). Dies hebt die Bedeutung des Knochens als ein privilegiertes Organ in der Se-Hierarchie, hervor. Darstellung der Werte (n=3) als MW±SD (A-B) bzw. MW±SEM (C-D). Die statistische Evaluierung wurde mittels einfaktoriellem ANOVA und dem Bonferroni *Post-Hoc*-Test durchgeführt; (p<0,05 (*), p<0,01 (**)) bzw. p<0,001 (***)). Die Daten der Einzeltiere (n=3) wurden mit dem Spearman Korrelationskoeffizienten analysiert (E-F).

4.1.3 Lokalisation von Se in der Knochenmatrix

Mit der TRFA konnte die Se-Konzentration im dekalzifizierten Knochen ermittelt werden. Jedoch ist nicht bekannt, ob Se in der anorganischen Knochenmatrix lokalisiert ist und somit durch die Entmineralisierung entfernt wird. Die Abb. 4.4 A zeigt die Gewinnung der anorganischen und organischen Phase nach dem Verdau sowie der Dekalzifizierung der Knochen. Die Analyse der einzelnen Phasen ergab, dass Se ausschließlich in der organischen Matrix, gebunden an Knochenproteinen, vorliegt und nicht mit der Entkalkung aus dem Knochen entfernt wird.

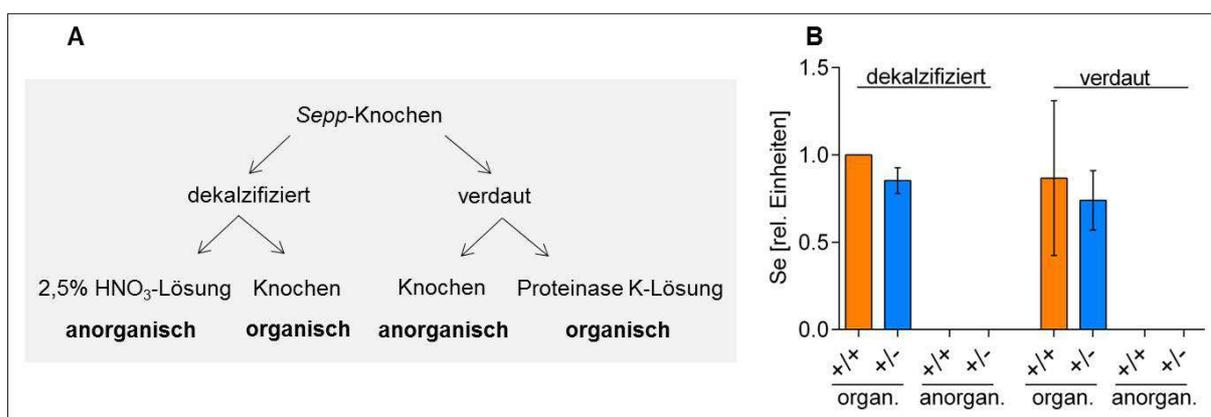


Abb. 4.4: Der Se-Gehalt in der anorganischen und organischen Knochenmatrix. Die Lokalisation von Se erfolgte mit TRFA in männlichen sowie weiblichen *Sepp*^{+/+}- und *Sepp*^{+/-}-Mäusen. **(A)** Darstellung der Gewinnung der anorganischen sowie organischen Matrix aus dekalzifiziertem und verdautem Knochen (Femur und Tibia). **(B)** Se ist exklusiv in der organischen Knochenmatrix detektierbar, assoziiert mit der Proteinfraktion. Die Se-Konzentration ist bezogen auf die dekalzifizierten *Sepp*^{+/+}-Knochen (WT=1) dargestellt; MW±SEM (n=3).

4.2 Expression der Selenoproteingene und Faktoren des Selenoproteinmetabolismus

Nachdem mittels der TRFA die Se-Konzentrationen im Knochen bestimmt werden konnten und sich hierbei geschlechtsspezifisch signifikante Unterschiede im Se-Gehalt mit abnehmender Anzahl an *Sepp*-Allelen zeigten wurde die Expression der Selenoproteingene im murinen Knochen untersucht.

4.2.1 Analyse der Selenoprotein-Genexpression im Knochen

Von den bekannten 24 Selenoproteingenen in Nagetieren konnte die Expression von 22 Genen im Knochen von *Sepp* WT-Mäusen mittels qRT-PCR nachgewiesen werden (Tab. 4.2). Die Ausnahmen sind *Dio1* und *Selv*. Statistisch signifikante geschlechtsspezifische Expressionsunterschiede sind nur für *Txrnd2* und *Sepn* präsent ($p < 0,05$). Die *in silico* Analyse deutet keine Expression von *Dio1* und *Selv* im Knochen an, was im Einklang mit den Ergebnissen der qRT-PCR ist.

Tab. 4.2: Geschlechtsspezifische Unterschiede der Knochentranskript-Level Se-bezogener Gene in WT-Mäusen sowie in *in silico* Expressionsanalysen.

Gen	<i>Sepp</i> ^{+/+} ♀/♂ ¹	<i>in silico</i> Analyse ⁴		
		Knochen	Osteoblast	Osteoklast
<i>Gpx1</i>	0,9	●		<
<i>Gpx2</i>	0,8	●		<
<i>Gpx3</i>	1,2	●		>
<i>Gpx4</i>	3,3	●		<
<i>Dio1</i>	-- ²	-- ²		Nicht bestimmt
<i>Dio2</i>	1,2	●		>
<i>Dio3</i>	0,8	keine Angabe		keine Angabe
<i>Txrnd1</i>	1,0	●		<
<i>Txrnd2</i>	0,8 ³	●		<
<i>Txrnd3</i>	1,1	●		<
<i>Sephs2</i>	1,0	●		<
<i>Sepp</i>	0,9	●		>
<i>Selr</i>	2,3	●		<
<i>Sepn</i>	0,6 ³	●		>
<i>Sep15</i>	1,0	●		>
<i>Selw</i>	1,3	●		>
<i>Selh</i>	1,0	●		<
<i>Seli</i>	1,3	●		<
<i>Selk</i>	1,3	●		>
<i>Selm</i>	1,0	●		>
<i>Selo</i>	1,4	●		<
<i>Selt</i>	1,1	-- ²		-- ²
<i>Selv</i>	-- ²	-- ²		-- ²
<i>Sels</i>	1,2	●		>

¹ qRT-PCR mit cDNA männlicher und weiblicher *Sepp*^{+/+}-Mäuse.

MW der relativen Expressionswerte ($2^{-\text{ddCt}}$) von Femur und Tibia sind dargestellt.

Expressionsmuster wurden auf *18S rRNA* normalisiert und mit der Referenzkondition

Sepp^{+/+} ♂ (Ratio=1) verglichen. MW (n=6) wurden mittels t-Test (2-seitig) evaluiert.

² unter dem Detektionslimit (Ct>40).

³ Signifikanz: $p < 0,05$ (*).

⁴ Die *in silico* Analyse wurde mit der BioGPS-Datenbank (biogps.org) durchgeführt. Die transkriptionelle Aktivität der Selenoproteingene wurde im murinen Knochen untersucht und zwischen OC und 21 Tage alten OB verglichen.

Beim *in silico* Vergleich der Selenoproteinexpression in den OB und der OC zeigt sich eine stärkere Expression antioxidativer Selenoproteine (z.B. *Txrnd*, *Gpx1*) in den

OC. Für die Protein-Qualitätskontrolle relevante Selenoproteine (z.B. *Sels*, *Sep15*) werden dagegen vornehmlich in den OB gebildet.

4.2.2 Vergleich der Expressionsmuster aller gebildeten Selenoproteingene

Die Analyse der verschiedenen *Sepp*-Genotypen ergab eine dosisabhängige Reduktion der *Sepp* mRNA in *Sepp*^{+/-}- sowie *Sepp*^{-/-}-Mäusen (Tab. 4.3).

Tab. 4.3: mRNA-Expressionsmuster der Selenoproteine in murinen Knochen¹.

♂	<i>Sepp</i> ^{+/-}	<i>Sepp</i> ^{-/-}	♀	<i>Sepp</i> ^{+/-}	<i>Sepp</i> ^{-/-}
<i>Gpx1</i>	1,4	1,6	<i>Gpx1</i>	1,8	0,3 ⁴
<i>Gpx2</i>	0,6	0,8	<i>Gpx2</i>	1,1	0,5 ³
<i>Gpx3</i>	1,2	1,0	<i>Gpx3</i>	1,0	0,5 ⁴
<i>Gpx4</i>	3,5	0,1 ³	<i>Gpx4</i>	1,2	0,5 ⁴
<i>Dio1</i>	-- ²	-- ²	<i>Dio1</i>	-- ²	-- ²
<i>Dio2</i>	1,0	0,8	<i>Dio2</i>	1,3	1,7
<i>Dio3</i>	1,6	0,1 ⁴	<i>Dio3</i>	5,7	0,5
<i>Txrnd1</i>	1,2	3,3	<i>Txrnd1</i>	1,6	1,1
<i>Txrnd2</i>	1,2	2,1	<i>Txrnd2</i>	1,7	1,2
<i>Txrnd3</i>	1,5	2,0	<i>Txrnd3</i>	1,8	1,1
<i>Sephs2</i>	1,4	1,7	<i>Sephs2</i>	1,6	1,2
<i>Sepp</i>	0,3	0,0 ⁵	<i>Sepp</i>	0,5	0,0 ⁵
<i>Selr</i>	1,5	0,5	<i>Selr</i>	1,0	0,8
<i>Sepn</i>	1,1	0,6	<i>Sepn</i>	1,6 ³	1,3
<i>Sep15</i>	1,4	1,0	<i>Sep15</i>	2,6 ³	0,6
<i>Sepw</i>	2,1	5,0	<i>Sepw</i>	1,4 ³	0,8 ³
<i>Selh</i>	1,2	2,1	<i>Selh</i>	2,8	0,4
<i>Seli</i>	1,5	9,9 ⁴	<i>Seli</i>	1,4	1,0
<i>Selk</i>	1,7	0,0 ⁵	<i>Selk</i>	1,7	0,5 ⁴
<i>Selm</i>	1,2	0,7	<i>Selm</i>	1,6	0,6
<i>Selo</i>	2,0	1,1	<i>Selo</i>	1,7	1,1
<i>Selt</i>	1,0	1,4	<i>Selt</i>	1,1	0,7
<i>Selv</i>	-- ²	-- ²	<i>Selv</i>	-- ²	-- ²
<i>Sels</i>	1,1	5,6 ⁴	<i>Sels</i>	1,4	0,6 ³

¹ qRT-PCR mit cDNA aus Femur und Tibia von *Sepp*^{+/+}, *Sepp*^{+/-} und *Sepp*^{-/-}- Mäusen.

MW der relativen Expressionswerte ($2^{-(ddCt)}$) von Femur und Tibia sind dargestellt.

Expressionsmuster wurden auf *18S rRNA* normalisiert und mit der Referenzkondition *Sepp*^{+/+} des jeweiligen Geschlechts.

MW (n=6) wurden mittels einfaktoriellem ANOVA und Dunnett-*Post Hoc*-Test evaluiert.

² unter dem Detektionslimit (Ct>40).

³ p<0,05, ⁴ p<0,01, ⁵ p<0,001.

Die Mehrzahl der restlichen Selenoproteingene zeigt sich unbeeinflusst durch mäßigen Se-Mangel. Allein die Expression von *Sepn*, *Sep15* und *Sepw* ist in weiblichen *Sepp*^{+/-}-Mäusen erhöht. Dagegen sind die Transkriptlevel einiger Selenoproteingene in *Sepp*^{-/-}-Mäusen stark beeinflusst in beiden Geschlechtern: die

mRNA von *Gpx1-4*, *Selw*, *Selk* und *Sels* ist signifikant reduziert (um 30-80% gegenüber WT-Level) in weiblichen *Sepp*^{-/-}-Mäusen.

Die Transkripte von *Gpx4*, *Selk* und *Dio3* sind im Vergleich zum WT auf <10% runterreguliert in männlichen *Sepp*^{-/-}-Mäusen. Ausschließlich die mRNA von *Seli* und *Sels* wurden geschlechtsspezifisch in KO-Tieren hochreguliert.

4.2.3 Expression und Lokalisierung von Sepp in murinen Organen

Die Expression von Sepp wurde im nächsten Schritt auf Proteinebene analysiert. Neben bekannten, Sepp-exprimierenden Organen (z.B. Hoden), konnte Sepp auch in Femur und Tibia nachgewiesen werden (Abb. 4.5 A-B). Die verwendeten Sepp-Antikörper (A- polyklonal gegen murines Sepp, B- monoklonal gegen humanes SePP) erkennen jeweils Sepp (ähnliches Bandenmuster bei 45, 57 und 60 kDa), jedoch unterschiedliche Isoformen.

Die ausbleibende Expression von *Sepp* in *Sepp*^{-/-}-Mäusen konnte auch auf Proteinebene für beide Geschlechter bestätigt werden (Abb. 4.5 C). Sepp ist in WT- und HET-Tieren bei ungefähr 42, 45 und 47 kDa detektierbar.

Eine verminderte Sepp-Expression konnte nicht eindeutig auf dem Proteinlevel gezeigt werden. Jedoch zeigt die Aktinkontrolle eine höhere Proteinbeladung in den HET-Proben als in den WT-Lysaten, sodass von einer verringerten Sepp-Bildung ausgegangen werden kann.

Der immunhistologische Nachweis von Sepp zeigt dessen Expression in den proximalen Tubuli der Niere (Abb. 4.5, D) und den Hepatozyten in der Peripherie der Gefäße (Abb. 4.5, E). Im murinen Knochen kann Sepp im blutbildenden Knochenmark um die OB sowie OC lokalisiert werden (Abb. 4.5 H-I), während der Knochen *per se* (*Kompakta*, Knochenbälkchen, Wachstumszone, Knorpel) kein Signal aufweist (Abb. 4.5 F). In *Sepp*-KO-Mäusen (Abb. 4.5 G) und der Kontrolle ohne den Sepp-Antikörper (nicht dargestellt) ist bis auf ein Hintergrundsignal kein Sepp detektierbar.

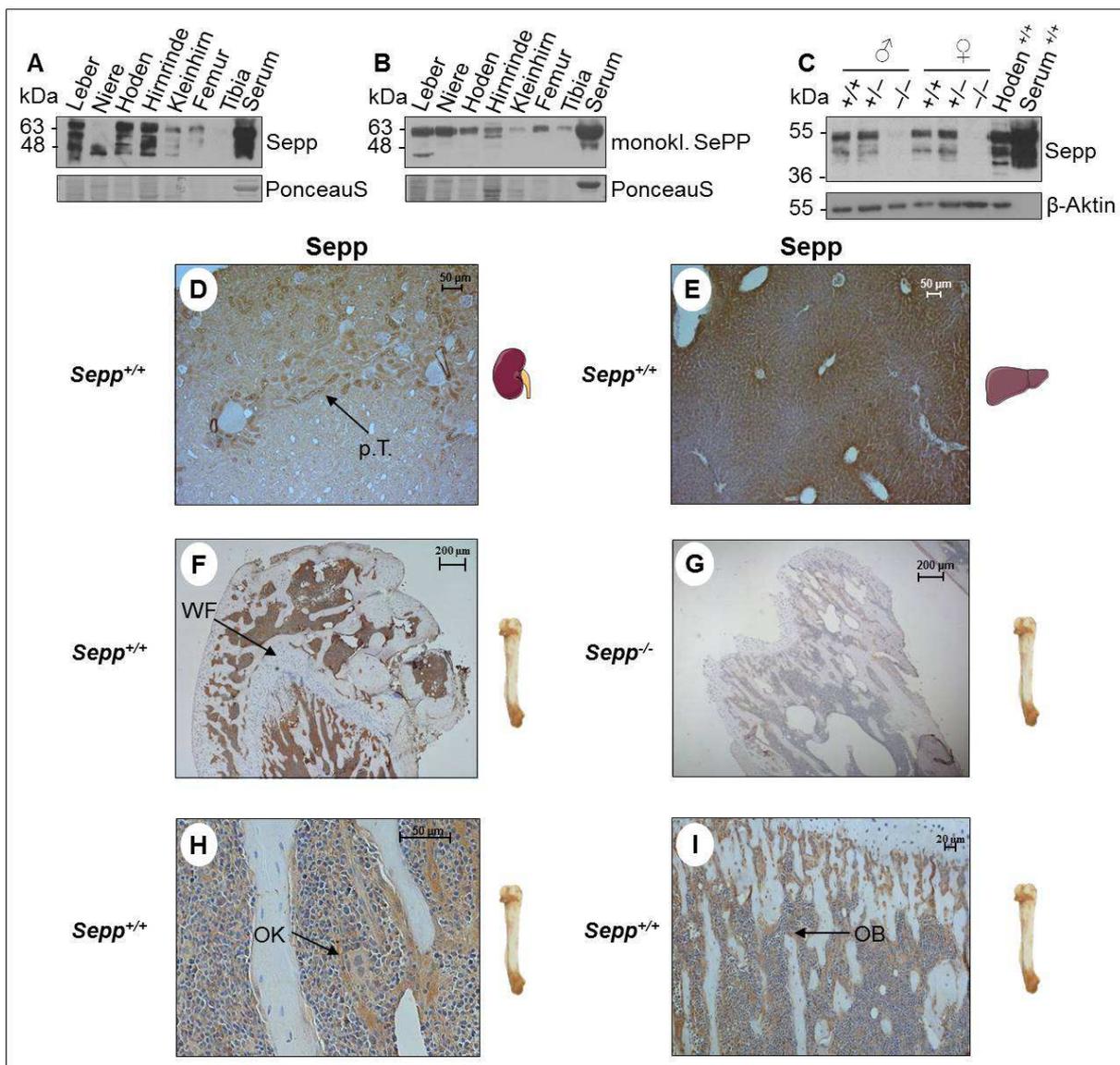


Abb. 4.5: Expression von Sepp in murinen Organen. (A-C) Nachweis der Sepp-Expression via Western Blot. (A) Detektion von Sepp bei rund 45, 57 und 60 kDa in der Membranfraktion (50 µg Proteinlysate) verschiedener muriner, männlicher WT-Organen mit dem polyklonalen Sepp-Antikörper. (B) Detektion von Sepp bei rund 60 kDa in der zytosolischen Fraktion (50 µg Proteinlysate) verschiedener muriner WT-Organen mit dem monoklonalen SePP-Antikörper. (C) Nachweis von immunoreaktivem Sepp in der zytosolischen Proteinfraction (20 µg) aus Femur in *Sepp*^{+/+}- und *Sepp*^{-/-}-Mäusen bei rund 42, 45 und 47 kDa, jedoch nicht in *Sepp*-KO-Tieren. Lysate aus Hoden und Serum dienen als Kontrollen. (D-I) Immunhistochemischer Nachweis von Sepp mit dem polyklonalen Antikörper in verschiedenen murinen Organpräparaten. Lokalisierung von Sepp in den proximalen Tubuli (p.T.) der Niere (D) und den Hepatozyten um die Gefäße der Leber herum (E). (F-I) Lokalisierung von Sepp im Knochen. (F) Sepp ist im nicht-mineralisierten Teil des Knochens detektierbar sowohl um Osteoklasten (OK, H) als auch Osteoblasten (OB, I) von *Sepp*^{+/+}-Mäusen, jedoch nicht in der Wachstumsfuge (WF). (G) Hintergrundsignale sind in den *Sepp*-KO-Tieren vorhanden.

4.2.4 Hepatisches SePP als Transporter in den Knochen?

Die Expression von Sepp im Knochen konnte auf transkriptionaler und Proteinebene bestätigt werden. Hierauf wurde der Transport von Se mittels SePP zu den Knochen untersucht. Dazu wurde der Se-Gehalt in Femur und Tibia von *Sepp*^{-/-tg}-Mäusen ermittelt, die SePP ausschließlich in der Leber bilden. Auffallend ist die statistisch signifikant erhöhte Se-Konzentration in Femur und Tibia gegenüber homozygoten *Sepp*-KO-Mäusen in beiden Geschlechtern (Abb. 4.6 A). Dabei erreichen die Se-Werte nahezu die der heterozygoten Tiere (Tab. 4.4). Eine statistisch signifikante Veränderung in der Se-Konzentration konnte dagegen nicht im Serum der transgenen *Sepp*-KO-Mäuse beobachtet werden (Abb. 4.6 B, Tab. 4.4).

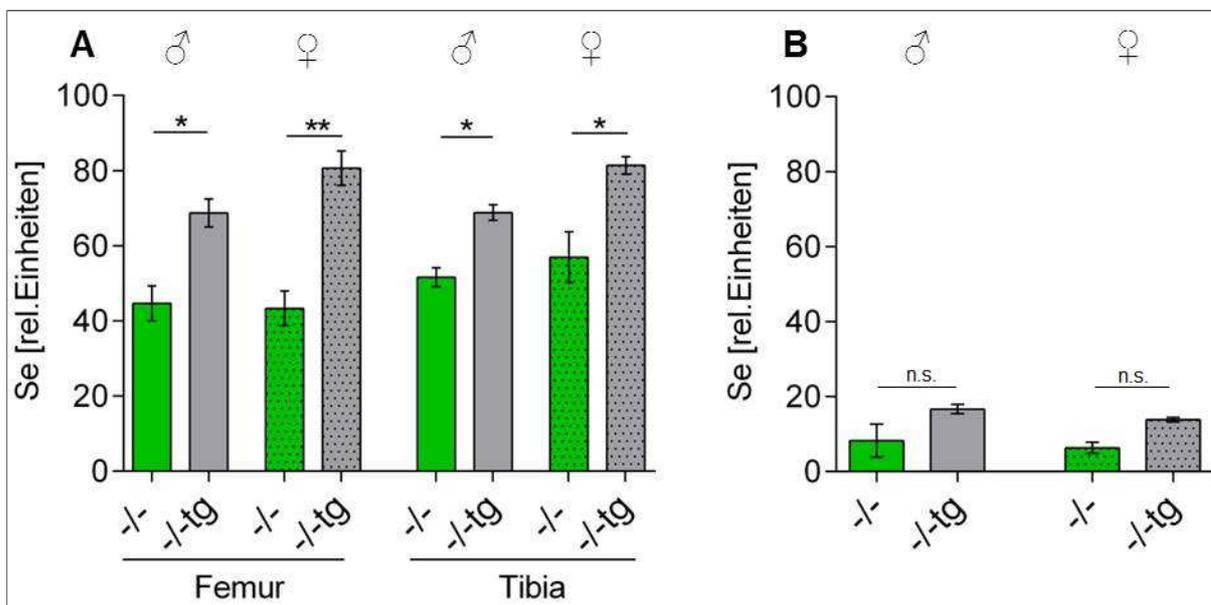


Abb. 4.6: SePP als hepatischer Se-Transporter für den Knochen. (A) Die Se-Konzentration steigt in *Sepp*^{-/-tg}- im Vergleich zu *Sepp*^{-/-}-Mäusen signifikant an, sowohl in Männchen als auch in Weibchen. **(B)** Im Serum ist die Se-Konzentration nur mäßig erhöht in transgenen KO-Mäusen bezogen auf KO-Tiere. Die Se-Werte wurden mittels der TRFA ermittelt und sind bezogen auf WT-Tiere (=100%) als MW±SD (n=3) dargestellt; n.s.- nicht signifikant. Statistische Analysen erfolgten mit einfaktorier ANOVA und Bonferroni-Post-Hoc-Test (p<0,05 (*), p<0,01 (**)).

In der Tab. 4.4 ist eine zusammenfassende Auflistung der ermittelten Se-Konzentrationen in allen *Sepp*-Genotypen, Geschlechtern sowie in Femur, Tibia und Serum. Wie in der Abb. 4.3 (F) zu erkennen ist, werden die Unterschiede im Serum Se-Gehalt nicht linear im Knochen reflektiert, was das ermittelte Verhältnis der Se-Konzentration aus Knochen und Serum nochmals verdeutlicht.

Tab. 4.4: Vergleichende Analyse der Se-Konzentration in allen *Sepp*-Mausgruppen.

Genotyp	MW Se [ng/g]			[µg/L]	Verhältnis [Se] Knochen/Serum
	Femur	Tibia	Knochen ¹	Serum	
<i>Sepp</i> ^{+/+} ♂	145 ± 16	135 ± 12	140 ± 13	468 ± 60	0,30
	129 ± 6	122 ± 11	126 ± 7	424 ± 24	0,30
<i>Sepp</i> ^{+/-} ♂	103 ± 3	106 ± 5	104 ± 2	266 ± 25	0,39
	117 ± 10	115 ± 10	116 ± 9	294 ± 37	0,39
<i>Sepp</i> ^{-/-} ♂	65 ± 9	70 ± 9	67 ± 11	40 ± 26	1,67
	56 ± 8	70 ± 14	63 ± 3	27 ± 8	2,34
<i>Sepp</i> ^{-/-tg} ♂	99 ± 6	93 ± 9	96 ± 6	79 ± 15	1,22
	105 ± 11	99 ± 8	102 ± 2	59 ± 7	1,73

Werte sind als MW±SD (n=3) dargestellt.

¹ Arithmetisches Mittel aus Femur und Tibia.

4.2.5 Bestimmung der Enzymaktivitäten im Femur der *Sepp*-Mäuse

Die zytosolische Proteinfraction aus Femur wurde hinsichtlich ihrer Enzymaktivität (GPx, GPx4 und TrxR) in allen *Sepp*-Tiergruppen untersucht. Es ist keine statistisch signifikante Änderung der Enzymaktivität in den *Sepp*-HET- und -KO-Mäusen für Gpx1, 3 und 4 erkennbar, jedoch liegen diese Werte deutlich unter denen der WT-Mäuse (Abb. 4.7 A-B). Die mit der qRT-PCR ermittelten Expressionswerte von *Gpx1*, 3 und 4 im Femur zeigen lediglich eine Reduktion von *Gpx1* und 3 in weiblichen *Sepp*^{-/-}-Mäusen (Daten nicht gezeigt). Die *Gpx4*-Transkripte sind in beiden Geschlechtern leicht erhöht sowie die *Gpx1* mRNA in männlichen KO-Tieren (Daten nicht gezeigt).

Die Anzahl der *Sepp*-Allele hat keinen Einfluss auf die TrxR-Aktivität. Einzig in den weiblichen *Sepp*-HET-Mäusen ist eine statistisch signifikante Reduktion der Enzymaktivität ersichtlich (Abb. 4.7 C).

Beim Vergleich der *Sepp*^{+/+}- und *Sepp*^{+/-}-Mäuse konnte für GPx eine positive Korrelation zwischen der Enzymaktivität und der Se-Konzentration in der Proteinfraction im Femur beobachtet werden (Abb. 4.7 D-F). In den Lysaten der *Sepp*^{-/-}-Tiere konnte mittels TRFA kein Se ermittelt werden, jedoch waren die Selenoproteine enzymatisch aktiv. Das Se in den Proteinen kann somit nicht aus der Leber stammen.

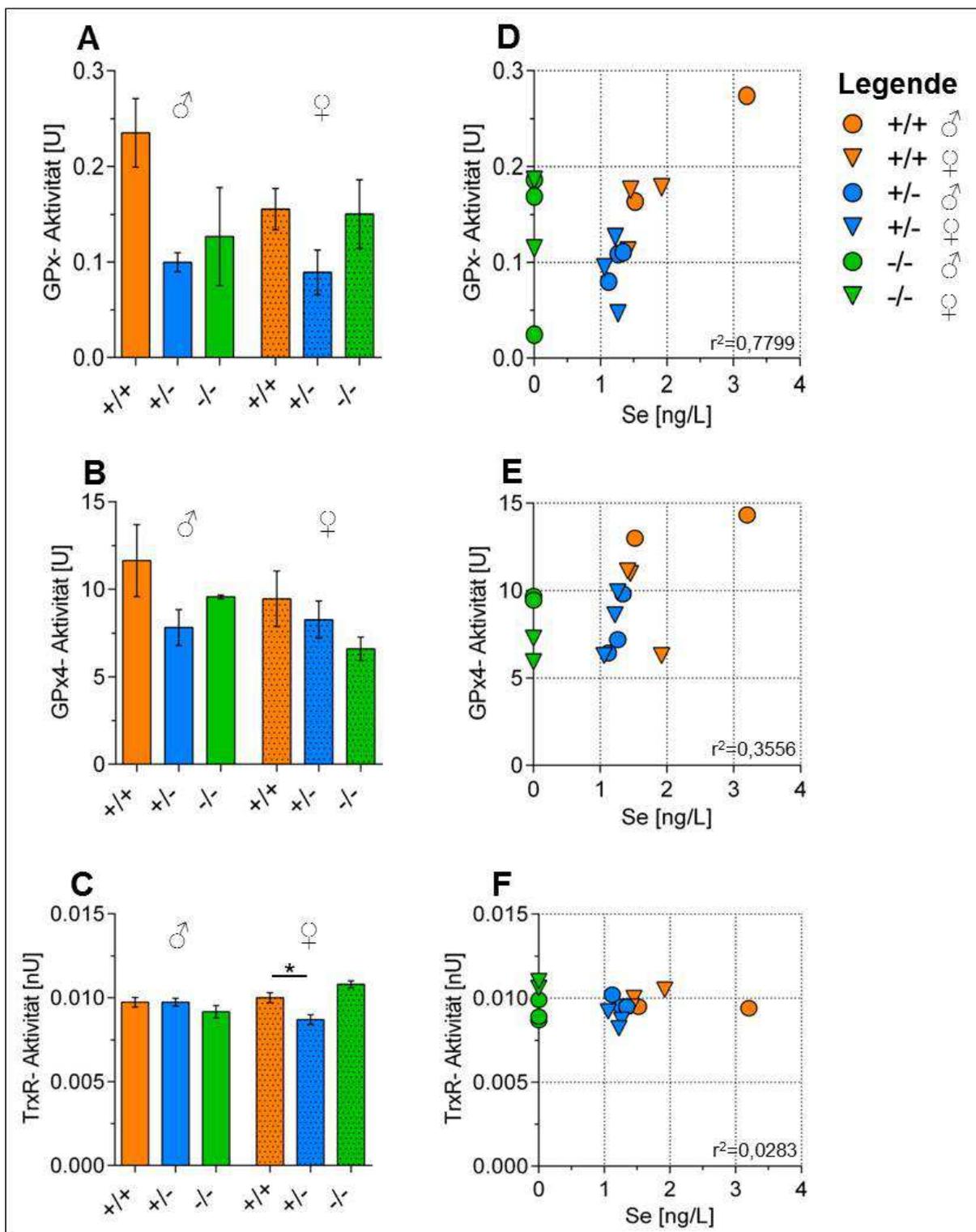


Abb. 4.7: Enzymaktivitäten von GPx, GPx4 und TrxR im Knochen der *Sepp*-Mäuse. (A-C) Die Analyse der enzymatischen Aktivität im Femur-Proteinlysate zeigt keine drastischen Unterschiede zwischen den *Sepp*-Maustiergruppen. (D-F) Eine Korrelationsanalyse der Enzymaktivität mit der im Picofox ermittelten Se-Konzentration der Femur-Proteinlysate ergibt nur für GPx eine positive Korrelation in *Sepp*-WT- und HET-Mäusen. Die Werte sind als MW \pm SEM (n=3, außer für *Sepp*^{-/-} Weibchen n=2) dargestellt. Die Daten wurden mit dem Spearman Korrelationskoeffizienten analysiert; U=mol/L*min* μ g Protein.

4.2.6 Der *Sepp*-Genotyp und die Expression wichtiger Gene des Selenoproteinmetabolismus

Entsprechend der zahlreichen Expression der Selenoproteine im Knochen werden auch zentrale Faktoren des Selenoproteinmetabolismus im Knochen exprimiert. Dabei wurde kein statistisch signifikanter geschlechtsspezifischer Expressionsunterschied zwischen WT-Tieren deutlich (Tab. 4.5.). Lediglich die mRNA der intrazellulären Se-bindenden Proteine *Sebp1* sowie *Fabp1* deutet auf eine erhöhte Expression in Weibchen hin. Die Expression der in der Tab. 4.5 aufgelisteten Gene konnte auch *in silico* bestätigt werden, wobei deren Expression vornehmlich in den OB präsent ist.

Tab. 4.5: Expression wichtiger Gene des Selenoproteinmetabolismus und *in silico* Analyse.

Gen	<i>Sepp</i> ^{+/+} ♀/♂ ¹	<i>in silico</i> Analyse ²		
		Knochen	Osteoblast	Osteoklast
<i>eIF4a3</i>	1,1	•		<
<i>Fabp1</i>	2,1	keine Angabe		-- ³
<i>Ncl</i>	1,1	•		<
<i>Pstk</i>	1,2	•		>
<i>Sbp2</i>	1,1	•		<
<i>Scly</i>	0,9	•		>
<i>Sebp1</i>	2,1	•		>
<i>Secp43</i>	1,3	•		<

¹ qRT-PCR mit cDNA männlicher und weiblicher *Sepp*^{+/+}- Mäuse.

MW der relativen Expressionswerte ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) von Femur und Tibia sind dargestellt. Expressionsmuster wurden auf *18S rRNA* normalisiert und mit der Referenzkondition *Sepp*^{+/+} ♂ (Ratio=1) verglichen. MW (n=6) wurden mittels t-Test (2-seitig) evaluiert.

² Die *in silico* Analyse wurde mit der BioGPS- Datenbank (biogps.org) durchgeführt. Die transkriptionelle Aktivität der Selenoproteingene wurde im murinen Knochen untersucht und zwischen OC und 21 Tage alten OB verglichen.

³ unter dem Detektionslimit.

Beim Vergleich der Expressionsunterschiede in allen *Sepp*-Genotypen wird deutlich, dass die Genexpression ausschließlich in männlichen *Sepp*^{-/-}-Mäusen erhöht ist (Tab. 4.6). Vor allem die Transkriptmenge der Se-bindenden Proteine *Sebp1* sowie *Fabp1* ist statistisch signifikant erhöht in Bezug auf die WT-Mäuse. Dieser Effekt ist geschlechtsspezifisch, er wird nicht in den Weibchen beobachtet.

Tab. 4.6: mRNA Expressionsmuster wichtiger Gene des Selenoproteinmetabolismus¹.

♂	<i>Sepp</i> ^{+/-}	<i>Sepp</i> ^{-/-}	♀	<i>Sepp</i> ^{+/-}	<i>Sepp</i> ^{-/-}
Gen			Gen		
<i>eIF4a3</i>	1,3	3,0	<i>eIF4a3</i>	1,7	0,8
<i>Fabp1</i>	0,7	3,1 ²	<i>Fabp1</i>	0,9	1,0
<i>Ncl</i>	1,1	2,8	<i>Ncl</i>	1,6	0,9
<i>Pstk</i>	0,8	1,0	<i>Pstk</i>	0,5	0,6
<i>Sbp2</i>	1,4	1,6	<i>Sbp2</i>	1,5	0,9
<i>Scly</i>	1,2	0,9	<i>Scly</i>	1,6	1,2
<i>Sebp1</i>	1,5	2,1 ²	<i>Sebp1</i>	1,0	0,6
<i>Secp43</i>	1,2	1,9	<i>Secp43</i>	2,1	0,8

¹ qRT-PCR mit cDNA aus Femur und Tibia von *Sepp*^{+/+}, *Sepp*^{+/-} und *Sepp*^{-/-}-Mäusen.

MW der relativen Expressionswerte ($2^{(-\text{ddCt})}$) von Femur und Tibia sind dargestellt.

Expressionsmuster wurden auf *18S rRNA* normalisiert und mit der Referenzkondition *Sepp*^{+/+} des jeweiligen Geschlechts.

MW (n=6) wurden mittels einfaktoriellem ANOVA und Dunnett-*Post Hoc*-Test evaluiert.

² Signifikanz: $p < 0,05$.

Das bis dato wenig analysierte Se-bindende Protein Sebp1 wurde im Folgenden auf Proteinebene untersucht (Abb. 4.8). Sebp1 konnte im Gehirn, Hoden und Knochen bei 52 kDa detektiert werden und in Form einer zusätzlichen, unbekanntem Bande bei 50 kDa (gemäß Herstellerangaben). Die stärkste Expression konnte jedoch in der Leber und Niere erfasst werden (Abb. 4.8 A). Daneben zeigte sich auch eine deutliche Expression des Proteins in allen *Sepp*-Genotypgruppen (Abb. 4.8 B). Im Vergleich zu den Ergebnissen der qRT-PCR, konnte eine erhöhte Bildung von Sebp1 in männlichen *Sepp*^{-/-}-Tieren mangels ausreichendem Probenmaterials nicht gezeigt werden.

In der immunhistologischen Untersuchung konnte Sebp1 in den proximalen Tubuli der Niere (Abb. 4.8 C), in den Hepatozyten (D), den runden Spermatozoen (E) sowie im Knochenmark peripher der Knochenbälkchen (F) lokalisiert werden. Die elongierenden Spermatozoen weisen im Gegensatz zu den runden Spermatozoen eine schwächere Färbung auf (Abb. 4.8 E). Auffällig ist, dass die Sebp1-Färbung in der Leber strahlenförmig verläuft, weg von den Gefäßen. Im Gegensatz dazu wurde *Sepp* direkt in der Peripherie der Blutbahnen detektiert (Abb. 4.5 E). Im Vergleich zu der *Sepp*-Färbung ist Sebp1 nur schwach im Knochen, vornehmlich in den Saumzellen detektierbar (Abb. 4.5 F).

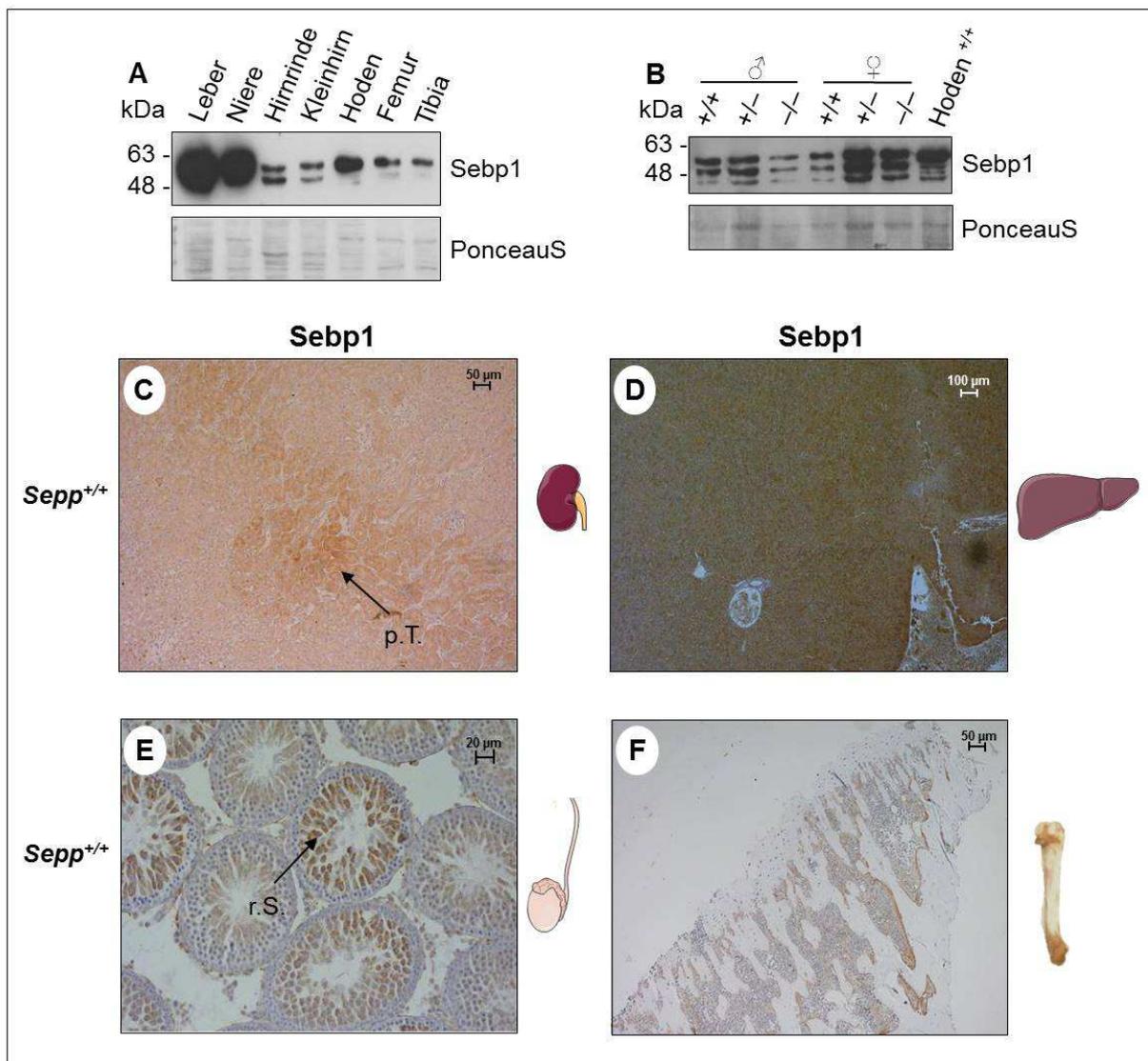


Abb. 4.8: Detektion des intrazellulären Se-bindenden Proteins Sebp1 in murinen Organen. (A) Sebp1 (52 kDa) wird im Western Blot in verschiedenen Organen unterschiedlich stark gebildet. (B) Alle *Sepp*-Genotypgruppen exprimieren Sebp1 im Femur; Hodenlysat diente als Positivkontrolle. (C-F) Immunhistochemische Lokalisierung von Sebp1 in den proximalen Tubuli (p.T.) der Niere (C), den Hepatozyten (D), den runden Spermatiden (r.S.) der Hoden (E) sowie den Saumzellen, entlang der Knochenbälkchen (F).

4.3 Erfolgt im Knochen eine Rezeptor-vermittelte Se-Aufnahme?

In den vorherigen Abschnitten konnte der Se-Transport via SePP gezeigt werden. Im weiteren Verlauf wurde analysiert, ob im Knochen ebenso ein entsprechender Sepp-Rezeptor exprimiert wird, wie z.B. Apoer2 im Hoden und Gehirn oder Megalin in der Niere. Zusätzlich dazu wurde die Expression von Lrp1, einem dritten Mitglied der Lrp-Familie, untersucht, der als weiterer Sepp-Rezeptor diskutiert wird. Es zeigte sich, dass von den bekannten zwei Sepp-Rezeptoren ausschließlich *Apoer2* im Knochen

exprimiert wird, neben *Lrp1* (Tab. 4.7). Ein geschlechtsspezifischer Expressionsunterschied konnte zwischen den WT-Tieren nicht beobachtet werden. Die qRT-PCR-Daten sind in Übereinstimmung mit den *in silico* Analysen, wobei die Expression von *Apoer2* und *Lrp1* vornehmlich in den OC beschrieben ist.

Tab. 4.7: Untersuchung der Expression der Sepp-Rezeptoren im Knochen.

Gen	Sepp ^{+/+} ♀/♂ ¹	<i>in silico</i> Analyse ²		
		Knochen	Osteoblast	Osteoklast
<i>Lrp1</i>	1,0	●	<	<
<i>Megalin</i>	-- ³	-- ³	-- ³	-- ³
<i>Apoer2</i>	1,4	●	<	<

¹ qRT-PCR mit cDNA männlicher und weiblicher Sepp^{+/+}- Mäuse.

MW der relativen Expressionswerte (2^{-ddCt}) von Femur und Tibia sind dargestellt. Expressionsmuster wurden auf *18S rRNA* normalisiert und mit der Referenzkondition Sepp^{+/+} ♂ (Ratio=1) verglichen. MW (n=6) wurden mittels t-Test (2-seitig) evaluiert.

² Die *in silico* Analyse wurde mit der BioGPS- Datenbank (biogps.org) durchgeführt. Die transkriptionelle Aktivität der Selenoproteingene wurde im murinen Knochen untersucht und zwischen OC und 21 Tage alten OB verglichen.

³ unter dem Detektionslimit.

4.3.1 Untersuchung der Expression aller Sepp-Rezeptoren im Knochen

Die Analyse der Expression aller Sepp-Rezeptoren ergab lediglich signifikante Effekte dieser regulatorischen Faktoren in männlichen Knochen (Tab. 4.8). Während die *Apoer2*-Expression in den Sepp^{+/-}-Tieren leicht erhöht war, zeigten die Sepp^{-/-}-Mäuse eine stark erhöhte Expression. Ein ähnliches Muster konnte für *Lrp1* beobachtet werden.

Tab. 4.8: Analyse der Expression der Sepp-Rezeptoren in allen Sepp-Genotypen¹.

♂ Gen	Sepp ^{+/-}		♀ Gen	Sepp ^{+/-}	
	Sepp ^{+/-}	Sepp ^{-/-}		Sepp ^{+/-}	Sepp ^{-/-}
<i>Lrp1</i>	1,4	8,9 ⁴	<i>Lrp1</i>	1,6	1,8
<i>Megalin</i>	-- ²	-- ²	<i>Megalin</i>	-- ²	-- ²
<i>Apoer2</i>	1,6 ³	11,1 ⁴	<i>Apoer2</i>	1,3	0,9

¹ qRT-PCR mit cDNA aus Femur und Tibia von Sepp^{+/+}, ^{+/+}- und ^{-/-}- Mäusen.

MW der relativen Expressionswerte (2^{-ddCt}) von Femur und Tibia sind dargestellt. Expressionsmuster wurden auf *18S rRNA* normalisiert und mit der Referenzkondition Sepp^{+/+} des jeweiligen Geschlechts.

MW (n=6) wurden mittels einfaktoriellem ANOVA und Dunnett-Post Hoc-Test evaluiert.

² unter dem Detektionslimit.

³ Signifikanz: p<0,05, ⁴ p<0,01.

Die Bildung der Sepp-Rezeptoren wurde daraufhin im Western Blot untersucht (Abb. 4.9). *Apoer2* wird im Gehirn sowie im Hoden exprimiert (Positivkontrollen), jedoch nicht in Leber und Niere (Negativkontrollen) (Abb. 4.9 A).

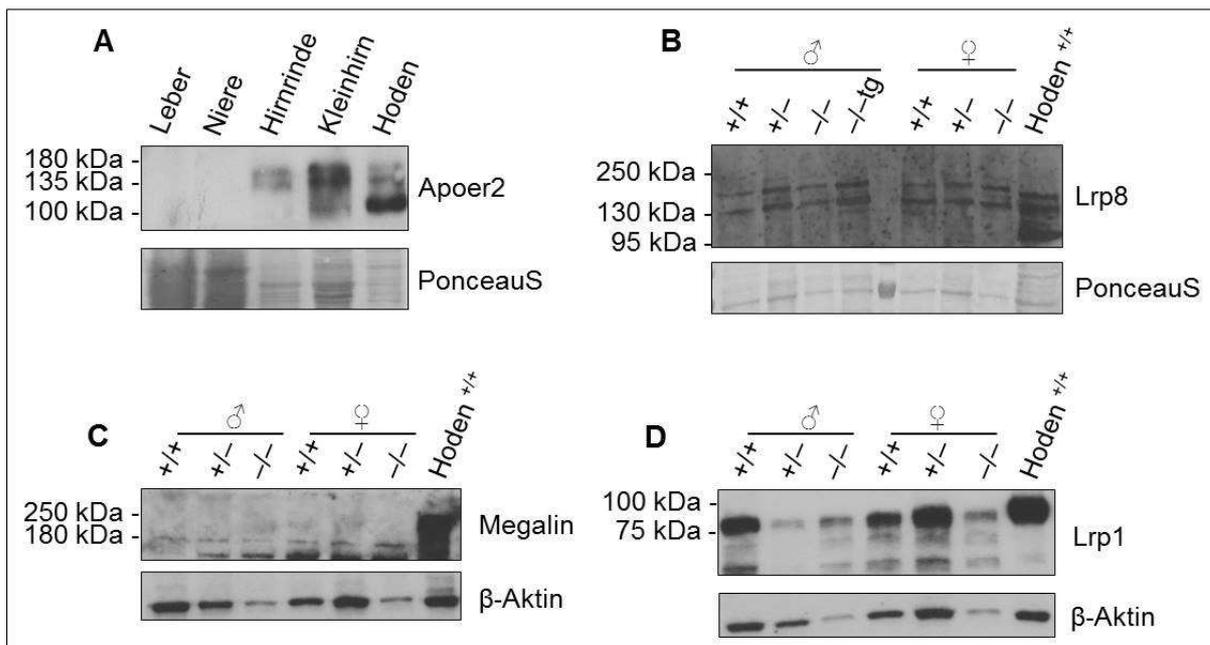


Abb. 4.9: Untersuchung der Expression der Sepp-Rezeptoren im Knochen. (A) Der Sepp-Rezeptor Apoer2 konnte im Gehirn und Hoden bei 106, 130 und 180 kDa detektiert werden. **(B)** Im Femur konnte die Bildung des Rezeptors in seiner glykolysierten Form bei 130 und 180 kDa in allen *Sepp*-Genotypen bestätigt werden. Der Hoden diente als Positivkontrolle. **(C)** Der Sepp-Rezeptor Megalin (522 kDa) wird nicht im Knochen gebildet. **(D)** Der debattierte dritte Sepp-Rezeptor Lrp1 zeigt eine Bande bei 85 kDa sowohl im Hoden als auch allen *Sepp*-Genotypen. Apoer2-Antikörper-kommerziell erhältlich, Lrp8-Antikörper- freundliche Bereitstellung durch Prof. Herz.

Das Transportprotein kommt als 106 kDa großes Protein vor, sowie in zwei glykolysierten Isoformen bei 130 und 180 kDa. Apoer2 ist in allen *Sepp*-Genotypen mit zwei Isoformen präsent (Abb. 4.9 B). Wie die qRT-PCR vermuten ließ, wird der Sepp-Rezeptor Megalin (522 kDa) nicht im Knochen gebildet (Abb. 4.9 C). Der potentiell dritte Sepp-Rezeptor Lrp1 wandert im Knochen per Western Blot etwas schneller als im Hoden, aber die Expressionslevel sind in beiden Organen bei 85 kDa vergleichbar (Abb. 4.9 D).

4.3.2 *in vitro*-Analyse der SePP-Apoer2-Interaktion

Die Betrachtung der *in silico* Analyse von *Sepp* und *Sebp1* im Knochen deutet an, dass diese Gene vornehmlich in den OB exprimiert werden (Tab. 4.2 und 4.5), während der Sepp-Rezeptor Apoer2 eher in den OC gebildet wird. Um dies genauer zu untersuchen, wurde deren Expression in zwei Knochen-ähnlichen Zellen *in vitro* erforscht. *Sepp* und *Sebp1* werden sowohl in den OC-ähnlichen Raw264.7- und OB-ähnlichen MC3T3-Zellen gebildet (Tab. 4.9). Apoer2 wurde sehr spät in den MC3T3-

Zellen detektiert und die Se-Supplementation resultierte in keiner erhöhten Expression, sodass von Hintergrundsignalen ausgegangen werden kann. Das Signal für *Sebp1* wurde in der qRT-PCR in Raw-Zellen früher detektiert als *Sepp*, welches früher in den MC3T3-Zellen nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt). Die Supplementation mit Na_2SeO_3 führte in beiden Zelllinien zu einer (statistisch) signifikant erhöhten Genexpression (Ausnahme *Apoer2* in MC3T3-Zellen).

Tab. 4.9: Expressionsmuster in Knochen-ähnlichen Zellen¹.

MC3T3-Zellen		Raw264.7-Zellen	
Gen	Na_2SeO_3	Gen	Na_2SeO_3
<i>Sepp</i>	2,6 ³	<i>Sepp</i>	5,0 ²
<i>Sebp1</i>	2,2 ⁴	<i>Sebp1</i>	3,0
<i>Apoer2</i>	1,4	<i>Apoer2</i>	3,1 ²

¹ qRT-PCR mit cDNA aus MC3T3- und Raw264.7-Zellen mit und ohne Na_2SeO_3 -Behandlung. Expressionsmuster wurden auf *18S rRNA* normalisiert und mit der Kontrollkondition (ohne Na_2SeO_3) im t-Test verglichen (MW, n=6).

² Signifikanz: ³ p<0,05, ⁴ p<0,001.

Auf Proteinebene konnte die *Sepp*-Expression in beiden Zelllinien bei 45 und 47 kDa detektiert werden (Abb. 4.10 A). Eine erhöhte Expression von *Sepp* ist erkennbar in den mit Na_2SeO_3 -supplementierten Zellen.

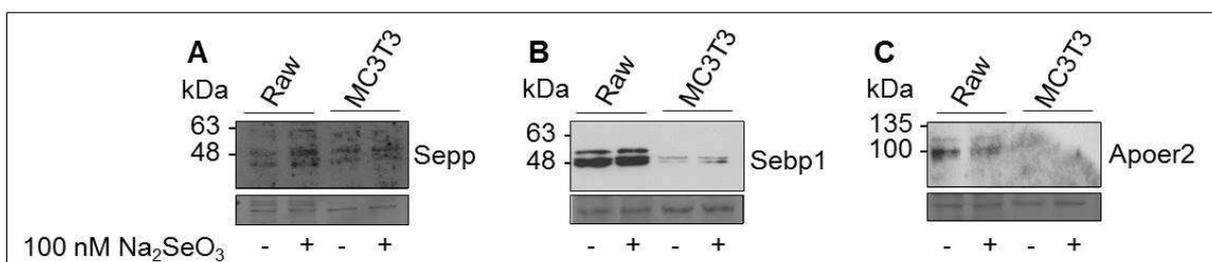


Abb. 4.10: *In vitro* Expression von *Sepp*, *Sebp1* und *Apoer2*. Die Knochen-ähnlichen Zelllinien Raw264.7 und MC3T3 hungerten 24 h mit bzw. ohne Na_2SeO_3 -Supplementation und die Proteinlysate (10 μg) wurden im Western Blot untersucht **(A)** *Sepp* wird in den OC-ähnlichen Raw-Zellen und den OB-ähnlichen MC3T3-Zellen bei rund 45 und 47 kDa exprimiert. In den Na_2SeO_3 -supplementierten Raw-Zellen scheint die Expression erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. **(B)** *Sebp1* ist deutlich bei 50 und 52 kDa in den Raw-Zellen detektierbar, während die Doppelbande nur sehr schwach in den MC3T3-Zellen ausgebildet ist. **(C)** Der *Sepp*-Rezeptor *Apoer2* wird bei 106 kDa ausschließlich in den Raw-Zellen gebildet.

Sebp1 ist nur in den Raw-Zellen bei 52 kDa deutlich erkennbar (zusätzlich zu der unbekanntem Bande bei 50 kDa), während eine Expression in MC3T3-Zellen nur sehr schwach ausgeprägt ist (Abb. 4.10 B). Ein ähnliches Muster ist für *Apoer2* erkennbar (Abb. 4.10 C). Während eine Bildung des Proteins nur in den Raw-Zellen bei 106

kDa detektierbar ist, zeigt sich keine Bande in den MC3T3-Zellen. Eine Na_2SeO_3 -Behandlung präsentierte keine deutlich erhöhte Expression für Sebp1 oder Apoer2 in den Raw-Zellen.

Die Expression von Sepp und Apoer2 konnte auf mRNA- und Proteinebene bestätigt werden, wobei *Apoer2* ausschließlich in den Raw-Zellen aktiv zu sein scheint. Im Folgenden sollte die Komplexbildung von Sepp und seinem Rezeptor in den Raw-Zellen mittels eines *in vitro* Assay zum SePP-Uptake analysiert werden. Im Vorexperiment wurde untersucht, ob dieser Test prinzipiell *in vitro* möglich sei. Die beiden Knochen-ähnlichen murinen Zelllinien MC3T3 und Raw sowie die humanen Zelllinien HepG2 (exprimiert keine bekannten SePP-Rezeptoren) und Hela (exprimiert ApoER2 und Megalin) wurden bezüglich ihrer spezifischen Bindung eines Lumi-markiertem SePP analysiert (Abb. 4.11 A).

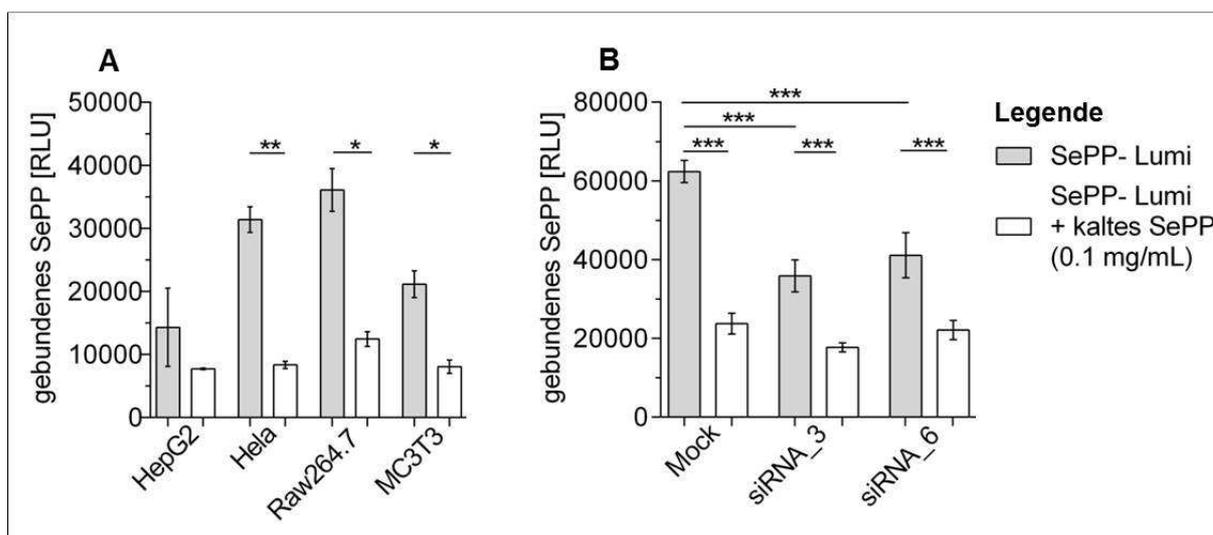


Abb. 4.11: *In vitro* Assay zur spezifischen SePP-Apoer2 Interaktion. Im Vorversuch wurden die murinen MC3T3- und Raw-Zellen sowie die humanen Zellen HepG2 (ohne bekannte Expression der SePP-Rezeptoren) und Hela (bekannte Expression der SePP-Rezeptoren) für 24 h gefastet, inkubierten dann für 3 h mit markiertem SePP bzw. markiertem SePP mit einem hohen molaren Überschuss unmarkiertem (kaltem) SePP. Gebundenes, markiertes SePP wurde anschließend im Luminometer analysiert. **(A)** Hela- und Raw-Zellen zeigen ein deutliches Signal an spezifisch gebundenem SePP, während dieses Signal in MC3T3- und HepG2-Zellen deutlich geringer ausfällt. **(B)** Der *knockdown* von *Apoer2* mit zwei verschiedenen *siRNA*-Oligonukleotiden führt zu einer statistisch signifikant reduzierten SePP-Bindung in den Raw-Zellen im Vergleich zur Mock-Kontrolle. Darstellung der Werte (n=4-8) als MW±SD. Die statistische Evaluierung wurde mittels einfaktoriellem ANOVA und dem Bonferroni *Post-Hoc*-Test durchgeführt; (p<0,05 (*), p<0,01 (**)) bzw. p<0,001 (***)).

Dabei zeigt sich in der Abb. 4.11 (A) ein starkes Signal an spezifisch gebundenem SePP in den Hela- und Raw-Zellen und ein signifikanter Anstieg im Vergleich zu der

Kontrolle mit unmarkiertem (kaltem) SePP, welches das markierte SePP im Ansatz verdrängt hat. MC3T3-Zellen weisen ein deutlich niedrigeres Signal an gebundenem SePP auf als die Raw-Zellen. Da die Raw-Zellen ein deutlicheres Signal an markiertem SePP zeigten, wurde *Apoer2* im nächsten Schritt in diesen Zellen runterreguliert. Es wurden die zwei *siRNA*-Oligonukleotide gewählt, die im Vorversuch das Gen am stärksten runterreguliert haben. Der anschließende Assay ließ erkennen, dass die SePP-Bindung im Vergleich zur schein-transfizierten Mock-Kontrolle in den *siRNA*-behandelten Raw-Zellen drastisch reduziert ist. Dies lässt eine Bindung von SePP an seinen Rezeptor Apoer2 in den Raw-Zellen vermuten (Abb. 4.11 B). Daneben ist das SePP-Signal ebenso in dem mit kaltem SePP-behandelten Ansatz vermindert im Vergleich zur nicht unterdrückten Reaktion.

4.4 Analyse der Mineralisierung im Knochen der *Sepp*-Mäuse

Über die morphohistologischen Eigenschaften der *Sepp*-Mäuse P35-40 ist bis dato wenig bekannt. Im Vorversuch wurde der Mineralisierungsgrad im Femur bezüglich Zusammensetzung und der unterschiedlichen *Sepp*-Genotypen analysiert. Dies geschah in Kooperation mit der Arbeitsgruppe "*Molecular Endocrinology*" von Prof. Graham Williams am Imperial College in London, England. Da die Untersuchung zum Zeitpunkt des Zusammenschreibens noch nicht abgeschlossen war, werden hier nur die Ergebnisse präsentiert, die während eines wissenschaftlichen Aufenthaltes meinerseits in der Arbeitsgruppe durchgeführt und ausgewertet wurden. Es konnte in diesen Pilotmessungen teilweise nur ein Tier pro Gruppe analysiert werden, sodass die hier dargestellten Daten nur als eine Tendenz angesehen werden können.

Die Auswertung der Faxitron-Studien zeigt geschlechtsspezifische Unterschiede. Für die relativen und kumulativen Histogramme wird ein erhöhter Mineralisierungsgrad in weiblichen *Sepp*^{+/-}- und *Sepp*^{+/-}-Tieren ersichtlich im Vergleich zu den männlichen Mäusen (Abb. 4.12 A-F).

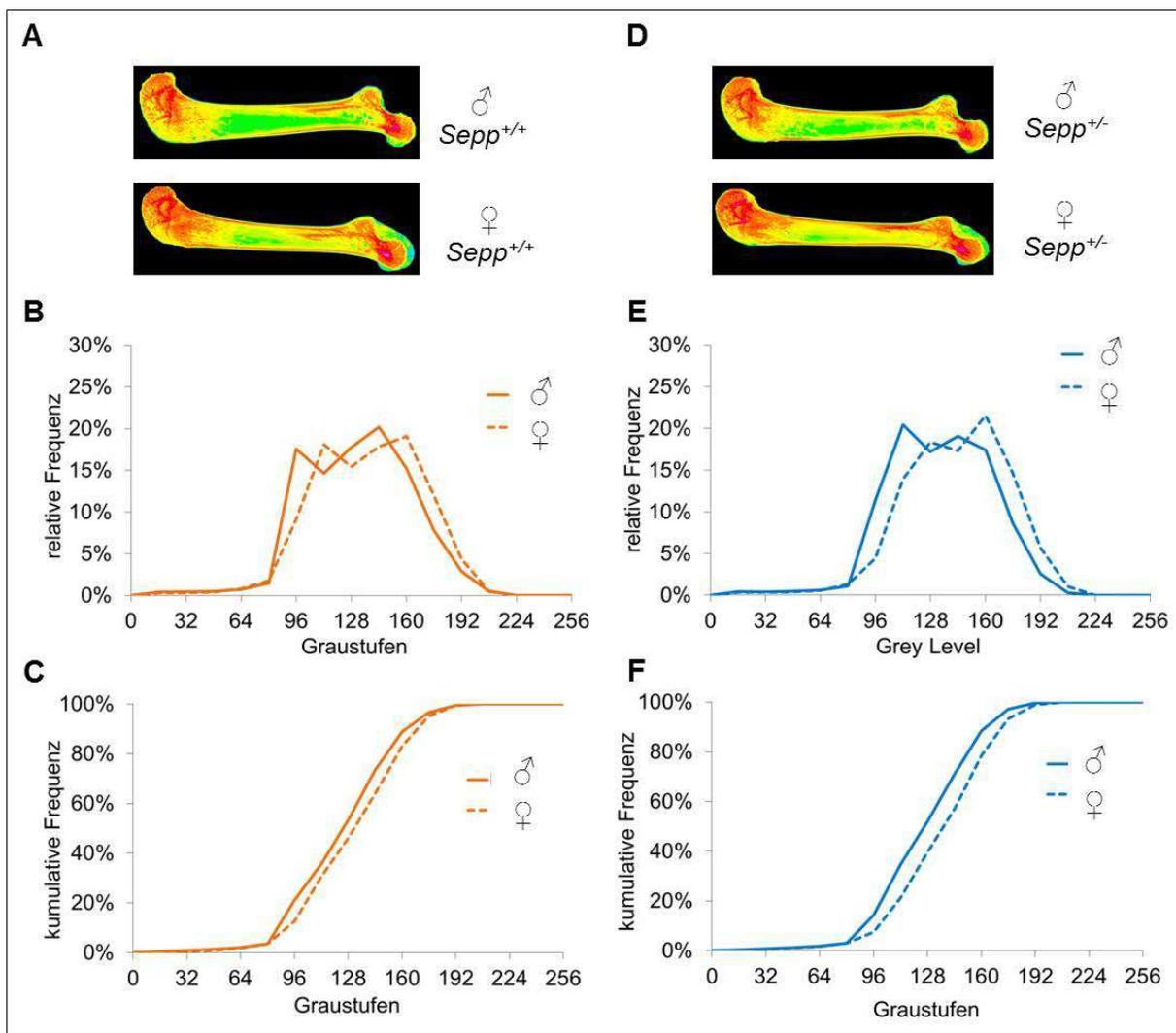


Abb. 4.12: Geschlechterstudie zur Mineralisierung in *Sepp*^{+/-}- und *Sepp*^{+/-}-Mäusen. (A, D) Femur von männlichen und weiblichen Tieren wurden mit dem Faxitron untersucht. Die Graustufen-Bilder wurden mit der 16-Farbstufenpalette pseudogefärbt. Schwarz steht für eine niedrige und weiß für eine hohe Mineralisierungsdichte. Das relative (B) und kumulative (C) Verteilungs-Histogramm zeigt in weiblichen WT-Tieren eine erhöhte Knochenmineraldichte. *Sepp* WT-Tiere ♂ (n=1) versus ♀ (n=4). (E-F) In den *Sepp*-HET-Mäusen (n=1) weisen die weiblichen Tiere ebenso einen erhöhten Mineralisierungsgrad im Vergleich zu den Männchen auf.

Die Analyse eines Genotypen-spezifischen, anormalen Mineralisierungsgrades in *Sepp*^{+/-}- und *Sepp*^{+/-}-Mäusen ergibt einen erhöhten Mineralisierungsgrad in weiblichen als auch männlichen *Sepp*-HET-Tieren gegenüber den WT-Tieren (Abb. 4.13 A-F).

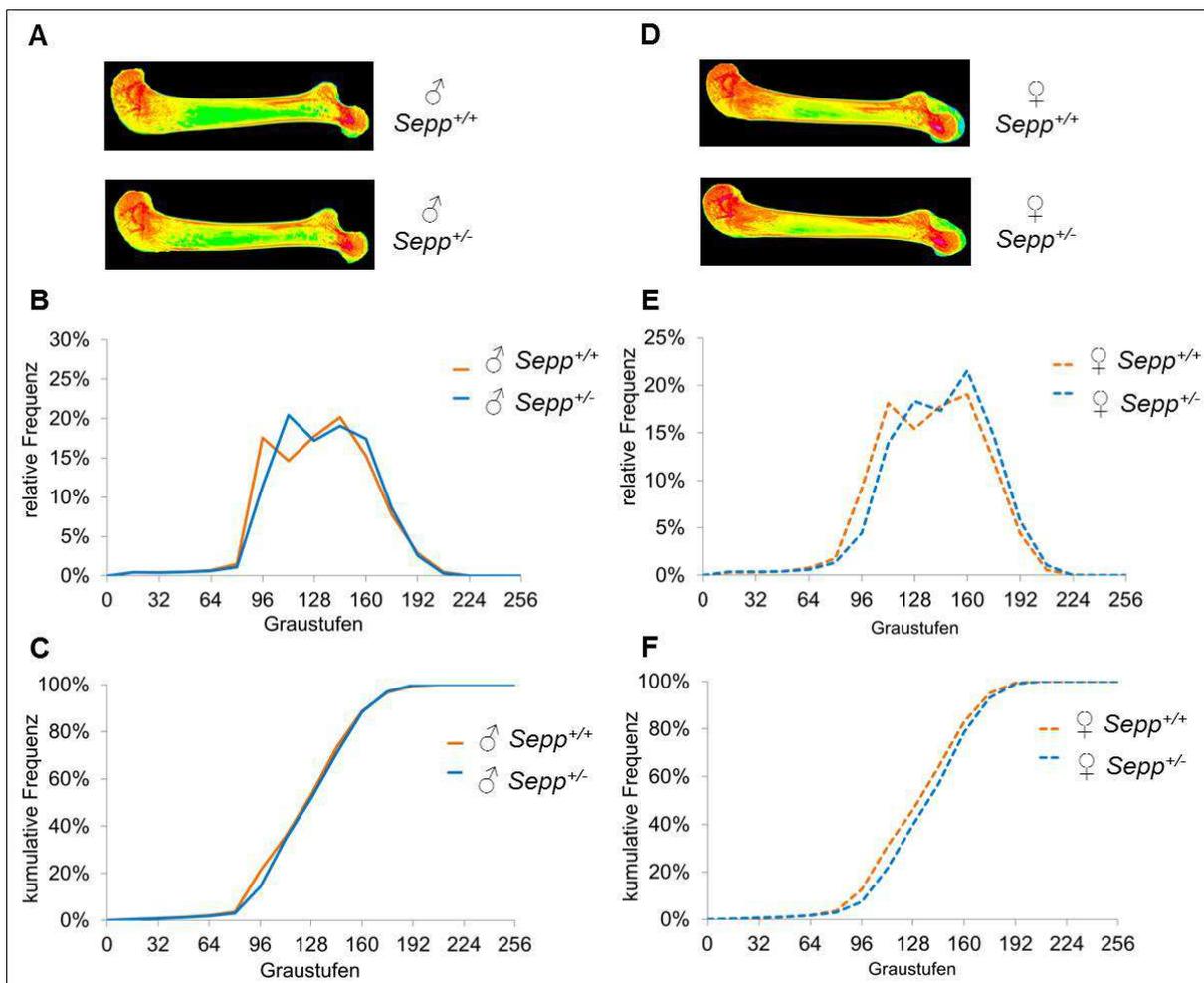


Abb. 4.13: Genotypenstudie zur Mineralisierung in *Sepp*^{+/+}- und *Sepp*^{+/-}-Mäusen. (A, D) Femur Präparate von männlichen und weiblichen Tieren wurden mit dem Faxitron untersucht. Die Graustufen-Bilder wurden mit der 16-Farbstufenpalette pseudogefärbt. Schwarz steht für eine niedrige und weiß für eine hohe Mineralisierungsdichte. Das relative (B) und kumulative (C) Frequenz-Histogramm zeigt in den männlichen *Sepp*-HET-Tieren eine erhöhte Mineralisierung im Vergleich zu den WT-Mäusen. WT versus HET (n=1). (E-F) In den weiblichen *Sepp*-HET-Mäusen ist ebenso eine verstärkte Mineralisierung vorzufinden als in den WT-Tieren. WT (n=4) versus HET (n=1).

4.5 Zusammenhang von Spurenelementen mit Parametern des Knochenstoffwechsels

Ein Einfluss der Spurenelemente Zn und Cu auf die Knochenhomöostase gesunder postmenopausaler Frauen wurde untersucht. Die Bedeutung von Se wurde in die Analyse mit einbezogen, da für diese Auswertung der Datensatz von nur 732 Frauen herangezogen wurde, also eine Subkohorte der zuvor ausgewerteten 1278 Probanden der OPUS-Studie (Hoeg *et al.* 2012). Die Se-, Cu- und Zn-

Konzentrationen der Teilnehmerinnen wurden in Quintile eingeteilt und die Entwicklungen verschiedener Knochenparameter von der niedrigsten zur höchsten Quintile analysiert.

In der Tab. 4.10 wird deutlich, dass sich auch die Cu- und SePP-Konzentrationen mit zunehmender Se-Konzentration statistisch signifikant erhöhen (höchste Quintile), während die Zn-Konzentrationen hierbei nahezu unverändert bleiben. Freies T3 sinkt dagegen mit zunehmender Se-Konzentration ebenso wie der Knochenformationsmarker PINP und der –Resorptionsmarker uNTx. Die BMD zeigt sich unbeeinflusst durch einen erhöhten Se-Gehalt.

Tab. 4.10: Der Se-Status in Bezug auf Parameter der Knochengesundheit in der OPUS-Kohorte.

Parameter	Se		p-Wert
	niedrigste Quintile ¹	höchste Quintile ¹	
Se (µg/L)	68,8 ± 0,9	131,1 ± 1,6	***
Cu (µg/L)	1325 ± 26	1676 ± 27	***
Zn (µg/L)	1252 ± 39	1243 ± 29	/
SePP (mg/L)	2,95 ± 0,06	3,56 ± 0,06	***
TSH (mU/L)	0,98 ± 0,06	1,10 ± 0,09	/
fT4 (pmol/L)	12,95 ± 0,20	12,71 ± 0,15	/
fT3 (pmol/L)	3,89 ± 0,07	3,61 ± 0,07	**
Osteocalcin (ng/mL)	25,71 ± 0,86	23,94 ± 0,84	/
PINP ² (ng/mL)	54,89 ± 1,56	50,38 ± 1,62	**
sβCTx ³ (ng/mL)	0,26 ± 0,01	0,22 ± 0,01	/
uNTx ⁴ (nM/mM)	58,3 ± 26,9	49,4 ± 23,9	**
LS BMD ⁵ (mg/cm ²)	1013 ± 177	1033 ± 170	/
Hüfte BMD (mg/cm ²)	860 ± 169	885 ± 132	/
FN BMD ⁶ (mg/cm ²)	753 ± 149	766 ± 137	/
BMI (kg/m ²)	25,9 ± 0,4	26,2 ± 0,3	/
Alter (Jahre)	66,3 (55,2-80,5) ⁷	65,4 (55,3-80,4) ⁷	/

¹n=111-144; MW ± SEM, Mann-Whitney-U-Test, p<0,05 (*), p<0,01 (**), p<0,001 (***).

²Prokollagen Typ I N-terminales Propeptid, ³Typ I Kollagen C-terminales Telopeptid

⁴Verhältnis Urin Kollagen I N-terminales Telopeptid (uNTX):Kreatin, ⁵Lendenwirbelsäule

⁶Oberschenkelhals

⁷Median (niedrigster-höchster Wert)

Bei einem erhöhten Cu-Status ist auch die Se-Konzentration im humanem Serum des OPUS-Kollektivs erhöht (Tab. 4.11). Der Zn-Status zeigt sich auch unbeeinflusst von dem Cu-Level. Mit zunehmender Cu-Konzentration sinkt die des fT3, PINP und der Knochenresorptionsmarker sβCTx sowie uNTx. Die BMD-Werte unterscheiden sich nicht zwischen den Quintilen mit unterschiedlichem Cu-Level.

Tab. 4.11: Der Cu-Status in Bezug auf Parameter der Knochengesundheit in der OPUS-Kohorte.

Parameter	Cu		
	niedrigste Quintile ¹	höchste Quintile ¹	p-Wert
Se (µg/L)	86,8 ± 2,0	107,1 ± 2,1	***
Cu (µg/L)	1089 ± 13	2029 ± 25	***
Zn (µg/L)	1228 ± 36	1237 ± 30	/
SePP (mg/L)	3,20 ± 0,05	3,24 ± 0,06	/
TSH (mU/L)	1,02 ± 0,07	1,02 ± 0,07	/
fT4 (pmol/L)	12,75 ± 0,15	13,06 ± 0,16	/
fT3 (pmol/L)	3,84 ± 0,06	3,64 ± 0,07	*
Osteocalcin (ng/mL)	25,56 ± 0,88	21,28 ± 0,76	***
PINP ² (ng/mL)	54,14 ± 1,74	44,95 ± 1,65	***
sβCTx ³ (ng/mL)	0,25 ± 0,01	0,19 ± 0,01	***
uNTx ⁴ (nM/mM)	56,0 ± 26,7	45,2 ± 23,4	***
LS BMD ⁵ (mg/cm ²)	1025 ± 174	1061 ± 178	/
Hüfte BMD (mg/cm ²)	882 ± 139	880 ± 149	/
FN BMD ⁵ (mg/cm ²)	758 ± 127	773 ± 155	/
BMI (kg/m ²)	25,8 ± 0,3	26,2 ± 0,4	/
Alter (Jahre)	65,2 (55,3-80,6) ⁷	65,8 (55,2-81,2) ⁷	/

¹n=113-147; MW ± SEM, Mann-Whitney-U-Test, p<0,05 (*), p<0,01 (**), p<0,001 (***).

²Prokollagen Typ I N-terminales Propeptid, ³Typ I Kollagen C-terminales Telopeptid

⁴Verhältnis Urin Kollagen I N-terminales Telopeptid (uNTX):Kreatin, ⁵Lendenwirbelsäule

⁶Oberschenkelhals

⁷Median (niedrigster-höchster Wert)

Tab. 4.12: Der Zn-Status in Bezug auf Parameter der Knochengesundheit in der OPUS-Kohorte.

Parameter	Zn		
	niedrigste Quintile ¹	höchste Quintile ¹	p-Wert
Se (µg/L)	94,2 ± 2,0	97,7 ± 2,1	/
Cu (µg/L)	1439 ± 31	1519 ± 32	/
Zn (µg/L)	1082 ± 22	1456 ± 47	***
SePP (mg/L)	3,26 ± 0,07	3,21 ± 0,07	/
TSH (mU/L)	0,99 ± 0,05	1,02 ± 0,06	/
fT4 (pmol/L)	12,50 ± 0,15	12,87 ± 0,16	/
fT3 (pmol/L)	3,68 ± 0,07	3,78 ± 0,06	/
Osteocalcin (ng/mL)	24,35 ± 0,92	24,35 ± 0,86	/
PINP ² (ng/mL)	50,78 ± 1,66	50,20 ± 1,67	/
sβCTx ³ (ng/mL)	0,22 ± 0,01	0,23 ± 0,01	/
uNTx ⁴ (nM/mM)	54,0 ± 28,0	49,2 ± 20,5	/
LS BMD ⁵ (mg/cm ²)	1031 ± 158	1030 ± 183	/
Hüfte BMD (mg/cm ²)	877 ± 138	872 ± 140	/
FN BMD ⁵ (mg/cm ²)	767 ± 133	763 ± 140	/
BMI (kg/m ²)	26,0 ± 0,4	26,0 ± 0,4	/
Alter (Jahre)	63,9 (55,4-80,6) ⁷	64,4 (55,2-80,4) ⁷	/

¹n=139-147; MW ± SEM, Mann-Whitney-U-Test, p<0,05 (*), p<0,01 (**), p<0,001 (***).

²Prokollagen Typ I N-terminales Propeptid, ³Typ I Kollagen C-terminales Telopeptid

⁴Verhältnis Urin Kollagen I N-terminales Telopeptid (uNTX):Kreatin, ⁵Lendenwirbelsäule

⁶Oberschenkelhals

⁷Median (niedrigster-höchster Wert)

Innerhalb der Zn-Quintile gibt es keine Unterschiede in den Se-, Cu- und Schilddrüsenhormon-Konzentrationen noch in Bezug auf die BMD sowie die Knochenformations- und -Resorptionsmarker (Tab. 4.12).

Die Abhängigkeit der Se-, Cu- und Zn-Level sind für die Parameter fT3, PINP und SePP in der Abb. 4.14 dargestellt.

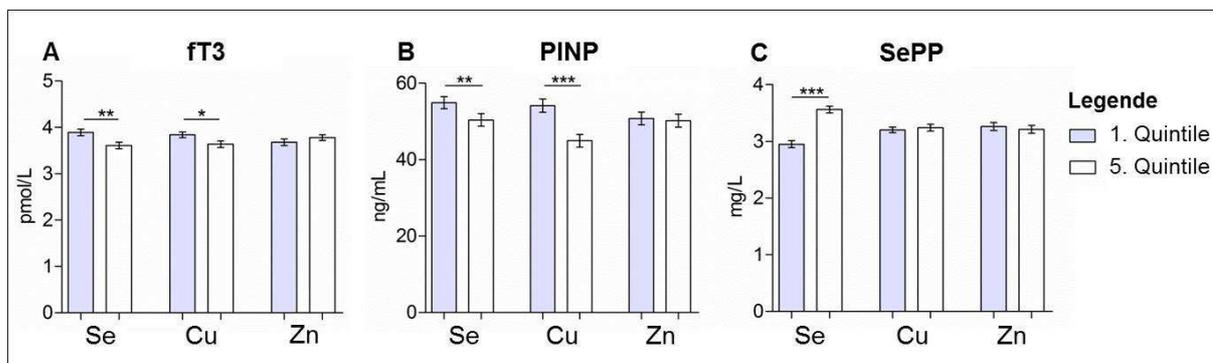


Abb. 4.14: Konzentrationen von fT3-, PINP- und SePP- im humanem Serum. Mit steigendem Se- (A) und Cu-Status (B) sinkt der Anteil an fT3 und PINP. (C) Die Konzentration des Se-Transportproteins SePP erhöht sich simultan mit dem Se-Gehalt. Die Zn-Level zeigen keinen Einfluss auf fT3, PINP sowie SePP. fT3- freies T3, PINP- Prokollagen Typ I N-terminales Propeptid, SePP- Selenoprotein P. Werte sind als MW \pm SD (n=669-732) dargestellt. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt; p<0,05 (*), p<0,01 (**), p<0,001 (***).

Die Ergebnisse einer Korrelationsanalyse der Se-, Cu- und Zn-Konzentrationen in Bezug auf Parameter der Knochenhomöostase sind in der Tab. 4.13 dargestellt. Während Se mit nahezu allen Parametern korreliert, steht Cu vornehmlich mit den Markern der Knochenformation und -Resorption sowie fT3 in Zusammenhang (Tab. 4.13). Zn korreliert einzig mit dem FN BMD. Eine lineare positive Korrelation ist einzig zwischen Se mit Cu und Se mit SePP vorhanden, während die meisten Schilddrüsenhormon- und Knochenparameter in einer negativen Abhängigkeit mit den Spurenelementen stehen.

Tab. 4.13. Korrelationen zwischen Spurenelementen und Parametern der Knochengesundheit in der OPUS-Kohorte.

Parameter	Se ¹	p-Wert	Cu ¹	p-Wert	Zn ¹	p-Wert
Se	1		0,400	**	0,260	**
Cu	0,400	**	1		0,252	**
Zn	0,260	**	0,252	**	1	
SePP	0,312	**	0,009	/	0,058	/
TSH	0,078	*	0,032	/	0,062	/
fT3	-0,167	**	-0,089	*	-0,029	/
fT4	-0,127	**	0,033	/	-0,023	/
Osteocalcin	-0,113	**	-0,175	**	-0,027	/
PINP²	-0,090	*	-0,170	**	-0,019	/
sβCTx³	-0,088	*	-0,129	**	0,018	/
uNTx⁴	-0,127	**	-0,149	**	-0,030	/
LS BMD⁵	0,106	**	0,062	/	0,060	/
Hüfte BMD	0,114	**	0,008	/	0,049	/
FN BMD⁶	0,095	*	0,061	/	0,104	**
Alter	-0,063	/	0,031	/	0,010	/
BMI	0,069	/	0,038	/	0,039	/

¹n=669-732; Korrelation nach Pearson. p<0,05 (*), p<0,01 (**), p<0,001 (***)

²Prokollagen Typ I N-terminales Propeptid, ³Typ I Kollagen C-terminales Telopeptid

⁴Verhältnis Urin Kollagen I N-terminales Telopeptid (uNTX):Kreatin, ⁵Lendenwirbelsäule

⁶Oberschenkelhals

Abschließend wurde der Einfluss der Spurenelementkonzentrationen auf das Frakturrisiko in der OPUS-Auswahlkohorte untersucht, welches in verschiedenen Modellen für bekannte Parameter dieses Wertes (Alter, BMI, TSH, fT3, *follow-up*) korrigiert wurde (Tab. 4.14-16, Abb. 4.15).

Tab. 4.14: Beziehung zwischen Se-Status und Frakturrisiko.

Frakturrisiko	Se ¹			
	Niedrig	CI	Hoch	CI
Modell				
-	1,037	0,464-2,314	0,789	0,337-1,846
+ <i>follow-up</i>	1,066	0,477-2,380	0,773	0,330-1,809
+ Alter + <i>follow-up</i>	1,005	0,450-2,247	0,751	0,321-1,758
+ BMI + <i>follow-up</i>	1,060	0,475-2,370	0,769	0,328-1,801
+ TSH + fT3 + <i>follow-up</i>	1,062	0,475-2,372	0,784	0,334-1,841
+ Alter + BMI + <i>follow-up</i>	0,999	0,447-2,234	0,744	0,318-1,744
+ Alter + BMI + TSH + fT3 + <i>follow-up</i>	1,000	0,447-2,236	0,744	0,316-1,749

CI- Clearance Index/ Konfidenzintervall

¹Risikoberechnung 3. Se-Quintile im Vergleich zur 1. (niedrig) und 5. (hoch) Se-Quintile.

Bei hohen Se-Leveln (5. Quintil) sinkt das Frakturrisiko im Vergleich zum 1. Se-Quintil, jedoch nicht statistisch signifikant (Tab. 4.14, Abb. 4.15). In den

unterschiedlich korrigierten Modellen (die Zeit, nach der die Anzahl der Frakturen ermittelt wurde (*follow-up*), das Alter, der BMI, TSH und fT3) zeigt sich ebenso eine inverse Verbindung zwischen Se-Status und Frakturrisiko. Diese Parameter haben damit auch einen entscheidenden Einfluss auf das Risiko eines Knochenbruches.

Für Cu präsentiert sich ein anderes Bild (Tab. 4.15). Erniedrigte (1.Quintile) sowie erhöhte (5.Quintile) Cu-Level führen zu einem zweifach erhöhten Frakturrisiko im Vergleich zu den mittleren Cu-Leveln in der 3.Quintile in gesunden, postmenopausalen Frauen (Tab. 4.15, Abb. 4.15). Die Korrektur für die verschiedenen Parameter in den unterschiedlichen Modellen resultierte in einem leicht erhöhten Frakturrisiko im Vergleich zur nicht korrigierten Gruppe. Alter, BMI, TSH, fT3 und *follow-up* sind somit beeinflussende Faktoren des Frakturrisikos. Vor allem das Alter nimmt eine signifikante Rolle in der Entstehung von Frakturen ein. Das erhöhte Bruchrisiko bei erniedrigten Cu-Leveln ist im nicht korrigierten Modell und in allen korrigierten Modellen statistisch signifikant im Vergleich zur 3.Quintile ($p < 0,05$) und bei erhöhten Werten annähernd signifikant.

Tab. 4.15: Beziehung zwischen Cu-Level und Frakturrisiko.

Frakturrisiko	Cu ¹			
	Niedrig	CI	Hoch	CI
Modell				
-	2,670	1,036-6,883	2,333	0,897-6,072
+ <i>follow-up</i>	2,792	1,081-7,206	2,331	0,896-6,065
+ Alter + <i>follow-up</i>	2,846	1,102-7,347	2,241	0,861-5,834
+ BMI + <i>follow-up</i>	2,814	1,089-7,270	2,343	0,900-6,100
+ TSH + fT3 + <i>follow-up</i>	2,800	1,084-7,230	2,358	0,905-6,144
+ Alter + BMI + <i>follow-up</i>	2,875	1,113-7,429	2,259	0,867-5,884
+ Alter + BMI + TSH + fT3 + <i>follow-up</i>	2,874	1,112-7,428	2,261	0,867-5,896

CI- Clearance Index/Konfidenzintervall

¹Risikoberechnung 3. Cu-Quintile im Vergleich zur 1. (niedrig) und 5. (hoch) Cu-Quintile.

Die Analyse des Frakturrisikos in Bezug auf den Zn-Status ergab keinen Einfluss von niedrigen (1.Quintile) bzw. hohen (5.Quintile) Zn-Konzentrationen auf ein vermindertes oder verstärktes Risiko eines Knochenbruches in der OPUS-Auswahlkohorte (Tab. 4.16, Abb. 4.15). Auch in den korrigierten Modellen wird kein Einfluss der Parameter auf die Wahrscheinlichkeit eines Bruches ersichtlich.

Tab. 4.16: Beziehung zwischen Zn-Level und Frakturrisiko.

Frakturrisiko	Zn ¹			
	Niedrig	CI	Hoch	CI
Modell				
-	1,246	0,564-2,752	1,014	0,472-2,176
+ <i>follow-up</i>	1,271	0,588-2,749	1,079	0,474-2,454
+ Alter + <i>follow-up</i>	1,283	0,593-2,773	1,068	0,470-2,430
+ BMI + <i>follow-up</i>	1,272	0,588-2,752	1,077	0,473-2,449
+ TSH + fT3 + <i>follow-up</i>	1,283	0,593-2,777	1,081	0,475-2,461
+ Alter + BMI + <i>follow-up</i>	1,286	0,595-2,781	1,068	0,470-2,429
+ Alter + BMI + TSH + fT3 + <i>follow-up</i>	1,288	0,595-2,787	1,069	0,469-2,433

CI- Clearance Index/Konfidenzintervall

¹Risikoberechnung 3. Zn-Quintile im Vergleich zur 1. (niedrig) und 5. (hoch) Zn-Quintile.

Das in den Tabellen 4.14, 4.15 und 4.16 dargestellte und nach Poisson generalisierte Modell zur Ermittlung des Frakturrisikos in Bezug zum Spurenelement-Status von Zn, Cu und Se in der OPUS-Auswahlkohorte, wird in der Abb. 4.15 graphisch präsentiert.

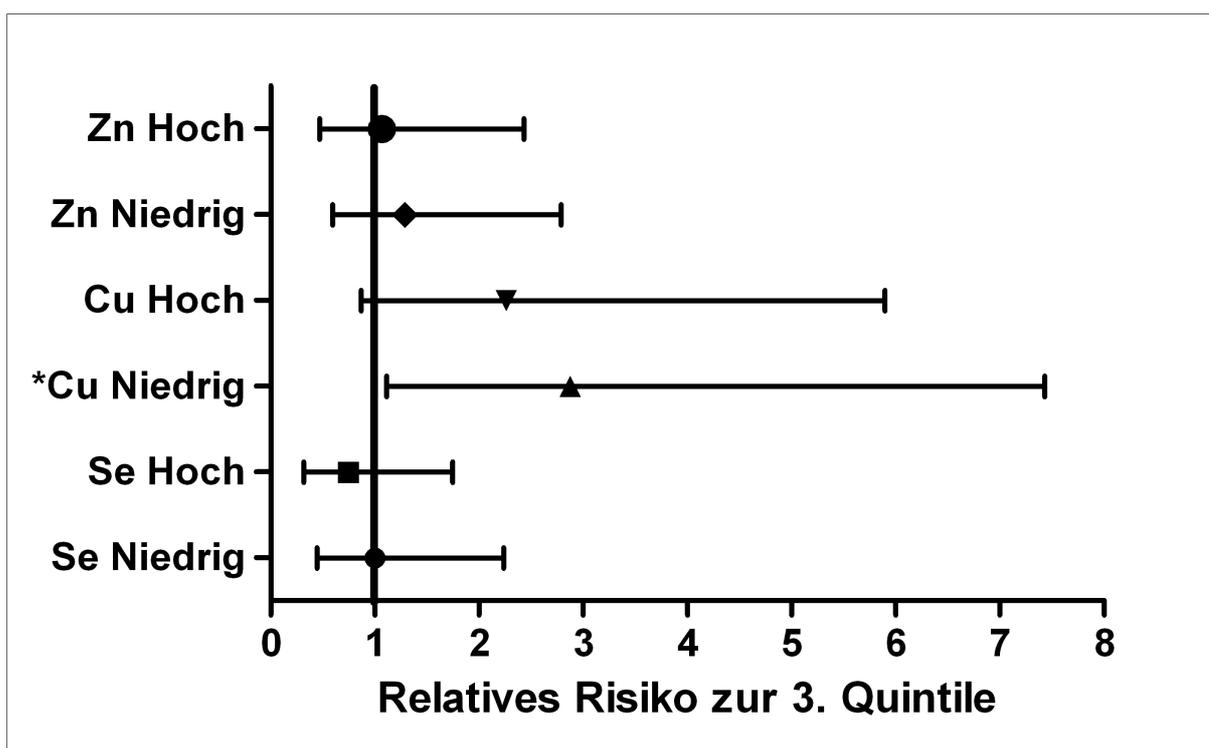


Abb. 4.15: Beziehung des Zn-, Cu- und Se-Status auf das Frakturrisiko in der OPUS-Kohorte.

Der Einfluss eines niedrigen (1.Quintile) und hohen (5. Quintile) Zn-, Cu- und Se-Status auf das Frakturrisiko in Bezug zu mittleren Zn-, Cu- und Se-Leveln (3.Quintile) ist der Graphik zu entnehmen. Der Zn-Status zeigt keinen Einfluss auf das Frakturrisiko, während ein hoher und niedriger (statistisch signifikant) Cu-Status in Beziehung zu einem zweifach erhöhten Risiko stehen. Hohe Se-Level demonstrieren eine Tendenz zu einem erniedrigten Frakturrisiko. Das Frakturrisiko wurde korrigiert für Alter, BMI, TSH, fT3 und *follow-up*. Dargestellt sind MW±SD (entspricht dem Konfidenzintervall). Eine statistische Signifikanz liegt vor, sofern das Konfidenzintervall nicht die Zahl 1 beinhaltet; p<0,05 (*).

5 Diskussion

Selen und Knochen? Selen und Knochen!

Die Bedeutung von Se und Selenoproteinen für die allgemeine Gesundheit und Prävention von Erkrankungen hat in den letzten Jahrzehnten einen starken Aufschwung genommen. Nicht zuletzt, da tierexperimentelle Arbeiten und humane Studien auf einen positiven Effekt von einer Se-Supplementation auf eine Vielzahl humaner Erkrankungen weisen und umgekehrt ein relativer Se-Mangel als Risikofaktor für Erkrankungen und schwere Erkrankungsverläufe angesehen werden muss (Rayman 2012). Dagegen ist die Bedeutung des Spurenelementes Se in und für die Knochengesundheit bis heute kaum untersucht worden. Zieht man in Betracht, dass heutzutage weltweit über 200 Millionen Menschen an Osteoporose leiden, ist dies verwunderlich, denn ein starker Se-Mangel steht schon seit längerem in Verbindung mit Wachstumsdefekten und eingeschränkter Mineralisierung in tierexperimentellen Studien (Hill *et al.* 2003; Schomburg *et al.* 2003; Moreno-Reyes *et al.* 2006; Reginster and Burlet 2006). Während eine Se-Defizienz in Ratten mit einem niedrigeren BMD und BMC in Femur und Tibia in Verbindung gebracht werden konnte (Moreno-Reyes *et al.* 2006), kann sie im Menschen die endemische Osteoarthritis KBD hervorrufen, deren Phänotyp durch Se-Supplementationen gemildert werden kann (Moreno-Reyes *et al.* 2001b; Zou *et al.* 2009). Daneben führt eine Mutation in dem Protein SBP2, essentiell für die Selenoproteinbiosynthese, in den Patienten zu einem Wachstumsdefekt mit verzögerter Knochenreifung. Die Behandlung mit Schilddrüsenhormonen, deren Aktivierung über die Selenoprotein-Dejodasen erfolgt, die in diesen Kindern nur unzureichend gebildet werden, resultierte in einer Beschleunigung der Knochenentwicklung fast auf ein normales Niveau (Dumitrescu *et al.* 2005). Dieser Therapieerfolg bestätigt, dass in der Tat die fehlende Selenoproteinexpression ursächlich für den Wachstumsdefekt war. Schließlich konnte der Se-Status mit dem Knochen *turnover* in gesunden postmenopausalen Frauen in Verbindung gebracht werden. Interessanterweise war dieser Effekt nicht direkt über die Schilddrüsenachse erklärbar, was weitere bislang unerforschte Interaktionen von Se mit der Knochenphysiologie aufzeigt (Hoeg *et al.* 2012).

Die Studien der vorliegenden Arbeit unterstreichen diesen direkten Einfluss des essentiellen Spurenelementes Se auf die Knochengesundheit. Das hepatische Plasmaprotein SePP übernimmt hierbei die wichtige Aufgabe des Transportes von

Se und dessen Speicherung. Mit der Entwicklung der *Sepp*-KO-Maus, die ein Se-abhängiges Wachstumsdefizit aufweist, hatte sich ein geeignetes Modell gefunden, um die Bedeutung eines genetisch eingeschränkten Se-Metabolismus und damit eines endogen reduzierten Se-Status mit verminderter Selenoproteinexpression für die Knochenhomöostase zu untersuchen.

5.1 Das Spurenelement Selen im murinen Knochen

Die detaillierte Erforschung der Bedeutung von Se für die Knochengesundheit verlangte zunächst nach dem Aufbau einer sensitiven Methodik zur Ermittlung der Konzentration des Elementes im Zielorgan. Mit der TRFA-Technologie hatte sich eine geeignete und sensitive Analyse gefunden. Die vorangegangene Inkubation in 2,5%iger HNO_3 -Lösung stellte sich als eine geeignete, schnelle und Struktur-schonende Methode zur Entkalkung der Knochen heraus. Se konnte hierdurch exklusiv in der organischen Matrix detektiert werden, wo es gebunden an Proteine vorliegt. Der ermittelte Se-Gehalt im murinen Knochen ($0,140 \pm 0,013 \mu\text{g/g}$) entspricht annähernd der Se-Konzentration der gefütterten RDA-Diät (0,15 ppm) und ist vergleichbar mit publizierten Werten im humanen Knochen ($0,17 \pm 0,04 \mu\text{g/g}$) (Wang C.-T. 1997). Dies bestätigt, dass die gewählte Methode der Probenvorbereitung mit nachfolgender TRFA-basierter Quantifizierung eine geeignete und sensitive Methode zur Konzentrationsbestimmung von Se aus Knochen darstellt.

Die ermittelten Knochen Se-Level sind vergleichbar mit anderen Organen wie Gehirn und Muskel ($0,15$ - $0,30 \mu\text{g/g}$), jedoch deutlich geringer als in Leber, Niere oder Hoden ($0,7$ - $1,5 \mu\text{g/g}$) von Mäusen, die mit einer Se-adäquaten Diät gefüttert werden (Nakayama *et al.* 2007). Beachtet man, dass Se ausschließlich in der organischen Matrix des Knochens lokalisiert ist, sind die Werte mit den anderen gut versorgten Organen vergleichbar.

Während die Se-Werte in Leber und Niere bei begrenzter Se-Versorgung oder *Sepp*-Mangel drastisch sinken, zeigen sich Gehirn und Hoden resistent (Bermano *et al.* 1995). Dies wird eigentümlich als Hierarchie der Organe in Bezug auf die Se-Versorgung bezeichnet und stellt sicher, dass die zentralen Aufgaben eines Organismus, Überleben und Reproduktion, auch in Mangelzeiten gewährleistet werden (Schomburg and Schweizer 2009). Die Ergebnisse der Arbeit deuten eine

ebenso bevorzugte Stellung des Knochens mit einer relativ gut ausgeprägten Resistenz gegenüber begrenzter Se-Versorgung an. Unabhängig vom Gesamt-Se-Gehalt im Körper schützt Sepp das Gehirn und die Hoden vor Se-Mangel (Burk and Hill 2009). Der Knochen kann nun ebenso in die Auswahl der präferentiell mit Se versorgten Organe eingeordnet werden (Pietschmann *et al.* submitted). Die Se-Konzentration sinkt drastisch mit abnehmender Anzahl der *Sepp*-Allele, wobei dieser Effekt deutlicher in den Männchen ausfällt, die sensitiver auf Schwankungen im *Sepp*-Genotyp reagieren (Pietschmann *et al.* submitted). Der Wachstumsphänotyp und die starke Reduktion der Se-Konzentration in den *Sepp*-KO-Tieren konnten aber in dem *Sepp*^{-tg}-Mausmodell in beiden Geschlechtern behoben werden, was die Bedeutung des SePP-vermittelten Transportes für die Knochenentwicklung und Knochenhomöostase unterstreicht.

5.2 Hepatisches SePP als Se-Transporter in den Knochen

Die *Sepp*^{-tg}-Maus exprimiert ausschließlich humanes SePP in den Hepatozyten der Leber, welches die Se-Konzentration in der Niere, den Hoden und dem Gehirn signifikant ansteigen ließ im Vergleich zu den KO-Tieren (Renko *et al.* 2008). In der Arbeit konnte somit hepatisches SePP als die Hauptform des Se-Transportes in die peripheren Organe identifiziert werden. Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen nun, dass auch in den Knochen der Se-Gehalt in *Sepp*^{-tg}-Mäusen im Vergleich zu den *Sepp*-KO-Tieren statistisch signifikant erhöht ist und vergleichbare Konzentrationen mit denen der *Sepp*-HET-Tiere erreicht. Da parallel die Se-Konzentration im Serum der *Sepp*^{-tg}-Tiere nur mäßiger ansteigt, muss diesem Effekt eine präferentielle Aufnahme von SePP in den Knochen zugrunde liegen, was die hierarchisch bevorzugte Position des Knochens neben Gehirn und Hoden unterstreicht.

Nachdem hiermit eine bevorzugte Se-Versorgung mittels hepatischen SePP im Knochen gezeigt werden konnte, musste auch die Expression eines geeigneten Sepp-Rezeptors für die Se-Aufnahme postuliert werden.

5.3 Expression des Sepp-Rezeptor Apoer2 im Knochen

Für die Se-Homöostase in Gehirn, Niere und Hoden ist die Bedeutung von Sepp und seinen zwei bekannten Rezeptoren Apoer2 und Megalin etabliert (Krol *et al.* 2012).

Erstaunlicherweise konnte die Expression von Apoer2, der in der gewebsspezifischen Sepp-vermittelten Se-Aufnahme beteiligt ist, auch im Knochen der *Sepp*-Mäuse auf transkriptionaler sowie Proteinebene präsentiert werden, während Megalin nicht detektierbar ist (Kurokawa *et al.* 2012). Diese Beobachtungen stimmen mit den hier geschilderten Ergebnissen überein. Allerdings erfolgt nach den in dieser Arbeit dargelegten Ergebnissen die Expression des Sepp-Rezeptors Apoer2 geschlechtsspezifisch und Se-Status abhängig. Eine deutliche Erhöhung der Expression wurde ausschließlich in den männlichen *Sepp*-KO-Tieren beobachtet. In diesem Zusammenhang wäre die Untersuchung der Knochen aus dem *Apoer2*-KO-Mausmodell sehr interessant. Die Tiere litten ebenso an Se-abhängiger eingeschränkter motorischer Koordination sowie Tremor und Wachstumsdefekt wie die *Sepp*-KO-Tiere, was eine gegenseitige Abhängigkeit des Transporter-Rezeptor-Paares Sepp-Apoer2 für die Se-Homöostase unterstreicht (D'Arcangelo *et al.* 1995; Schweizer *et al.* 2004; Burk *et al.* 2007). Interessanterweise konnte auch *Lrp1*, als dritter Sepp-Rezeptor diskutiert, im murinen Knochen detektiert werden, mit einem geschlechtsspezifischen Anstieg der Expression in männlichen *Sepp*-KO-Mäusen, vergleichbar mit *Apoer2*. Obwohl Kurokawa *et al.* *Lrp1* nicht als zusätzlichen Rezeptor identifizieren konnten, belegen unpublizierte Daten von Prof. Ulrich Schweizer einen Nahrungs-Se abhängigen neurologischen Phänotyp in Neuronenspezifischen *Lrp1*-KO-Mäusen (Kurokawa *et al.* 2012).

Die erfolgreiche Vermeidung des neuronalen Phänotyps und der Infertilität in den *Sepp*^{-tg}-Mäusen demonstrierten, dass humanes SePP Se in die Zielorgane transportieren kann, wobei diesem gerichteten Prozess eine Rezeptor-vermittelte Se-Aufnahme zugrunde liegt (Renko *et al.* 2008; Kurokawa *et al.* 2012). Somit war die Grundlage geschaffen, um mit humanem, rekombinanten SePP eine mögliche Interaktion mit den murinen OC-ähnlichen Raw-Zellen zu untersuchen, die Apoer2 exprimieren. In Einklang mit der *in silico* Auswertung wird Apoer2 in den ROS-produzierenden OC exprimiert, während in den OB-ähnlichen MC3T3-Zellen Signale nahe des Detektionslimits beobachtet wurden. Mit dem *in vitro* Assay zur Untersuchung der SePP-Aufnahme über den *siRNA*-vermittelten *knockdown* von *Apoer2* konnte die Spezifität der SePP-Apoer2-Interaktion von OC gezeigt werden. Dieses Ergebnis bestätigt und erweitert die Erkenntnisse von Kurokawa *et al.* und

zeigt, dass neben Myoblasten auch OC diesen metabolischen Weg nutzen, um eine effiziente Se-Versorgung sicherzustellen. Allerdings konnte in diesen Versuchen Lrp1 nicht als Sepp-Rezeptor bestätigt werden. Die Funktion von Lrp1 und dessen dynamische Regulation bedürfen weiterer *in vitro* und *in vivo* Studien.

Die bestätigte Expression von Sepp und seinem Rezeptor Apoer2 im Knochen lässt auf eine effiziente Biosynthese und einen Wiederaufnahme-Kreislauf schließen, vergleichbar mit dem „Sepp-Zyklus“ im Gehirn zur Aufrechterhaltung der Se-Homöostase in Zeiten von Se-Mangel (Schomburg *et al.* 2004). Jedoch scheint die Se-Homöostase im Knochen weniger stark von Sepp abzuhängen als die im Gehirn. Während die Se-Konzentration im Knochen nur mäßig in den *Sepp*-KO-Tieren reduziert ist, sinkt diese drastisch im Gehirn (Schomburg *et al.* 2003; Nakayama *et al.* 2007). Vorstellbar wäre, dass der Knochen eine besondere Position, vergleichbar mit der Schilddrüse einnimmt. Die Schilddrüse nimmt eine Stellung noch über dem Gehirn und den Hoden ein, da ihre Se-Konzentration sehr hoch ist, und die präferentielle Versorgung auch im *Sepp*-KO-Tier nicht vollständig zusammenbricht, es somit weitere Transportmechanismen geben muss, die auch bei SePP-Mangel die bevorzugte Versorgung dieses endokrinen Organs sicherstellen (Schomburg *et al.* 2006).

5.4 Expression der Selenoproteine und der des –Metabolismus

5.4.1 Einfluss von Se-Mangel auf die Selenoprotein-Transkripte

Die Expression von mindestens neun Selenoproteinen konnte vor einigen Jahren *in vitro* in humanen OB und OB-Vorläuferzellen nachgewiesen werden (Dreher *et al.* 1998; Schutze *et al.* 1999). Dabei hatten sich die Wissenschaftler auf die Expression der *GPx*- und *TrxR*-Isoformen sowie *SePP* konzentriert. In dieser Arbeit konnte die Expression von 22 Selenoproteinen im murinen Knochen gezeigt werden. Ausschließlich *Dio1* und *Selv* werden nicht im Knochen gebildet.

Die Transkriptmengen der Selenoproteine und der weiterer Faktoren des Selenoproteinmetabolismus präsentieren sich größtenteils unbeeinflusst von mäßigem Se-Mangel (*Sepp*-HET-Tiere). In den *Sepp*-KO-Mäusen zeigen sich große geschlechtsspezifische Expressionsunterschiede, wobei die Männchen sensitiver auf

Schwankungen im *Sepp*-Genotyp reagieren. Die Transkriptmenge einiger Selenoproteine (z.B. *Txnrd1-3*, *Seli*, *Sels*) ist ausschließlich in männlichen KO-Tieren hochreguliert, wohingegen die mRNA von *Gpx1-4* nur in Weibchen reduziert ist (*Gpx4* auch in Männchen). Neben der ausbleibenden Expression von *Sepp* in den KO-Tieren, ist *Selk* nicht mehr detektierbar und die Transkriptmenge von *Gpx4* und *Dio3* in den Männchen drastisch reduziert.

Das Muster dieser Expressionsdaten der Selenoproteingene konnte mit *in silico* Analysen bekräftigt werden, die in OB, OC und im Knochen durchgeführt wurden (Tab. 4.2). Die Analyse dieser Daten deutet an, dass Selenoproteingene für den antioxidativen Schutz (z.B. *Gpx1-4*, *Txnrd1-3*) vornehmlich in den Knochen-resorbierenden OC exprimiert werden. Die OB exprimieren dagegen vornehmlich Selenoproteingene mit Funktionen im ER-Stress, in der Qualitätskontrolle sowie für vornehmlich anabolische Aktivitäten (z.B. *Selm*, *Sepw*, *Sels*). So bestätigte eine kürzlich erschienene Studie die Expression von *Selm* in den OB. Dabei wird vermutet, dass *Selm* eine wichtige Rolle in der Prozessierung der ECM-Proteine während der Knochenentwicklung spielt (Grosch *et al.* 2013). Die Qualitätskontrolle der ECM-Proteine (z.B. Kollagen 1A1) ist von fundamentaler Bedeutung zur Vermeidung von ER-Stress, welcher in Beziehung zu einer Vielzahl von Erkrankungen des Bindegewebes steht (u.a. *Osteogenesis imperfecta*, multiple epiphysäre Dysplasie) (Boot-Handford and Briggs 2010).

Diese große Anzahl gebildeter Selenoproteine im Knochen erscheint ungewöhnlich, da man generell davon ausgeht, dass nur ca. 50 % des Genoms in einer differenzierten Zelle auch exprimiert werden (Ramskold *et al.* 2009). Die genannten Aufgaben der Selenoproteine könnten für den Knochen *turnover* von zentraler Bedeutung sein, v.a. in Bezug auf kontrollierte ROS-Funktionen während der Knochenremodellierung, als endogene Signale der Osteoklastogenese und der OB-Aktivitäten (Zeng *et al.* 2013). Studien konnten belegen, dass es durch Se-Supplementation zu einer erhöhten Expression antioxidativer Selenoproteine kommt und die RANKL-vermittelte ROS-Generierung gesenkt und damit auch die Signalstärke zur OC-Differenzierung beeinflusst wird (Lean *et al.* 2005; Ebert *et al.* 2006; Sheweita and Khoshhal 2007; Moon *et al.* 2012). Dies deutet auf die

Notwendigkeit einer adäquaten Se-Versorgung zur Aufrechterhaltung der OB-OC-Balance mittels Regulierung der ROS-Level (Zeng *et al.* 2013).

Bisher konnte keine Expression von Selenoproteinen in OC nachgewiesen werden (Sun *et al.* 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde nun ausschließlich die Bildung des Selenoproteins Sepp in Knochen-ähnlichen Zellen analysiert. Dabei zeigte sich, dass Sepp nicht nur in den OB-ähnlichen MC3T3-Zellen, sondern auch in den OC-ähnlichen Raw264.7-Zellen exprimiert wird. Sepp wird ebenso lokal im Knochen exprimiert, wobei dessen Expression stärker in den OB als in den OC ist (laut *in silico* und *in vitro* Analyse). Die Se-Supplementation führte *in vitro* zu einer verstärkten Sepp-Expression, was auch für dessen Rezeptor Apoer2 und das intrazellulär Se-bindende Protein Sebp1 gilt. Eine gesteigerte Sepp-Expression konnte auch schon in früheren Studien nach einer Se-Supplementation gezeigt werden (Stoedter *et al.* 2010; Hoefig *et al.* 2011).

Die Detektion von Sepp auf Proteinebene lokalisierte das Protein im nicht-mineralisierten Bereich des Knochens und nahe der OB sowie OC. Die lokale Expression des Proteins scheint vornehmlich auf die OB konzentriert zu sein, während der OC als Ort der Rezeptor-vermittelten Interaktion mit Apoer2 fungieren könnte.

Die Ergebnisse der qRT-PCR-Studie geben zwar einen detaillierten Einblick in die Selenoproteinexpressionsmuster im Knochen, es bleiben jedoch noch viele Fragen bezüglich derer Funktionen offen. Warum werden einige Selenoproteingene so stark reguliert, andere nicht? Warum reagieren die Männchen intensiver auf die Schwankungen im Sepp-Genotyp? In dieser Arbeit wurden die Mäuse mit einer Se-adäquaten Diät (0,15 ppm) gefüttert. Erforderlich wäre die Analyse der Selenoproteinmuster aus Mäusen, die mit einer Niedrig-Se-Diät (0,08 ppm) bzw. einer Hoch-Se-Diät (0,6 ppm) gefüttert wurden, um hier die Se-Abhängigkeit der Expressionsmuster zu erforschen. Zudem würden *knockdown* Studien regulierter Gene intensivere Einblicke in die Funktionen der Proteine für den Knochen liefern.

5.4.2 Regulierung der Se-bindenden Proteine in Sepp-KO-Mäusen

Die nur wenig charakterisierten Se-bindenden Proteine Sebp1 und Fabp1 scheinen im Knochen eine wichtige Aufgabe im Se-Metabolismus und der –Akkumulation zu

spielen, da ihre Transkriptmenge in *Sepp*-defizienten männlichen Mäusen ebenso hochreguliert ist wie die des *Sepp*-Rezeptors *Apoer2*.

Sebp1 wird in einer Vielzahl muriner Organe, wie Herz, Niere und Verdauungsorgane, exprimiert (Yang and Diamond 2013). In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Sebp1* auch im Knochen gebildet wird und dass Leber und Niere einen deutlich erhöhten Gehalt an *Sebp1* aufweisen im Vergleich zu den anderen untersuchten Organen. *Sebp1* ist ebenso wie *Sepp* in den proximalen Tubuli der Niere lokalisiert, jedoch nicht in den Hepatozyten um die Gefäße herum, sondern peripher der Gefäße. In den Hoden findet sich *Sebp1* in den runden Spermatozoen im Vergleich zu *Sepp*, welches in Vesikel-ähnlichen Strukturen in der basalen Region der Sertoli-Zellen vorzufinden ist (Olson *et al.* 2007). Während *Sepp* im Knochen im nicht-mineralisierten Bereich, vornehmlich in direkter Nähe zu OB und OC detektierbar ist, scheint *Sebp1* in den aus OB-stammenden Saumzellen lokalisiert zu sein. Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation von *Sebp1* in Bezug auf *Sepp* (nicht Gefäßnähe), scheint *Sebp1* keine Se-transportierende Funktion zu übernehmen. Über die genaue physiologische Bedeutung der Se-bindenden Proteine kann zu dem jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden, da Daten über ihre Aufgaben und Se-bindenden Kapazitäten fehlen. Die Beschreibung einer kürzlich publizierten KO-Maus von *Sebp1* hat in dieser Hinsicht nur wenig neue Erkenntnisse geliefert, da diese Tiere nur geringe phänotypische Ausprägungen im Vergleich zu den WT-Mäusen präsentierten (Tsujimoto *et al.* 2013).

5.5 Knochenmorphologie und Se-Status

5.5.1 Verlangsamte Ossifikation in *Sepp*-KO-Mäusen

Die Untersuchung der Knochenentwicklung zwischen den *Sepp*-WT-, -HET- und -KO-Mäusen (P35-40) offenbarte ein deutlich verzögertes Knochenwachstum in den homozygoten KO-Tieren. Dagegen zeigte sich kein Unterschied in der Entwicklung zwischen den WT- und HET-Mäusen. Die juvenilen Knochen aller Genotypen befinden sich noch in der Wachstumsphase. Eine beginnende Verknöcherung der knorpeligen Wachstumsfuge ist schon in den WT- und HET-Mäusen erkennbar. Die Mäuse haben das Längenwachstum noch nicht abgeschlossen (die Epiphysen sind

noch nicht vollständig verknöchert), sie befinden sich aber offensichtlich in der letzten Phase der Knochenentwicklung. Die *Sepp*-KO-Mäuse scheinen dagegen auf einer Entwicklungsstufe hinter den WT- und HET-Tieren zu sein. Das sekundäre Ossifikationszentrum beginnt sich gerade auszubilden und der knorpelige Anteil überwiegt in diesen Tieren. Es scheint kein pathologischer Schaden vorzuliegen, da der Aufbau der Wachstumsfuge denen der WT- und HET-Tieren mit all seinen Zonen entspricht. Interessanterweise konnte Frau Dr. Antonia Hög (ehemalige Doktorandin am Institut für Experimentelle Endokrinologie, Charité, Berlin) auch in ihrer Dissertation zeigen, dass es keinen Unterschied in der Entwicklung der Wachstumsfuge zwischen *Sepp*-WT-, -HET- und -KO-Mäusen am Tag 1 (P1) gibt. Somit ist offensichtlich die verlangsamte Differenzierung der Wachstumsplatte nicht auf eine beeinträchtigte Embryonalentwicklung zurückzuführen. Bezüglich der Knochenlänge konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den *Sepp*-Genotypen beobachtet werden. Ein Trend zu kürzeren Knochen ist in den *Sepp*-KO-Tieren deutlich erkennbar. Antonia Hög konnte in 14 d alten Mäusen nur einen geringen Längenunterschied beobachten. Es zeigte sich bei der Generierung der *Sepp*-KO-Maus, dass sich ein Gewichts- und Wachstumsdefizit erst im Laufe der juvenilen Entwicklung herauskristallisiert (Schomburg *et al.* 2003).

Die Bedeutung einer uneingeschränkten Selenoproteinexpression und -Funktion für die Knorpelentwicklung und das Überleben von Mäusen konnte auch die Gruppe um Downey *et al.* nachweisen. In der Osteoprogenitor-spezifische Deletion im Sec-tRNA-Gen, *Trsp*, konnte ein ähnlicher Entwicklungsdefekt und plötzlicher Tod der Mausmutante beobachtet werden (Downey *et al.* 2009). Während nach der Geburt kein signifikanter Unterschied in der Knochengröße vorhanden war, bildete sich ein ausgeprägtes Wachstumsdefizit (in Größe und Länge) am Tag 23-28 aus, gefolgt vom plötzlichen Tod am Tag 28-35. Die *Sepp*-KO-Mäuse leiden ebenfalls unter einer verlangsamten Osteogenese, vergleichbar mit den *Trsp*-Tieren. In ihnen manifestierte sich die defekte Osteogenese in einer gestörten Entwicklung (Ossifikation) der Wachstumsplatte und einer zusätzlichen Chondronekrose in allen knorpeligen Geweben (Downey *et al.* 2009). Eine lokale T3-Defizienz aufgrund verminderter Dio-Aktivitäten wird dabei als Ursache des Knochenphänotyp diskutiert (Hatfield *et al.* 2011). Bekannt ist, dass T3 wichtige Aufgaben im Wachstum und der

Entwicklung, u.a. Regulation der Differenzierung der Wachstumsplatte einnimmt (Bassett and Williams 2003; Gromer et al. 2005). *Sepp*-KO-Mäuse zeigen hingegen keinen Phänotyp der Schilddrüsenachse und haben normale Schilddrüsenhormonkonzentrationen im Serum (Schomburg et al. 2006). Inwieweit die lokale Schilddrüsenhormonaktivierung im Knochen von einem *Sepp*- oder *Se*-Mangel betroffen ist muss sich in weiteren Studien zeigen. Zumindest die hier dargelegte Beibehaltung der *Dio2*-Expression spricht nicht dafür, dass in den *Sepp*-Mäusen dieser Stoffwechselweg für den Wachstums- und Reifungsphänotyp der Knochen verantwortlich ist.

5.5.2 Ossifikation und Dejodasen

Das Selenoenzym *Dio1*, wichtig für den Schilddrüsenmetabolismus, zählt zu den hierarchisch bevorzugten Selenoproteinen bei *Se*-Mangel und eingeschränkter *Sepp*-Expression, jedoch ist es nicht von Bedeutung für die Knochenhomöostase, da seine Expression im Knochen nicht nachgewiesen werden konnte (Schomburg et al. 2006). Dies ist in Einklang mit früheren Studien, die keine Expression von *Dio1* im Knochen und Knochen-ähnlichen Zellen nachwies bzw. *Dio1* und *SeIv* nicht in Chondrozyten fanden (Williams et al. 2008; Waung et al. 2012; Yan et al. 2013). Dagegen konnte die Expression von *Dio2* in Mausknöcheln (einschließlich Femur und Tibia) und MC3T3-Zellen nachgewiesen werden (Gouveia et al. 2005). Bassett et al. konnten einige Jahre später die Wichtigkeit der *Dio2*-Expression in den OB für die Knochenmineralisierung und –Integrität in einem *Dio2*-KO-Mausmodell bestätigen (Bassett et al. 2010). Die Ausschaltung von *Dio2* alleine und in Kombination mit *Dio1* resultierte augenscheinlich in keinen offensichtlichen skeletalen Wachstumsdefekt, obwohl die *Dio1/Dio2*-Doppelmutante eine 20%ige Reduktion der Dicke der Wachstumsplatte besaß (Bassett et al. 2010). Diese Ergebnisse sind jedoch in Einklang mit den Daten von Williams et al., die keine Expression von *Dio1* oder *Dio2* in Chondrozyten von Nagern zeigen konnte (Williams et al. 2008; St Germain et al. 2009). In dem *Sepp*-KO-Modell zeigte sich *Dio2* unbeeindruckt bezüglich der Schwankungen im *Se*- und *Sepp*-Gehalt und wird auf nahezu konstantem Level im Knochen gebildet. Aufgrund der beobachteten erhöhten Mineralisierung in den Knochen der *Sepp*-HET-Tiere (Abschnitt 5.5.4) und der von Bassett et al.

beschriebenen Wichtigkeit der Dio2-vermittelten T3-Produktion für das skeletale System, wäre eine geringere *Dio2*-Expression mit verminderter Anzahl der *Sepp*-Allele vorstellbar gewesen. Möglich wäre auch eine bevorzugte *Dio2*-Expression, als Ausgleich zur verminderten bzw. ausbleibenden *Sepp*-Expression. Im Rahmen dieser Arbeit war es leider nicht möglich, die Enzymaktivitäten in den murinen Knochen zu ermitteln, sodass letztendlich nicht bekannt ist, in welchem Maße die funktionalen Proteine aktiv sind. Die Dio2-Aktivität könnte am Ende deutlich geringer in den *Sepp*-HET- und -KO-Mäusen sein im Vergleich zum WT, obwohl die Transkriptmenge keinen Unterschied offenbarte, wie es schon für Dio1 beschrieben wurde (Riese *et al.* 2006).

Die Expression der dritten Dejodase *Dio3* konnte bislang *in vitro* in skeletalen Zellen nachgewiesen werden und in Chondrozyten sowie OB drei Wochen alter Ratten, jedoch nicht in älteren Tieren (Williams *et al.* 2008). In dem *Sepp*-Mausmodell ist *Dio3* auch in rund fünf Wochen alten Tieren nachweisbar. Der Verlust der *Sepp*-Expression hat im Vergleich zu *Dio2* einen drastischen Einfluss auf die *Dio3*-Transkriptmenge. In den weiblichen HET-Tieren steigt die *Dio3*-Expression stark an, während in den Männchen kaum ein Expressionsunterschied sichtbar ist. Erstaunlicherweise sinkt die Expression des Selenoproteins auf ein Minimum in den *Sepp*-KO-Tieren in beiden Geschlechtern. Hernandez *et al.* beobachteten einen Wachstumsdefizit nach Ausschaltung des Gens, was mit dem reduzierten Wachstum der *Sepp*-KO-Tiere in Einklang steht (Hernandez *et al.* 2007). *Dio3* ist die erste Dejodase, die während der Entwicklung gebildet wird und steht damit im Verdacht, die Schilddrüsenhormonverfügbarkeit für das sich entwickelnde Skelett zu regulieren und somit auch zu limitieren (Williams *et al.* 2008). Dies ist von Bedeutung, da Thyrotoxisen die Ossifikation des Knochens verstärken und somit auch einen vorzeitigen Verschluss der Wachstumsfuge herbeiführen, der zu einem verkürzten Wachstum führt (O'Shea *et al.* 2003). Bezogen auf den Menschen könnte dies die Kleinwüchsigkeit in der KBD erklären. Aber auch die Patienten mit der vererbten SBP2-Mutation leiden unter einer beeinträchtigten Knochenhomöostase, welche sich in einer stark verlangsamten Knochenentwicklung und veränderten Selenoproteinsynthese manifestiert (Dumitrescu *et al.* 2005; Azevedo *et al.* 2010). Ein vorzeitiger Verschluss der Wachstumsfuge scheint in dem *Sepp*-KO-Mausmodell

nicht vorzuliegen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten deuten eher auf eine verlangsamte Entwicklung der Tiere.

5.5.3 Ossifikation und antioxidative Selenoproteine

Indem GPx Peroxide abbauen, schützen sie vor Schädigungen der Zelle und ihrer Bestandteile. Daneben dienen sie aber auch als wichtige Signalmoleküle. Sofern ein Se-Mangel vorliegt, werden weniger GPx gebildet und gestörte ROS-Signale sind die Konsequenz. In dem *Trsp*-Mausmodell könnte eine *Gpx4*-Defizienz in der Chondrozyten-Apoptose resultieren, denn ROS alleine oder in Kombination mit nitrosativem Stress steht in Verdacht die Entstehung einer Osteoarthritis zu induzieren bzw. zu fördern (Pelletier *et al.* 2001; Hatfield *et al.* 2011). Aber auch Genpolymorphismen in *Gpx4* könnten die Expressionslevel oder Enzymaktivitäten spezifischer Selenoproteine schwanken lassen, was zum Knorpelschaden in der humanen Osteoarthritis beitragen könnte (Villette *et al.* 2002). Xiong *et al.* postulieren zudem einen Zusammenhang zwischen KBD und einem Polymorphismus in einem weiteren GPx-Vertreter, der ubiquitär exprimierten *Gpx1* (Xiong *et al.* 2010). In einem *Gpx1*-KO-Mausmodell konnte zumindest kein direkter Einfluss auf die Knochensteifigkeit gezeigt werden (Wang *et al.* 2008).

Mit dem Verlust der antioxidativen Eigenschaften von GPx4 könnte die Balance zwischen den OB und OC kippen, indem die OB empfindlicher gegenüber ROS sind, was die Osteogenese inhibieren und die Bildung von Osteoporose und einer Osteoarthritis fördern könnte (Hatfield *et al.* 2011). Es wird postuliert, dass physiologische Level an ROS die Chondrozytenaktivität modulieren, während Stimuli wie mechanischer Stress, Variationen im O₂-Gehalt oder proinflammatorische Mediatoren die ROS-Level erhöhen (Henrotin *et al.* 2005; Loeser 2006).

Interessanterweise sinkt auch die *Gpx4*-Expression drastisch in den *Sepp*-KO-Tieren in beiden Geschlechtern. Dies könnte die gestörte bzw. verlangsamte Knochenentwicklung in den Tieren erklären. Die Enzymaktivität von GPx4 in den KO-Tieren ist vermindert, aber nicht so stark gesunken wie die Transkriptmenge. Die Analyse des Se-Gehaltes offenbarte keine messbare Se-Konzentration in dem Proteinlysate, was darlegt, dass die absoluten GPx4-Expressionslevel nur gering sind.

Leider konnten die Studien zur Knochenmineralisierung und –Elastizität/Biegung der *Sepp*-KO-Tiere (P35-40) im Rahmen dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen werden. Möglich wäre ein ähnliches Ergebnis wie in der *Dio2*-KO-Maus, die eine gesteigerte Knochenmineralisierung sowie geringere –Elastizität und –Formation aufwies und damit einhergehend brüchigere Knochen, die im Drei-Punkt-Biegungstest schneller brachen (Bassett *et al.* 2010). Bisläng liegen nur Daten für die *Sepp*-WT- und –HET-Tiere vor, die bereits diese Tendenz erkennen lassen.

5.5.4 *Sepp*-Genotyp, Geschlecht und Knochenmineralisierung

Die Untersuchung der *Sepp*-WT- und –HET-Mäuse deutet auf eine Abhängigkeit der Knochenmineralisierung vom Se-Status hin. Innerhalb eines Genotyps ist eine geschlechtsspezifische Erhöhung der Mineraleichte in den Weibchen zu beobachten und zusätzlich auch eine Genotypen-abhängige Erhöhung in den *Sepp*-HET-Tieren. Die Ergebnisse der qRT-PCR zeigen dagegen keine Erniedrigung der *GPx4*-Transkripte in den HET-Tieren, wie sie in den KO-Mäusen zu beobachten war. Die *Gpx4* mRNA ist sogar erhöht in den männlichen Tieren, während die Enzymaktivität von GPx4 in den *Sepp*-HET-Mäusen erkennbar niedriger ist im Vergleich zu den WT-Tieren, sodass ein Einfluss von GPx4 auf die Osteogenese nicht ausgeschlossen werden kann. Die mRNA und das Protein scheinen in unterschiedlichem Maße reguliert zu sein, wie es schon zuvor bei den Dio-Enzymen eindrücklich gezeigt wurde (Riese *et al.* 2006).

Die histologische Untersuchung der Wachstumsfuge ergab keinen visuellen Unterschied in der Entwicklung zwischen *Sepp*-WT- und –HET-Mäusen. Jedoch stellen die morphohistologischen Analysen mit dem Faxitron eine deutlich sensitivere und objektivere Methode dar, sodass eine unzureichende Se-Versorgung z.B. aufgrund des Genotyps, der Ernährung oder der geografischen Lage, in ein Ungleichgewicht der Knochenhomöostase resultieren könnte. Die weiblichen Tiere weisen im Vergleich zu den Männchen eine erhöhte Mineralisierung auf. In Verbindung mit einer verminderten Knochenformationsrate würden die Tiere unter brüchigeren und fraktur anfälligeren Knochen leiden. Dies wiederum wäre im Einklang mit der höheren Osteoporose-Prävalenz in Frauen. Während in der US-amerikanischen Bevölkerung 6% der Männer zwischen 65-74 Jahren an

Osteoporose leiden, sind es bei Frauen in der gleichen Altersgruppe 34% (Blume and Curtis 2011). Um eine genaue Aussage treffen zu können, sind weitere Studien mit einer höheren Individuenanzahl von Nöten. Weitere strukturelle und funktionale Studien (u.a. μ CT-Analyse, Drei-Punkt-Biegungstest) zur Knochenqualität in verschiedenen *Sepp*-Mausgruppen und auf unterschiedlichen Se-Diäten (Niedrig-Se und bzw. Hoch-Se) würden das Bild komplementieren.

5.6 Einfluss von Spurenelementen auf die Knochengesundheit in der OPUS-Kohorte

Die OPUS-Studie bot die einmalige Gelegenheit, den Einfluss von Se auf die Knochengesundheit in einer großen Auswahlkohorte (1278 Frauen) zu analysieren. Dabei zeigte sich eine Korrelation zwischen dem Se-Status und der BMD in der Hüfte, da mit zunehmender Se-Konzentration auch der BMD anstieg (Hoeg *et al.* 2012). Ebenso konnte eine Assoziation zwischen fT3 und fT4 mit dem Se-Status beschrieben werden, die negativ miteinander korrelieren, während TSH, der *feedback* Regulator der Schilddrüsenhormonsynthese, nicht mit dem Se-Level assoziiert war.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde neben Se auch der Einfluss von Cu und Zn auf Parameter der Knochengesundheit in einer Auswahlkohorte (732 Probanden) der OPUS-Studie analysiert, um zusätzliche Einblicke in die Bedeutung weiterer essentieller Spurenelemente für die Knochenhomöostase zu gewinnen. Zusätzlich dazu wurde Se in diese Untersuchungen mit einbezogen, da es sich um eine kleinere exakter definierte Probandenauswahl handelte. Wie Hoeg *et al.* in ihrer Studie demonstrierten, korreliert Se negativ mit den Schilddrüsenhormonen und ist positiv mit seinem Transportprotein SePP und der BMD assoziiert. Zusätzlich dazu korreliert Se positiv mit Cu und Zn. Frühere Studien wiesen schon auf eine Beziehung zwischen diesen drei Spurenelementen hin. Ein SNP für Se konnte in den Genen für *BHMT2* und *BHMT* in Verbindung gebracht werden, welche für die Betain-Homocysteinmethyltransferase, ein Zn-Metalloprotein, kodieren (Evans *et al.* 2013). Für Cu konnte ein SNP auf dem Chromosomenlokus mit *SELENBP1* verbunden werden, welches für das Se-bindende Protein kodiert (Evans *et al.* 2013). Des Weiteren ist eine Regulierung des Cu-Status über die Schilddrüsenhormone (Level

über Selenoprotein-Dejodasen eingestellt) bekannt, welche die Synthese des Cu-Transporters Ceruloplasmin stimulieren (Mittag *et al.* 2012). Leider wurde der Gehalt des Cu-Transporters Ceruloplasmin nicht in der OPUS-Kohorte ermittelt. Rund 95% des Plasma-Cu-Gehaltes werden mittels des hepatischen Ceruloplasmins transportiert und somit korrelieren diese Faktoren stark miteinander ($r=0,65$), wie auch Se und SePP (Cole *et al.* 2013). Vergleichbar zu Se wurde in der Kohorte eine negative Assoziation von Cu zu fT3 beobachtet. Zusätzlich dazu wurde für Se und Cu eine negative Verbindung zu den Knochen *turnover* Markern entdeckt. Während die Konzentrationen der Elemente steigen, sinken sowohl die Marker des Knochenauf- als auch die des Knochenabbaus. Das Gleichgewicht in der Knochenremodellierung bleibt somit zwischen den OB und OC erhalten, jedoch sinkt die *turnover* Rate. Eine niedrige Remodellierungsrate könnte zu einem übermineralisierten Osteon und Verlust der Knochenqualität führen, einhergehend mit erhöhtem Frakturrisiko (Dequeker *et al.* 2003). Dies passt nicht in das Bild des positiven Einflusses auf die BMD. Jedoch beschrieben Gaier *et al.* Einschränkungen in der BMD aufgrund zu hoher Cu-Level und Cu/Zn-Verhältnisse in älteren Männern (Gaier *et al.* 2012). Interessanterweise stehen sowohl erniedrigte als auch erhöhte Cu-Level in Beziehung zu einem über zweifach erhöhtem Frakturrisiko. Dies könnte auf die verminderte *turnover* Rate zurückzuführen sein. Jedoch deuten erhöhte Se-Level auf ein vermindertes Bruchrisiko, trotz erniedrigter *turnover* Umsätze.

Während die Knochen *turnover* Marker und Schilddrüsenhormonlevel in keiner Beziehung zum Zn-Status in der OPUS-Kohorte stehen, konnte eine positive Korrelation zu Zn und der FN BMD beobachtet werden. Der von Nielsen *et al.* beobachtete positive Einfluss von Zn auf die BMD konnte somit bestätigt werden (Nielsen *et al.* 2011). Jedoch resultieren erniedrigte bzw. erhöhte Zn-Level in keine offensichtliche Änderung in den Parametern der Knochengesundheit oder dem Frakturrisiko.

Eine subklinische Zn- und Cu-Defizienz steht in Beziehung mit der Entstehung von Osteoporose, da sie u.a. als Faktoren wichtiger Enzyme für die Synthese der Knochenmatrixbestandteile verantwortlich sind (Lowe *et al.* 2002). Zudem sind die Elemente Bestandteil der Cu/Zn-Superoxiddismutase (SOD), welche neben den Se-abhängigen GPx wichtig für die Regulierung der ROS-Level sind (Ebert *et al.* 2006).

Osteoporose ist eine multifaktorielle Erkrankung, wobei neben der Ernährung auch genetische und endokrine Faktoren die Entstehung begünstigen (Reginster and Burlet 2006). Schwankungen im Se-, Zn- und Cu-Status könnten somit einen großen Einfluss auf die Entstehung von Osteoporose haben, zumal eine altersbezogene Knochenabnutzung (geringere BMD) auf ROS zurückzuführen ist (Manolagas 2010). ROS stehen in Verdacht, die OB-Differenzierung zu inhibieren und die OC-Differenzierung sowie –Formation zu stimulieren (Steinbeck *et al.* 1998). Eine generierte *Cu/Zn-SOD-KO-Maus* litt unter einer 43%igen Reduktion der femoralen Strukturstärke des Knochens und einer 32%igen Reduktion der Biegesteifheit (Wang *et al.* 2008). Die Ausschaltung der Se-abhängigen *Gpx1* schien dagegen einen viel geringeren Einfluss auf die femoralen mechanischen Eigenschaften des Knochens zu haben als das *Cu/Zn-SOD-KO-Mausmodell* (Wang *et al.* 2008).

Bei der Ermittlung der Cu- und Zn- Konzentrationen in den Knochen der *Sepp*-Mäuse wurde eine hohe Streuung der Daten beobachtet, wobei nur die Werte in den männlichen *Sepp-KO-Tieren* statistisch signifikant erhöht sind. Die qRT-PCR-Analyse offenbarte keine erhöhte Ceruloplasmin-Expression in den Knochen der Tiere (Daten nicht gezeigt). Ob die erhöhten Konzentrationen in Beziehung zu den verminderten Se-Konzentrationen stehen, ist nicht bekannt, ebenso wenig die Expressionslevel der Cu/Zn-SOD.

In einer weiteren Kohortenstudie mit 790 älteren Männer zeigte sich, dass Cobalamin (Vitamin B12 mit Kobalt als Faktor) und Holo-Transcobalamin (aktive Vitamin B12-Form) in der niedrigsten Quartile mit einem erhöhten Frakturrisiko verbunden sind (Lewerin *et al.* 2013). Daneben wird auch eine Beziehung zwischen niedrigem Mg-Status und Osteoporose sowie Osteopenie diskutiert (Mutlu *et al.* 2007). All die hier aufgelisteten Studien deuten an, dass es nicht das eine wichtige Spurenelement gibt für die Erhaltung der Knochengesundheit, es scheint mehr eine ausgeglichene Gesamtmineralhomöostase von Bedeutung zu sein. Für ein aussagekräftiges Ergebnis wäre eine Studie mit mehreren tausend Probanden in verschiedenen Altersgruppen (zunehmendes Alter mit einer signifikanten Rolle in der Entstehung von Brüchen) sowie beiden Geschlechtern notwendig, um den Einfluss der Spurenelemente auf die Knochenmineralisierung und *turnover* Raten zu analysieren.

Eine solche umfassende Untersuchung ist aber außerhalb der Möglichkeit einer einzelnen experimentellen Doktorarbeit.

5.7 Fazit und Ausblick

Diese Arbeit demonstriert einen Ausblick auf die Bedeutung einer ausreichenden Se-Versorgung und Selenoproteinexpression für einen gesunden Knochen. Schwankungen in der Genexpression in Bezug auf eine reduzierte oder fehlende Sepp-Bildung sind von Bedeutung, zumal SePP ein zuverlässiger Biomarker des Se-Status darstellt. Die Hochregulierung des Sepp-Rezeptors *Apoer2* und der Se-bindenden Proteine *Sebp1* sowie *Fabp1* während einer Se-Defizienz, deutet auf einen *Feedback* Mechanismus, um einer kritisch geringen Selenoproteinexpression im Knochen entgegenzuwirken, die die Knochenfunktionalität stark beeinträchtigen könnte (Abb. 5.1). Die beobachteten geschlechtsspezifischen Unterschiede in Bezug auf Schwankungen in der Se- und Sepp-Konzentration im Knochen der männlichen und weiblichen Tiere verlangt eine Anpassung in entsprechenden Humanstudien.

Die Daten deuten an, dass die Lebergesundheit mit der hepatischen SePP-Synthese wichtig ist für den Knochen Se-Status und damit einhergehend für die Knochengesundheit. Als wichtiger Regulator im Se-Metabolismus verwundert es nicht, dass Patienten mit einer Lebererkrankung reduzierte Serum Se- und SePP-Konzentrationen aufweisen (Burk *et al.* 1998). Zudem ist bekannt, dass eine kranke Leber zu Osteoporose, einer erniedrigten BMD und einem erhöhten Frakturrisiko führt (Bagur *et al.* 1998; Hamburg *et al.* 2000; Carey *et al.* 2003; Leslie *et al.* 2003). Die hepatische Osteodystrophie, eine chronische Lebererkrankung, hat einen negativen Effekt auf die Knochengesundheit, hervorgerufen durch unzureichende hepatische IGF-1-, Vitamin D- und Vitamin K-Biosynthesen und –Transport (Hay *et al.* 1991; Lopez-Larramona *et al.* 2011). Die Bedeutung eines beeinträchtigten Se-Transportes von der Leber in den Knochen für die Entstehung von Osteopenie und Osteoporose in Patienten mit chronischen Lebererkrankungen und einer Se-Supplementationen als potentiell geeigneter Behandlungsmethode in Patienten mit chronischen Lebererkrankungen müssen noch weiter untersucht werden. In der immer älter werdenden Gesellschaft mit einhergehendem erhöhten Risiko einer

unausgeglichene Balance zwischen Knochengeneration und –Abbau könnte die gezielte Supplementationstherapie mit Se von Bedeutung werden, wobei auch hier Mann-Frau-Unterschiede betrachtet werden müssen.

Das essentielle Spurenelement Se präsentiert einen Ausblick seiner bedeutenden Funktion in Bezug auf den dynamischen und metabolisch aktiven Knochen.

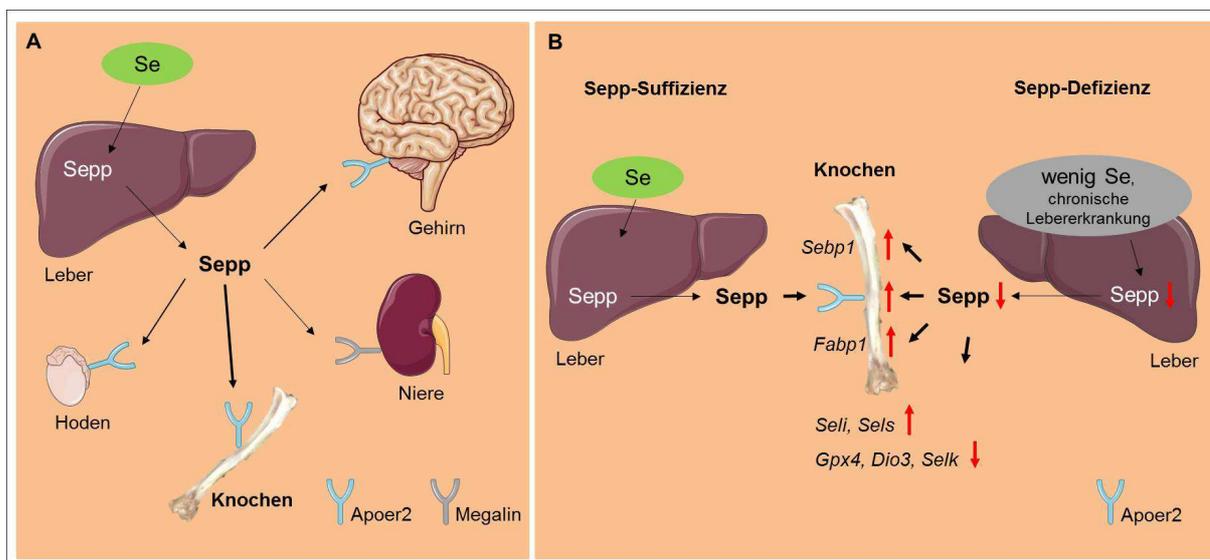


Abb. 5.1: Die Bedeutung von Se für die Knochenhomöostase. (A) Das mit der Nahrung aufgenommene Se wird in der Leber in dessen Speicher- und Transportprotein Sepp eingebaut und gelangt über den Blutstrom peripher zu den Organen. Neben Gehirn, Hoden und Niere, kann nun auch der Knochen zu den exklusiven Organen gezählt werden, die Se, gebunden an Sepp, über eine Rezeptor-vermittelte Aufnahme bevorzugt beziehen. Während die Niere den Sepp-Rezeptor Megalin exprimiert, erfolgt die Aufnahme im Gehirn, in Hoden und den Knochen über Apoer2. **(B)** Die linke Seite der Abbildung stellt den Zustand einer ausreichenden Se-Versorgung dar. Mit der Nahrung aufgenommenes Se wird in den Hepatozyten in Sepp eingebaut und z.B. in den Knochen transportiert. Herrscht dagegen ein Se-Mangel, aufgrund einer unzureichenden diätischen Versorgung oder einer Erkrankung (z.B. chronische Lebererkrankung), nimmt die Konzentration des in der Leber produzierten Sepp ab und auch die periphere Versorgung der Organe mit Sepp. Mit sinkender Anzahl der Sepp-Allele steigt die Transkriptmenge von *Seli* und *Sels* an, während die Expression von *Gpx4*, *Dio3* und *Selk* drastisch sinkt. Im Se-defizienten Mausmodell ist daneben eine Hochregulation des Sepp-Rezeptors Apoer2 und der intrazellulär Se-bindenden Proteine Sebp1 und Fabp1 zu beobachten. Dies lässt auf eine dynamische *Feedback*-Regulation schließen, d. h. mit sinkenden Sepp-Konzentrationen erfolgt eine verstärkte Bildung von Apoer2, um eine ausreichende Se-Versorgung des Organs zu gewährleisten. Dies unterstreicht die bedeutende Funktion des hepatischen Se-transportierenden Sepp für die Knochengesundheit sowie seine Eignung als mögliches Supplementationsziel während einer chronischen Lebererkrankung (z.B. hepatische Osteodystrophie). Die Abb. wurde mit Teilen aus der Medical Servier Datenbank erstellt.

6 Literaturverzeichnis

- (unknown authors 1979) Observations on effect of sodium selenite in prevention of Keshan disease. *Chinese medical journal*. **92**, 471-6.
- Aaseth, J., G. Boivin and O. Andersen (2012) Osteoporosis and trace elements--an overview. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements*. **26**, 149-52.
- Abe, E., R. C. Mariani, W. Yu, X. B. Wu, T. Ando, Y. Li, J. Iqbal, L. Eldeiry, G. Rajendren, H. C. Blair, T. F. Davies and M. Zaidi (2003) TSH is a negative regulator of skeletal remodeling. *Cell*. **115**, 151-62.
- Al-Taie, O. H., J. Seufert, H. Mork, H. Treis, B. Mentrup, A. Thalheimer, P. Starostik, J. Abel, M. Scheurlen, J. Kohrle and F. Jakob (2002) A complex DNA-repeat structure within the Selenoprotein P promoter contains a functionally relevant polymorphism and is genetically unstable under conditions of mismatch repair deficiency. *European journal of human genetics : EJHG*. **10**, 499-504.
- Alanne, M., K. Kristiansson, K. Auro, K. Silander, K. Kuulasmaa, L. Peltonen, V. Salomaa and M. Perola (2007) Variation in the selenoprotein S gene locus is associated with coronary heart disease and ischemic stroke in two independent Finnish cohorts. *Human genetics*. **122**, 355-65.
- Allmang, C. and A. Krol (2006) Selenoprotein synthesis: UGA does not end the story. *Biochimie*. **88**, 1561-71.
- Allmang, C., L. Wurth and A. Krol (2009) The selenium to selenoprotein pathway in eukaryotes: more molecular partners than anticipated. *Biochimica et biophysica acta*. **1790**, 1415-23.
- Almeida, M., L. Han, M. Martin-Millan, C. A. O'Brien and S. C. Manolagas (2007) Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor- to forkhead box O-mediated transcription. *The Journal of biological chemistry*. **282**, 27298-305.
- Amizuka, N., T. Hasegawa, K. Oda, P. H. Luiz de Freitas, K. Hoshi, M. Li and H. Ozawa (2012) Histology of epiphyseal cartilage calcification and endochondral ossification. *Front Biosci (Elite Ed)*. **4**, 2085-100.
- Angstwurm, M. W., L. Engelmann, T. Zimmermann, C. Lehmann, C. H. Spes, P. Abel, R. Strauss, A. Meier-Hellmann, R. Insel, J. Radke, J. Schuttler and R. Gartner (2007) Selenium in Intensive Care (SIC): results of a prospective randomized, placebo-controlled, multiple-center study in patients with severe systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock. *Critical care medicine*. **35**, 118-26.
- Arikan, D. C., A. Coskun, A. Ozer, M. Kilinc, F. Atalay and T. Arikan (2011) Plasma selenium, zinc, copper and lipid levels in postmenopausal Turkish women and their relation with osteoporosis. *Biological trace element research*. **144**, 407-17.
- Arner, E. S. (2010) Selenoproteins-What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? *Experimental cell research*. **316**, 1296-303.
- Arthur, J. R., G. Bermano, J. H. Mitchell and J. E. Hesketh (1996) Regulation of selenoprotein gene expression and thyroid hormone metabolism. *Biochemical Society transactions*. **24**, 384-8.
- Azevedo, M. F., G. B. Barra, L. A. Naves, L. F. Ribeiro Velasco, P. Godoy Garcia Castro, L. C. de Castro, A. A. Amato, A. Miniard, D. Driscoll, L. Schomburg and F. de Assis Rocha Neves (2010) Selenoprotein-related disease in a young girl caused by nonsense mutations in the SBP2 gene. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. **95**, 4066-71.
- Bagur, A., C. Mautalen, J. Findor, J. Sorda and J. Somoza (1998) Risk factors for the development of vertebral and total skeleton osteoporosis in patients with primary biliary cirrhosis. *Calcified tissue international*. **63**, 385-90.
- Bai, X. C., D. Lu, A. L. Liu, Z. M. Zhang, X. M. Li, Z. P. Zou, W. S. Zeng, B. L. Cheng and S. Q. Luo (2005) Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblast. *The Journal of biological chemistry*. **280**, 17497-506.

- Bansal, M. P., R. G. Cook, K. G. Danielson and D. Medina (1989a) A 14-kilodalton selenium-binding protein in mouse liver is fatty acid-binding protein. *The Journal of biological chemistry*. **264**, 13780-4.
- Bansal, M. P., C. J. Oborn, K. G. Danielson and D. Medina (1989b) Evidence for two selenium-binding proteins distinct from glutathione peroxidase in mouse liver. *Carcinogenesis*. **10**, 541-6.
- Bassett, J. H., A. Boyde, P. G. Howell, R. H. Bassett, T. M. Galliford, M. Archanco, H. Evans, M. A. Lawson, P. Croucher, D. L. St Germain, V. A. Galton and G. R. Williams (2010) Optimal bone strength and mineralization requires the type 2 iodothyronine deiodinase in osteoblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **107**, 7604-9.
- Bassett, J. H., K. Nordstrom, A. Boyde, P. G. Howell, S. Kelly, B. Vennstrom and G. R. Williams (2007) Thyroid status during skeletal development determines adult bone structure and mineralization. *Mol Endocrinol*. **21**, 1893-904.
- Bassett, J. H. and G. R. Williams (2003) The molecular actions of thyroid hormone in bone. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. **14**, 356-64.
- Beck, M. A., O. A. Levander and J. Handy (2003) Selenium deficiency and viral infection. *The Journal of nutrition*. **133**, 1463S-7S.
- Behne, D. and A. Kyriakopoulos (1993) Effects of dietary selenium on the tissue concentrations of type I iodothyronine 5'-deiodinase and other selenoproteins. *The American journal of clinical nutrition*. **57**, 310S-312S.
- Behne, D. and A. Kyriakopoulos (2001) Mammalian selenium-containing proteins. *Annual review of nutrition*. **21**, 453-73.
- Bermano, G., F. Nicol, J. A. Dyer, R. A. Sunde, G. J. Beckett, J. R. Arthur and J. E. Hesketh (1995) Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats. *The Biochemical journal*. **311 (Pt 2)**, 425-30.
- Bermano, G., F. Nicol, J. A. Dyer, R. A. Sunde, G. J. Beckett, J. R. Arthur and J. E. Hesketh (1996) Selenoprotein gene expression during selenium-repletion of selenium-deficient rats. *Biological trace element research*. **51**, 211-23.
- Berry, M. J., L. Banu, Y. Y. Chen, S. J. Mandel, J. D. Kieffer, J. W. Harney and P. R. Larsen (1991) Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature*. **353**, 273-6.
- Berry, M. J., A. L. Maia, J. D. Kieffer, J. W. Harney and P. R. Larsen (1992) Substitution of cysteine for selenocysteine in type I iodothyronine deiodinase reduces the catalytic efficiency of the protein but enhances its translation. *Endocrinology*. **131**, 1848-52.
- Berzelius, J. J. (1818) Undersökning af en ny Mineral-kropp, funnen I de orenare sorterna af det i Falun tillverkade svafvet. *Afhandlingar i fysik, kemi och mineralogi* pp 42-144, Afzelius J., Almroth N.W., Arfvedson A., Berzelius J., Eggertz H.P., Forselles J. AF, Gahn J.G., Hisinger W., Lagerhjelm P., Pontin M. AF, Rothoff E., Sefström N.G., Ström P., Svedenstierna E.T., Walmstedt P. Stockholm
- Blume, S. W. and J. R. Curtis (2011) Medical costs of osteoporosis in the elderly Medicare population. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. **22**, 1835-44.
- Blumer, M. J., S. Longato and H. Fritsch (2008) Structure, formation and role of cartilage canals in the developing bone. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*. **190**, 305-15.
- Bock, A., K. Forchhammer, J. Heider, W. Leinfelder, G. Sawers, B. Veprek and F. Zinoni (1991) Selenocysteine: the 21st amino acid. *Molecular microbiology*. **5**, 515-20.
- Boot-Handford, R. P. and M. D. Briggs (2010) The unfolded protein response and its relevance to connective tissue diseases. *Cell and tissue research*. **339**, 197-211.
- Brown, D. G. and R. F. Burk (1973) Selenium retention in tissues and sperm of rats fed a Torula yeast diet. *The Journal of nutrition*. **103**, 102-8.

- Budiman, M. E., J. L. Bubenik, A. C. Miniard, L. M. Middleton, C. A. Gerber, A. Cash and D. M. Driscoll (2009) Eukaryotic initiation factor 4a3 is a selenium-regulated RNA-binding protein that selectively inhibits selenocysteine incorporation. *Molecular cell*. **35**, 479-89.
- Burk, R. F., D. S. Early, K. E. Hill, I. S. Palmer and M. E. Boeglin (1998) Plasma selenium in patients with cirrhosis. *Hepatology*. **27**, 794-8.
- Burk, R. F. and K. E. Hill (2005) Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annual review of nutrition*. **25**, 215-35.
- Burk, R. F. and K. E. Hill (2009) Selenoprotein P-expression, functions, and roles in mammals. *Biochimica et biophysica acta*. **1790**, 1441-7.
- Burk, R. F., K. E. Hill and A. K. Motley (2001) Plasma selenium in specific and non-specific forms. *Biofactors*. **14**, 107-14.
- Burk, R. F., K. E. Hill, G. E. Olson, E. J. Weeber, A. K. Motley, V. P. Winfrey and L. M. Austin (2007) Deletion of apolipoprotein E receptor-2 in mice lowers brain selenium and causes severe neurological dysfunction and death when a low-selenium diet is fed. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. **27**, 6207-11.
- Burk, R. F., K. E. Hill, R. Read and T. Bellew (1991) Response of rat selenoprotein P to selenium administration and fate of its selenium. *The American journal of physiology*. **261**, E26-30.
- Carey, E. J., V. Balan, W. K. Kremers and J. E. Hay (2003) Osteopenia and osteoporosis in patients with end-stage liver disease caused by hepatitis C and alcoholic liver disease: not just a cholestatic problem. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. **9**, 1166-73.
- Carlson, B. A., X. M. Xu, G. V. Kryukov, M. Rao, M. J. Berry, V. N. Gladyshev and D. L. Hatfield (2004) Identification and characterization of phosphoseryl-tRNA[Ser]Sec kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**, 12848-53.
- Chavatte, L., B. A. Brown and D. M. Driscoll (2005) Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes. *Nature structural & molecular biology*. **12**, 408-16.
- Chiu-Ugalde, J., F. Theilig, T. Behrends, J. Drebes, C. Sieland, P. Subbarayal, J. Kohrle, A. Hammes, L. Schomburg and U. Schweizer (2010) Mutation of megalin leads to urinary loss of selenoprotein P and selenium deficiency in serum, liver, kidneys and brain. *The Biochemical journal*. **431**, 103-11.
- Cole, R. N., I. Ruczinski, K. Schulze, P. Christian, S. Herbrich, L. Wu, L. R. Devine, R. N. O'Meally, S. Shrestha, T. N. Boronina, J. D. Yager, J. Groopman and K. P. West, Jr. (2013) The plasma proteome identifies expected and novel proteins correlated with micronutrient status in undernourished Nepalese children. *The Journal of nutrition*. **143**, 1540-8.
- Combs, G. F., Jr. (2001) Selenium in global food systems. *The British journal of nutrition*. **85**, 517-47.
- Cone, J. E., R. M. Del Rio, J. N. Davis and T. C. Stadtman (1976) Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase: identification of selenocysteine as the organoselenium moiety. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **73**, 2659-63.
- Conrad, M. and U. Schweizer (2010) Unveiling the molecular mechanisms behind selenium-related diseases through knockout mouse studies. *Antioxidants & redox signaling*. **12**, 851-65.
- D'Arcangelo, G., G. G. Miao, S. C. Chen, H. D. Soares, J. I. Morgan and T. Curran (1995) A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature*. **374**, 719-23.
- Datta, H. K., W. F. Ng, J. A. Walker, S. P. Tuck and S. S. Varanasi (2008) The cell biology of bone metabolism. *Journal of clinical pathology*. **61**, 577-87.
- Davis, C. D., P. A. Tsuji and J. A. Milner (2012) Selenoproteins and cancer prevention. *Annual review of nutrition*. **32**, 73-95.
- Dequeker, J., J. Aerssens and F. P. Luyten (2003) Osteoarthritis and osteoporosis: clinical and research evidence of inverse relationship. *Aging clinical and experimental research*. **15**, 426-39.

- Derumeaux, H., P. Valeix, K. Castetbon, M. Bensimon, M. C. Boutron-Ruault, J. Arnaud and S. Hercberg (2003) Association of selenium with thyroid volume and echostructure in 35- to 60-year-old French adults. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. **148**, 309-15.
- Di Cosmo, C., N. McLellan, X. H. Liao, K. K. Khanna, R. E. Weiss, L. Papp and S. Refetoff (2009) Clinical and molecular characterization of a novel selenocysteine insertion sequence-binding protein 2 (SBP2) gene mutation (R128X). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. **94**, 4003-9.
- Diwadkar-Navsariwala, V. and A. M. Diamond (2004) The link between selenium and chemoprevention: a case for selenoproteins. *The Journal of nutrition*. **134**, 2899-902.
- Donovan, J. and P. R. Copeland (2009) Evolutionary history of selenocysteine incorporation from the perspective of SECIS binding proteins. *BMC evolutionary biology*. **9**, 229.
- Downey, C. M., C. R. Horton, B. A. Carlson, T. E. Parsons, D. L. Hatfield, B. Hallgrímsson and F. R. Jirik (2009) Osteo-chondroprogenitor-specific deletion of the selenocysteine tRNA gene, *Trsp*, leads to chondronecrosis and abnormal skeletal development: a putative model for Kashin-Beck disease. *PLoS genetics*. **5**, e1000616.
- Dreher, I., N. Schütze, A. Baur, K. Hesse, D. Schneider, J. Kohrle and F. Jakob (1998) Selenoproteins are expressed in fetal human osteoblast-like cells. *Biochemical and biophysical research communications*. **245**, 101-7.
- Dumitrescu, A. M., C. Di Cosmo, X. H. Liao, R. E. Weiss and S. Refetoff (2010) The syndrome of inherited partial SBP2 deficiency in humans. *Antioxidants & redox signaling*. **12**, 905-20.
- Dumitrescu, A. M., X. H. Liao, M. S. Abdullah, J. Lado-Abeal, F. A. Majed, L. C. Moeller, G. Boran, L. Schomburg, R. E. Weiss and S. Refetoff (2005) Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism. *Nature genetics*. **37**, 1247-52.
- Dumitrescu, A. M. and S. Refetoff (2011) Inherited defects of thyroid hormone metabolism. *Annales d'endocrinologie*. **72**, 95-8.
- Ebert, R., M. Ulmer, S. Zeck, J. Meissner-Weigl, D. Schneider, H. Stopper, N. Schupp, M. Kassem and F. Jakob (2006) Selenium supplementation restores the antioxidative capacity and prevents cell damage in bone marrow stromal cells in vitro. *Stem Cells*. **24**, 1226-35.
- Evans, D. M., G. Zhu, V. Dy, A. C. Heath, P. A. Madden, J. P. Kemp, G. McMahon, B. St Pourcain, N. J. Timpson, J. Golding, D. A. Lawlor, C. Steer, G. W. Montgomery, N. G. Martin, G. D. Smith and J. B. Whitfield (2013) Genome-wide association study identifies loci affecting blood copper, selenium and zinc. *Human molecular genetics*. **22**, 3998-4006.
- Fagegaltier, D., N. Hubert, P. Carbon and A. Krol (2000a) The selenocysteine insertion sequence binding protein SBP is different from the Y-box protein dbpB. *Biochimie*. **82**, 117-22.
- Fagegaltier, D., N. Hubert, K. Yamada, T. Mizutani, P. Carbon and A. Krol (2000b) Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation. *The EMBO journal*. **19**, 4796-805.
- Fan, A. M., S. A. Book, R. R. Neutra and D. M. Epstein (1988) Selenium and human health implications in California's San Joaquin Valley. *Journal of toxicology and environmental health*. **23**, 539-59.
- Fang, W., M. L. Goldberg, N. M. Pohl, X. Bi, C. Tong, B. Xiong, T. J. Koh, A. M. Diamond and W. Yang (2010) Functional and physical interaction between the selenium-binding protein 1 (SBP1) and the glutathione peroxidase 1 selenoprotein. *Carcinogenesis*. **31**, 1360-6.
- Flohe, L. (2009) The labour pains of biochemical selenology: the history of selenoprotein biosynthesis. *Biochimica et biophysica acta*. **1790**, 1389-403.
- Flohe, L. and W. A. Gunzler (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods in enzymology*. **105**, 114-21.
- Flohe, L., W. A. Gunzler and H. H. Schock (1973) Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS letters*. **32**, 132-4.
- Fukumoto, S. and T. J. Martin (2009) Bone as an endocrine organ. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. **20**, 230-6.

- Gaier, E. D., A. Kleppinger, M. Ralle, R. E. Mains, A. M. Kenny and B. A. Eipper (2012) High serum Cu and Cu/Zn ratios correlate with impairments in bone density, physical performance and overall health in a population of elderly men with frailty characteristics. *Experimental gerontology*. **47**, 491-6.
- Garnero, P., E. Sornay-Rendu, B. Claustrat and P. D. Delmas (2000) Biochemical markers of bone turnover, endogenous hormones and the risk of fractures in postmenopausal women: the OFELY study. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. **15**, 1526-36.
- Gobler, C. J., A. V. Lobanov, Y. Z. Tang, A. A. Turanov, Y. Zhang, M. Doblin, G. T. Taylor, S. A. Sanudo-Wilhelmy, I. V. Grigoriev and V. N. Gladyshev (2013) The central role of selenium in the biochemistry and ecology of the harmful pelagophyte, *Aureococcus anophagefferens*. *The ISME journal*. **7**, 1333-43.
- Goldhaber, S. B. (2003) Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*. **38**, 232-42.
- Gouveia, C. H., M. A. Christoffolete, C. R. Zaitune, J. M. Dora, J. W. Harney, A. L. Maia and A. C. Bianco (2005) Type 2 iodothyronine selenodeiodinase is expressed throughout the mouse skeleton and in the MC3T3-E1 mouse osteoblastic cell line during differentiation. *Endocrinology*. **146**, 195-200.
- Gromer, S., J. K. Eubel, B. L. Lee and J. Jacob (2005) Human selenoproteins at a glance. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. **62**, 2414-37.
- Grosch, M., J. Fuchs, M. Boesl, A. Winterpacht and A. Tagariello (2013) Selenoprotein M is expressed during bone development. *EXCLI Journal*, 967-979.
- Grundner-Culemann, E., G. W. Martin, 3rd, J. W. Harney and M. J. Berry (1999) Two distinct SECIS structures capable of directing selenocysteine incorporation in eukaryotes. *RNA*. **5**, 625-35.
- Guo, X., H. Zuo, C. X. Cao, Y. Zhang, D. Geng, Z. T. Zhang, Y. G. Zhang, K. von der Mark and H. von der Mark (2006) Abnormal expression of Col X, PTHrP, TGF-beta, bFGF, and VEGF in cartilage with Kashin-Beck disease. *Journal of bone and mineral metabolism*. **24**, 319-28.
- Hadjidakis, D. J. and Androulakis, II (2006) Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1092**, 385-96.
- Hamburg, S. M., D. A. Piers, A. P. van den Berg, M. J. Slooff and E. B. Haagsma (2000) Bone mineral density in the long term after liver transplantation. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. **11**, 600-6.
- Hasegawa, T., M. Mihara, T. Okuno, K. Nakamuro and Y. Sayato (1995) Chemical form of selenium-containing metabolite in small intestine and liver of mice following orally administered selenocystine. *Archives of toxicology*. **69**, 312-7.
- Hatfield, D. and A. Diamond (1993) UGA: a split personality in the universal genetic code. *Trends in genetics : TIG*. **9**, 69-70.
- Hatfield, D. L., M. J. Berry and V. N. Gladyshev (2011) *Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health*, Springer Verlag
- Hay, J. E., K. D. Lindor, R. H. Wiesner, E. R. Dickson, R. A. Krom and N. F. LaRusso (1991) The metabolic bone disease of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology*. **14**, 257-61.
- Henrotin, Y., B. Kurz and T. Aigner (2005) Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. **13**, 643-54.
- Hernandez, A., M. E. Martinez, X. H. Liao, J. Van Sande, S. Refetoff, V. A. Galton and D. L. St Germain (2007) Type 3 deiodinase deficiency results in functional abnormalities at multiple levels of the thyroid axis. *Endocrinology*. **148**, 5680-7.
- Herz, J. and H. H. Bock (2002) Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annual review of biochemistry*. **71**, 405-34.
- Herz, J., M. Gotthardt and T. E. Willnow (2000) Cellular signalling by lipoprotein receptors. *Current opinion in lipidology*. **11**, 161-6.

- Hill, K. E., J. Zhou, W. J. McMahan, A. K. Motley, J. F. Atkins, R. F. Gesteland and R. F. Burk (2003) Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse. *The Journal of biological chemistry*. **278**, 13640-6.
- Hoefig, C. S., K. Renko, J. Kohrle, M. Birringer and L. Schomburg (2011) Comparison of different selenocompounds with respect to nutritional value vs. toxicity using liver cells in culture. *The Journal of nutritional biochemistry*. **22**, 945-55.
- Hoeg, A., A. Gogakos, E. Murphy, S. Mueller, J. Kohrle, D. M. Reid, C. C. Gluer, D. Felsenberg, C. Roux, R. Eastell, L. Schomburg and G. R. Williams (2012) Bone turnover and bone mineral density are independently related to selenium status in healthy euthyroid postmenopausal women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. **97**, 4061-70.
- Hollenbach, B., N. G. Morgenthaler, J. Struck, C. Alonso, A. Bergmann, J. Kohrle and L. Schomburg (2008) New assay for the measurement of selenoprotein P as a sepsis biomarker from serum. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements*. **22**, 24-32.
- Huiskes, R., R. Ruimerman, G. H. van Lenthe and J. D. Janssen (2000) Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone. *Nature*. **405**, 704-6.
- Hurst, R., C. N. Armah, J. R. Dainty, D. J. Hart, B. Teucher, A. J. Goldson, M. R. Broadley, A. K. Motley and S. J. Fairweather-Tait (2010) Establishing optimal selenium status: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *The American journal of clinical nutrition*. **91**, 923-31.
- Jakob, F., K. Becker, E. Paar, R. Ebert-Duemig and N. Schutze (2002) Expression and regulation of thioredoxin reductases and other selenoproteins in bone. *Methods in enzymology*. **347**, 168-79.
- Johansson, L., G. Gafvelin and E. S. Arner (2005) Selenocysteine in proteins-properties and biotechnological use. *Biochimica et biophysica acta*. **1726**, 1-13.
- Karsenty, G. (2011) Bone endocrine regulation of energy metabolism and male reproduction. *Comptes rendus biologiques*. **334**, 720-4.
- Kasaikina, M. V., D. E. Fomenko, V. M. Labunskyy, S. A. Lachke, W. Qiu, J. A. Moncaster, J. Zhang, M. W. Wojnarowicz, Jr., S. K. Natarajan, M. Malinouski, U. Schweizer, P. A. Tsuji, B. A. Carlson, R. L. Maas, M. F. Lou, L. E. Goldstein, D. L. Hatfield and V. N. Gladyshev (2011) Roles of the 15-kDa selenoprotein (Sep15) in redox homeostasis and cataract development revealed by the analysis of Sep 15 knockout mice. *The Journal of biological chemistry*. **286**, 33203-12.
- Kohrle, J. (1999) The trace element selenium and the thyroid gland. *Biochimie*. **81**, 527-33.
- Krol, M. B., J. Gromadzinska and W. Wasowicz (2012) SeP, ApoER2 and megalin as necessary factors to maintain Se homeostasis in mammals. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements*. **26**, 262-6.
- Kryukov, G. V., S. Castellano, S. V. Novoselov, A. V. Lobanov, O. Zehtab, R. Guigo and V. N. Gladyshev (2003) Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*. **300**, 1439-43.
- Kurokawa, S., K. E. Hill, W. H. McDonald and R. F. Burk (2012) Long isoform mouse selenoprotein P (Sepp1) supplies rat myoblast L8 cells with selenium via endocytosis mediated by heparin binding properties and apolipoprotein E receptor-2 (ApoER2). *The Journal of biological chemistry*. **287**, 28717-26.
- Kurokawa, S., M. Takehashi, H. Tanaka, H. Mihara, T. Kurihara, S. Tanaka, K. Hill, R. Burk and N. Esaki (2011) Mammalian selenocysteine lyase is involved in selenoprotein biosynthesis. *Journal of nutritional science and vitaminology*. **57**, 298-305.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-5.
- Lean, J. M., C. J. Jagger, B. Kirstein, K. Fuller and T. J. Chambers (2005) Hydrogen peroxide is essential for estrogen-deficiency bone loss and osteoclast formation. *Endocrinology*. **146**, 728-35.

- Lei, X. G., J. K. Evenson, K. M. Thompson and R. A. Sunde (1995) Glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase are differentially regulated in rats by dietary selenium. *The Journal of nutrition*. **125**, 1438-46.
- Leslie, W. D., C. N. Bernstein and M. S. Leboff (2003) AGA technical review on osteoporosis in hepatic disorders. *Gastroenterology*. **125**, 941-66.
- Lewerin, C., H. Nilsson-Ehle, S. Jacobsson, H. Johansson, V. Sundh, M. K. Karlsson, O. Ljunggren, M. Lorentzon, J. A. Kanis, U. H. Lerner, S. R. Cummings, C. Ohlsson and D. Mellstrom (2013) Low holotranscobalamin and cobalamins predict incident fractures in elderly men: the MrOS Sweden. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*.
- Li, Q., M. Liu, J. Hou, C. Jiang, S. Li and T. Wang (2013) The prevalence of Keshan disease in China. *International journal of cardiology*. **168**, 1121-6.
- Loeser, R. F. (2006) Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide. *Arthritis and rheumatism*. **54**, 1357-60.
- Lopez-Larramona, G., A. J. Lucendo, S. Gonzalez-Castillo and J. M. Tenias (2011) Hepatic osteodystrophy: An important matter for consideration in chronic liver disease. *World journal of hepatology*. **3**, 300-7.
- Loreille, O. M., T. M. Diegoli, J. A. Irwin, M. D. Coble and T. J. Parsons (2007) High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic science international. Genetics*. **1**, 191-5.
- Low, S. C., E. Grundner-Culemann, J. W. Harney and M. J. Berry (2000) SECIS-SBP2 interactions dictate selenocysteine incorporation efficiency and selenoprotein hierarchy. *The EMBO journal*. **19**, 6882-90.
- Lowe, N. M., W. D. Fraser and M. J. Jackson (2002) Is there a potential therapeutic value of copper and zinc for osteoporosis? *The Proceedings of the Nutrition Society*. **61**, 181-5.
- Lüllmann-Rauch, R. (2006) Knochen. *Taschenlehrbuch Histologie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Manolagas, S. C. (2010) From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocrine reviews*. **31**, 266-300.
- Mariotti, M., A. V. Lobanov, R. Guigo and V. N. Gladyshev (2013) SECISearch3 and Seblastian: new tools for prediction of SECIS elements and selenoproteins. *Nucleic acids research*. **41**, e149.
- Martin, T. J. (2013) Historically significant events in the discovery of RANK/RANKL/OPG. *World journal of orthopedics*. **4**, 186-197.
- Matsumura, S., Y. Ikawa and T. Inoue (2003) Biochemical characterization of the kink-turn RNA motif. *Nucleic acids research*. **31**, 5544-51.
- Mayahara, K., A. Yamaguchi, H. Takenouchi, T. Kariya, H. Taguchi and N. Shimizu (2012) Osteoblasts stimulate osteoclastogenesis via RANKL expression more strongly than periodontal ligament cells do in response to PGE(2). *Archives of oral biology*. **57**, 1377-84.
- McCoy, K. E. and P. H. Weswig (1969) Some selenium responses in the rat not related to vitamin E. *The Journal of nutrition*. **98**, 383-9.
- Mehdi, Y., J. L. Hornick, L. Istasse and I. Dufrasne (2013) Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules*. **18**, 3292-311.
- Meplan, C., L. K. Crosley, F. Nicol, G. J. Beckett, A. F. Howie, K. E. Hill, G. Horgan, J. C. Mathers, J. R. Arthur and J. E. Hesketh (2007) Genetic polymorphisms in the human selenoprotein P gene determine the response of selenoprotein markers to selenium supplementation in a gender-specific manner (the SELGEN study). *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. **21**, 3063-74.
- Meyer, H. A., T. Endermann, C. Stephan, M. Stoedter, T. Behrends, I. Wolff, K. Jung and L. Schomburg (2012) Selenoprotein P status correlates to cancer-specific mortality in renal cancer patients. *PloS one*. **7**, e46644.
- Michaelis, M., O. Gralla, T. Behrends, M. Scharpf, T. Endermann, E. Rijntjes, N. Pietschmann, B. Hollenbach and L. Schomburg (2013) Selenoprotein P in seminal fluid is a novel biomarker of sperm quality. *Biochemical and biophysical research communications*.

- Milne, D. B. and F. H. Nielsen (1996) Effects of a diet low in copper on copper-status indicators in postmenopausal women. *The American journal of clinical nutrition*. **63**, 358-64.
- Miniard, A. C., L. M. Middleton, M. E. Budiman, C. A. Gerber and D. M. Driscoll (2010) Nucleolin binds to a subset of selenoprotein mRNAs and regulates their expression. *Nucleic acids research*. **38**, 4807-20.
- Minina, E., H. M. Wenzel, C. Kreschel, S. Karp, W. Gaffield, A. P. McMahon and A. Vortkamp (2001) BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development*. **128**, 4523-34.
- Mittag, J., T. Behrends, K. Nordstrom, J. Anselmo, B. Vennstrom and L. Schomburg (2012) Serum copper as a novel biomarker for resistance to thyroid hormone. *The Biochemical journal*. **443**, 103-9.
- Moon, H. J., W. K. Ko, S. W. Han, D. S. Kim, Y. S. Hwang, H. K. Park and I. K. Kwon (2012) Antioxidants, like coenzyme Q10, selenite, and curcumin, inhibited osteoclast differentiation by suppressing reactive oxygen species generation. *Biochemical and biophysical research communications*. **418**, 247-53.
- Moreno-Reyes, R., D. Egrise, M. Boelaert, S. Goldman and S. Meuris (2006) Iodine deficiency mitigates growth retardation and osteopenia in selenium-deficient rats. *The Journal of nutrition*. **136**, 595-600.
- Moreno-Reyes, R., D. Egrise, J. Neve, J. L. Pasteels and A. Schoutens (2001a) Selenium deficiency-induced growth retardation is associated with an impaired bone metabolism and osteopenia. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. **16**, 1556-63.
- Moreno-Reyes, R., C. Suetens, F. Mathieu, F. Begaux, D. Zhu, M. T. Rivera, M. Boelaert, J. Neve, N. Perlmutter and J. Vanderpas (1998) Kashin-Beck osteoarthropathy in rural Tibet in relation to selenium and iodine status. *The New England journal of medicine*. **339**, 1112-20.
- Moreno-Reyes, R., C. Suetens, F. Mathieu, F. Begaux, D. Zhu, T. Rivera, M. Boelaert, J. Neve, N. Perlmutter and J. Vanderpas (2001b) Kashin-Beck disease and iodine deficiency in Tibet. *International orthopaedics*. **25**, 164-6.
- Moustafa, M. E. and H. A. Antar (2012) A bioinformatics approach to characterize mammalian selenoprotein T. *Biochemical genetics*. **50**, 736-47.
- Mullenbach, G. T., A. Tabrizi, B. D. Irvine, G. I. Bell, J. A. Tainer and R. A. Hallewell (1988) Selenocysteine's mechanism of incorporation and evolution revealed in cDNAs of three glutathione peroxidases. *Protein engineering*. **2**, 239-46.
- Murphy, E., C. C. Gluer, D. M. Reid, D. Felsenberg, C. Roux, R. Eastell and G. R. Williams (2010) Thyroid function within the upper normal range is associated with reduced bone mineral density and an increased risk of nonvertebral fractures in healthy euthyroid postmenopausal women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. **95**, 3173-81.
- Murphy, E. and G. R. Williams (2004) The thyroid and the skeleton. *Clinical endocrinology*. **61**, 285-98.
- Mutlu, M., M. Argun, E. Kilic, R. Saraymen and S. Yazar (2007) Magnesium, zinc and copper status in osteoporotic, osteopenic and normal post-menopausal women. *The Journal of international medical research*. **35**, 692-5.
- Nakayama, A., K. E. Hill, L. M. Austin, A. K. Motley and R. F. Burk (2007) All regions of mouse brain are dependent on selenoprotein P for maintenance of selenium. *The Journal of nutrition*. **137**, 690-3.
- Naski, M. C. and D. M. Ornitz (1998) FGF signaling in skeletal development. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. **3**, d781-94.
- Nawrot, T. S., J. A. Staessen, H. A. Roels, E. Den Hond, L. Thijs, R. H. Fagard, A. F. Dominiczak and H. A. Struijker-Boudier (2007) Blood pressure and blood selenium: a cross-sectional and longitudinal population study. *European heart journal*. **28**, 628-33.
- Nelson, A. A., O. G. Fitzhugh and H. O. Calvery (1943) Liver Tumors Following Cirrhosis Caused by Selenium in Rats *Cancer research*. **3**, 230-236.

- Nielsen, F. H., H. C. Lukaski, L. K. Johnson and Z. K. Roughead (2011) Reported zinc, but not copper, intakes influence whole-body bone density, mineral content and T score responses to zinc and copper supplementation in healthy postmenopausal women. *The British journal of nutrition*. **106**, 1872-9.
- O'Shea, P. J., C. B. Harvey, H. Suzuki, M. Kaneshige, K. Kaneshige, S. Y. Cheng and G. R. Williams (2003) A thyrotoxic skeletal phenotype of advanced bone formation in mice with resistance to thyroid hormone. *Mol Endocrinol*. **17**, 1410-24.
- O'Toole, D. and M. F. Raisbeck (1995) Pathology of experimentally induced chronic selenosis (alkali disease) in yearling cattle. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* **7**, 364-73.
- Odabasi, E., M. Turan, A. Aydin, C. Akay and M. Kutlu (2008) Magnesium, zinc, copper, manganese, and selenium levels in postmenopausal women with osteoporosis. Can magnesium play a key role in osteoporosis? *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*. **37**, 564-7.
- Olson, G. E., V. P. Winfrey, K. E. Hill and R. F. Burk (2008) Megalin mediates selenoprotein P uptake by kidney proximal tubule epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. **283**, 6854-6860.
- Olson, G. E., V. P. Winfrey, S. K. Nagdas, K. E. Hill and R. F. Burk (2007) Apolipoprotein E receptor-2 (ApoER2) mediates selenium uptake from selenoprotein P by the mouse testis. *The Journal of biological chemistry*. **282**, 12290-7.
- Opsahl, W., H. Zeronian, M. Ellison, D. Lewis, R. B. Rucker and R. S. Riggins (1982) Role of copper in collagen cross-linking and its influence on selected mechanical properties of chick bone and tendon. *The Journal of nutrition*. **112**, 708-16.
- Papp, L. V., J. Lu, A. Holmgren and K. K. Khanna (2007) From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxidants & redox signaling*. **9**, 775-806.
- Park, Y. H., Y. H. Jeon and I. Y. Kim (2012) Selenoprotein W promotes cell cycle recovery from G2 arrest through the activation of CDC25B. *Biochimica et biophysica acta*. **1823**, 2217-26.
- Pelletier, J. P., J. Martel-Pelletier and S. B. Abramson (2001) Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis and rheumatism*. **44**, 1237-47.
- Pena, M. M., J. Lee and D. J. Thiele (1999) A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *The Journal of nutrition*. **129**, 1251-60.
- Pietschmann, N., E. Rijntjes, A. Hoeg, Stoedter M, Schweizer U, Seemann P and S. L (submitted) Selenoprotein P is the essential selenium transporter for bone. *Metallomics : integrated biometal science*.
- Pinsent, J. (1954) The need for selenite and molybdate in the formation of formic dehydrogenase by members of the coli-aerogenes group of bacteria. *The Biochemical journal*. **57**, 10-6.
- Pitts, M. W., M. A. Reeves, A. C. Hashimoto, A. Ogawa, P. Kremer, L. A. Seale and M. J. Berry (2013) Deletion of selenoprotein M leads to obesity without cognitive deficits. *The Journal of biological chemistry*. **288**, 26121-34.
- Ramskold, D., E. T. Wang, C. B. Burge and R. Sandberg (2009) An abundance of ubiquitously expressed genes revealed by tissue transcriptome sequence data. *PLoS computational biology*. **5**, e1000598.
- Rasmussen, L. B., B. Hollenbach, P. Laurberg, A. Carle, A. Hog, T. Jorgensen, P. Vejbjerg, L. Ovesen and L. Schomburg (2009) Serum selenium and selenoprotein P status in adult Danes - 8-year followup. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements*. **23**, 265-71.
- Rayman, M. P. (2008) Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. *The British journal of nutrition*. **100**, 254-68.
- Rayman, M. P. (2012) Selenium and human health. *Lancet*. **379**, 1256-68.
- Reeves, M. A. and P. R. Hoffmann (2009) The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. **66**, 2457-78.
- Reginster, J. Y. and N. Burlet (2006) Osteoporosis: a still increasing prevalence. *Bone*. **38**, S4-9.
- Renko, K., M. Werner, I. Renner-Muller, T. G. Cooper, C. H. Yeung, B. Hollenbach, M. Scharpf, J. Kohrle, L. Schomburg and U. Schweizer (2008) Hepatic selenoprotein P (SePP) expression

- restores selenium transport and prevents infertility and motor-incoordination in Sepp-knockout mice. *The Biochemical journal*. **409**, 741-9.
- Riese, C., M. Michaelis, B. Mentrup, F. Gotz, J. Kohrle, U. Schweizer and L. Schomburg (2006) Selenium-dependent pre- and posttranscriptional mechanisms are responsible for sexual dimorphic expression of selenoproteins in murine tissues. *Endocrinology*. **147**, 5883-92.
- Robinson, H. M., Jr. and S. N. Yaffe (1956) Selenium sulfide in treatment of pityriasis versicolor. *Journal of the American Medical Association*. **162**, 113-4.
- Romagne, F., D. Santesmasses, L. White, G. K. Sarangi, M. Mariotti, R. Hubler, A. Weihmann, G. Parra, V. N. Gladyshev, R. Guigo and S. Castellano (2014) SelenoDB 2.0: annotation of selenoprotein genes in animals and their genetic diversity in humans. *Nucleic acids research*. **42**, D437-43.
- Rosenfeld, I. and O. A. Beath (1945) The elimination and distribution of selenium in the tissues in experimental selenium poisoning. *The Journal of nutrition*. **30**, 443-9.
- Rotruck, J. T., A. L. Pope, H. E. Ganther, A. B. Swanson, D. G. Hafeman and W. G. Hoekstra (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*. **179**, 588-90.
- Saito, Y., N. Sato, M. Hirashima, G. Takebe, S. Nagasawa and K. Takahashi (2004) Domain structure of bi-functional selenoprotein P. *The Biochemical journal*. **381**, 841-6.
- Samelson, E. J. and M. T. Hannan (2006) Epidemiology of osteoporosis. *Current rheumatology reports*. **8**, 76-83.
- Sandstead, H. H. (1985) Requirement of zinc in human subjects. *Journal of the American College of Nutrition*. **4**, 73-82.
- Schäffler, A. and S. Schmidt (2003) *Medizin und Gesundheit*, Naumann & Göbel Köln
- Scharpf, M., U. Schweizer, T. Arzberger, W. Roggendorf, L. Schomburg and J. Kohrle (2007) Neuronal and ependymal expression of selenoprotein P in the human brain. *J Neural Transm*. **114**, 877-84.
- Schauder, P. and G. Ollenschläger (2006). *Ernährungsmedizin: Prävention & Therapie*. Elsevier, U. F. b. (ed.)
- Schmucker, D. L. and E. S. Vesell (1993) Underrepresentation of women in clinical drug trials. *Clinical pharmacology and therapeutics*. **54**, 11-5.
- Schomburg, L. (2007a) Selene, the goddess of the moon: does she shine on men only? *European heart journal*. **28**, 2043-4.
- Schomburg, L. (2007b) Selenium in intensive care (SIC) study: the XX files are still unresolved. *Critical care medicine*. **35**, 995-6; author reply 996-7.
- Schomburg, L. (2011) Treating Hashimoto's thyroiditis with selenium: no risks, just benefits? *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. **21**, 563-4; author reply 564-5.
- Schomburg, L., A. M. Dumitrescu, X. H. Liao, B. Bin-Abbas, J. Hoeflich, J. Kohrle and S. Refetoff (2009) Selenium supplementation fails to correct the selenoprotein synthesis defect in subjects with SBP2 gene mutations. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. **19**, 277-81.
- Schomburg, L., C. Riese, M. Michaelis, E. Griebert, M. O. Klein, R. Sapin, U. Schweizer and J. Kohrle (2006) Synthesis and metabolism of thyroid hormones is preferentially maintained in selenium-deficient transgenic mice. *Endocrinology*. **147**, 1306-13.
- Schomburg, L., C. Riese, K. Renko and U. Schweizer (2007) Effect of age on sexually dimorphic selenoprotein expression in mice. *Biological chemistry*. **388**, 1035-41.
- Schomburg, L. and U. Schweizer (2009) Hierarchical regulation of selenoprotein expression and sex-specific effects of selenium. *Biochimica et biophysica acta*. **1790**, 1453-62.
- Schomburg, L., U. Schweizer, B. Holtmann, L. Flohe, M. Sendtner and J. Kohrle (2003) Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *The Biochemical journal*. **370**, 397-402.
- Schomburg, L., U. Schweizer and J. Kohrle (2004) Selenium and selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, enigmatic. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. **61**, 1988-95.

- Schutze, N., J. Fritsche, R. Ebert-Dumig, D. Schneider, J. Kohrle, R. Andreesen, M. Kreutz and F. Jakob (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**, 329-38.
- Schwarz, K. (1951) A hitherto unrecognized factor against dietary necrotic liver degeneration in American yeast (factor3). *Proc Soc Exp Biol Med*. **78**, 852-6.
- Schwarz, K. and C. M. Foltz (1999) Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. 1951. *Nutrition*. **15**, 255.
- Schweizer, U., M. Michaelis, J. Kohrle and L. Schomburg (2004) Efficient selenium transfer from mother to offspring in selenoprotein-P-deficient mice enables dose-dependent rescue of phenotypes associated with selenium deficiency. *The Biochemical journal*. **378**, 21-6.
- Seeher, S., Y. Mahdi and U. Schweizer (2012) Post-transcriptional control of selenoprotein biosynthesis. *Current protein & peptide science*. **13**, 337-46.
- Seeman, E. (2004) Estrogen, androgen, and the pathogenesis of bone fragility in women and men. *Current osteoporosis reports*. **2**, 90-6.
- Shchedrina, V. A., R. A. Everley, Y. Zhang, S. P. Gygi, D. L. Hatfield and V. N. Gladyshev (2011) Selenoprotein K binds multiprotein complexes and is involved in the regulation of endoplasmic reticulum homeostasis. *The Journal of biological chemistry*. **286**, 42937-48.
- Shen, Q., L. Fan and P. E. Newburger (2006) Nuclease sensitive element binding protein 1 associates with the selenocysteine insertion sequence and functions in mammalian selenoprotein translation. *Journal of cellular physiology*. **207**, 775-83.
- Sheweita, S. A. and K. I. Khoshhal (2007) Calcium metabolism and oxidative stress in bone fractures: role of antioxidants. *Current drug metabolism*. **8**, 519-25.
- Shimada, T., M. Kakitani, Y. Yamazaki, H. Hasegawa, Y. Takeuchi, T. Fujita, S. Fukumoto, K. Tomizuka and T. Yamashita (2004) Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *The Journal of clinical investigation*. **113**, 561-8.
- Sinningen, K., E. Tsourdi, M. Rauner, T. D. Racher, C. Hamann and L. C. Hofbauer (2012) Skeletal and extraskeletal actions of denosumab. *Endocrine*. **42**, 52-62.
- Sokoloff, L. (1987) Kashin-Beck disease. *Rheumatic diseases clinics of North America*. **13**, 101-4.
- Song, Y., C. S. Chung, R. S. Bruno, M. G. Traber, K. H. Brown, J. C. King and E. Ho (2009) Dietary zinc restriction and repletion affects DNA integrity in healthy men. *The American journal of clinical nutrition*. **90**, 321-8.
- Squires, J. E., I. Stoytchev, E. P. Forry and M. J. Berry (2007) SBP2 binding affinity is a major determinant in differential selenoprotein mRNA translation and sensitivity to nonsense-mediated decay. *Molecular and cellular biology*. **27**, 7848-55.
- St Germain, D. L., V. A. Galton and A. Hernandez (2009) Minireview: Defining the roles of the iodothyronine deiodinases: current concepts and challenges. *Endocrinology*. **150**, 1097-107.
- Staines, K. A., A. S. Pollard, I. M. McGonnell, C. Farquharson and A. A. Pitsillides (2013) Cartilage to bone transitions in health and disease. *The Journal of endocrinology*. **219**, R1-R12.
- Steinbeck, M. J., J. K. Kim, M. J. Trudeau, P. V. Hauschka and M. J. Karnovsky (1998) Involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of clonal HD-11EM cells into osteoclast-like cells. *Journal of cellular physiology*. **176**, 574-87.
- Steinbrecher, A., C. Meplan, J. Hesketh, L. Schomburg, T. Endermann, E. Jansen, B. Akesson, S. Rohrmann and J. Linseisen (2010) Effects of selenium status and polymorphisms in selenoprotein genes on prostate cancer risk in a prospective study of European men. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. **19**, 2958-68.
- Stevens, D. A., C. B. Harvey, A. J. Scott, P. J. O'Shea, J. C. Barnard, A. J. Williams, G. Brady, J. Samarut, O. Chassande and G. R. Williams (2003) Thyroid hormone activates fibroblast growth factor receptor-1 in bone. *Mol Endocrinol*. **17**, 1751-66.

- Stoedter, M., K. Renko, A. Hog and L. Schomburg (2010) Selenium controls the sex-specific immune response and selenoprotein expression during the acute-phase response in mice. *The Biochemical journal*. **429**, 43-51.
- Stosnach, H. (2005) Environmental trace-element analysis using a benchtop total reflection X-ray, fluorescence spectrometer. *Anal Sci*. **21**, 873-876.
- Sun, J., Q. Sun and S. Lu (2011) From selenoprotein to endochondral ossification: a novel mechanism with microRNAs potential in bone related diseases? *Medical hypotheses*. **77**, 807-11.
- Sutter, M. E., J. D. Thomas, J. Brown and B. Morgan (2008) Selenium toxicity: a case of selenosis caused by a nutritional supplement. *Annals of internal medicine*. **148**, 970-1.
- Suzuki, K. T., K. Ishiwata and Y. Ogra (1999) Incorporation of selenium into selenoprotein P and extracellular glutathione peroxidase: HPLC-ICPMS data with enriched selenite. *The Analyst*. **124**, 1749-53.
- Suzuki, K. T., K. Kurasaki, S. Ogawa and N. Suzuki (2006) Metabolic transformation of methylseleninic acid through key selenium intermediate selenide. *Toxicology and applied pharmacology*. **215**, 189-97.
- Suzuki, K. T., C. Sasakura and S. Yoneda (1998) Binding sites for the (Hg-Se) complex on selenoprotein P. *Biochimica et biophysica acta*. **1429**, 102-12.
- Taboury, M. F. (1945) Toxicologie DU selenium et de ses composes chez les animaux et les vegetaux. *Bulletin de la Societe de chimie biologique*. **27**, 157-63.
- Takahashi, S. (2013) [Bone metabolic markers for evaluation of bone metastases]. *Clinical calcium*. **23**, 391-400.
- Tapiero, H. and K. D. Tew (2003) Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. **57**, 399-411.
- Tsujimoto, S., T. Ishida, T. Takeda, Y. Ishii, Y. Onomura, K. Tsukimori, S. Takechi, T. Yamaguchi, H. Uchi, S. O. Suzuki, M. Yamamoto, M. Himeno, M. Furue and H. Yamada (2013) Selenium-binding protein 1: its physiological function, dependence on aryl hydrocarbon receptors, and role in wasting syndrome by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochimica et biophysica acta*. **1830**, 3616-24.
- Tujebajeva, R. M., P. R. Copeland, X. M. Xu, B. A. Carlson, J. W. Harney, D. M. Driscoll, D. L. Hatfield and M. J. Berry (2000) Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion. *EMBO reports*. **1**, 158-63.
- Turner, D. C. and T. C. Stadtman (1973) Purification of protein components of the clostridial glycine reductase system and characterization of protein A as a selenoprotein. *Archives of biochemistry and biophysics*. **154**, 366-81.
- Vanderpas, J. B., B. Contempre, N. L. Duale, W. Goossens, N. Bebe, R. Thorpe, K. Ntambue, J. Dumont, C. H. Thilly and A. T. Diplock (1990) Iodine and selenium deficiency associated with cretinism in northern Zaire. *The American journal of clinical nutrition*. **52**, 1087-93.
- Varlamova, E. G. and V. I. Novoselov (2012) [The search of partners of a new mammalian selenium-containing protein V (SeIV) and expression it's mRNA during ontogenesis and spermatogenesis]. *Molekuliarnaia biologija*. **46**, 276-84.
- Vernie, L. N. (1984) Selenium in carcinogenesis. *Biochimica et biophysica acta*. **738**, 203-17.
- Vesalius, A. (1551) *De humani corporis fabrica libri septem*, Julius Paul Fabricius, Nürnberg
- Villette, S., J. A. Kyle, K. M. Brown, K. Pickard, J. S. Milne, F. Nicol, J. R. Arthur and J. E. Hesketh (2002) A novel single nucleotide polymorphism in the 3' untranslated region of human glutathione peroxidase 4 influences lipoxygenase metabolism. *Blood cells, molecules & diseases*. **29**, 174-8.
- Voss, H. (1968) *Grundriß der normalen Histologie und mikroskopischen Anatomie*, VEB Georg Thieme, Leipzig
- Wang C.-T., C. W.-T., HUANG K.-C., Wang R.-T. (1997) Arsenic, Selenium and Zinc in finger and foot bone from blackfoot disease patients. *ASIANALYSIS IV Asian Conference on Analytical Sciences No4*. Sciences, A. (ed.), pp 497-500 Fukuoka, Japon

- Wang, X., E. A. Gillen, M. C. van der Meulen and X. G. Lei (2008) Knockouts of Se-glutathione peroxidase-1 and Cu,Zn superoxide dismutase exert different impacts on femoral mechanical performance of growing mice. *Molecular nutrition & food research*. **52**, 1334-9.
- Waung, J. A., J. H. Bassett and G. R. Williams (2012) Thyroid hormone metabolism in skeletal development and adult bone maintenance. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. **23**, 155-62.
- Weiss Sachdev, S. and R. A. Sunde (2001) Selenium regulation of transcript abundance and translational efficiency of glutathione peroxidase-1 and -4 in rat liver. *The Biochemical journal*. **357**, 851-8.
- Wessjohann, L. A., A. Schneider, M. Abbas and W. Brandt (2007) Selenium in chemistry and biochemistry in comparison to sulfur. *Biological chemistry*. **388**, 997-1006.
- Whanger, P., S. Vendeland, Y. C. Park and Y. Xia (1996) Metabolism of subtoxic levels of selenium in animals and humans. *Annals of clinical and laboratory science*. **26**, 99-113.
- Williams, A. J., H. Robson, M. H. Kester, J. P. van Leeuwen, S. M. Shalet, T. J. Visser and G. R. Williams (2008) Iodothyronine deiodinase enzyme activities in bone. *Bone*. **43**, 126-34.
- Williams, G. R. and J. H. Bassett (2011) Deiodinases: the balance of thyroid hormone: local control of thyroid hormone action: role of type 2 deiodinase. *The Journal of endocrinology*. **209**, 261-72.
- Willnow, T. E. and A. Nykjaer (2010) Cellular uptake of steroid carrier proteins--mechanisms and implications. *Molecular and cellular endocrinology*. **316**, 93-102.
- Wingler, K., M. Bocher, L. Flohe, H. Kollmus and R. Brigelius-Flohe (1999) mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins. *European journal of biochemistry / FEBS*. **259**, 149-57.
- Wolfram, S. (1995) [Mechanisms of intestinal absorption of selenium]. *Med Klin (Munich)*. **90 Suppl 1**, 1-5.
- Xia, Y., K. E. Hill, P. Li, J. Xu, D. Zhou, A. K. Motley, L. Wang, D. W. Byrne and R. F. Burk (2010) Optimization of selenoprotein P and other plasma selenium biomarkers for the assessment of the selenium nutritional requirement: a placebo-controlled, double-blind study of selenomethionine supplementation in selenium-deficient Chinese subjects. *The American journal of clinical nutrition*. **92**, 525-31.
- Xiong, Y. M., X. Y. Mo, X. Z. Zou, R. X. Song, W. Y. Sun, W. Lu, Q. Chen, Y. X. Yu and W. J. Zang (2010) Association study between polymorphisms in selenoprotein genes and susceptibility to Kashin-Beck disease. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. **18**, 817-24.
- Xu, X. M., B. A. Carlson, H. Mix, Y. Zhang, K. Saira, R. S. Glass, M. J. Berry, V. N. Gladyshev and D. L. Hatfield (2007) Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes. *PLoS biology*. **5**, e4.
- Xu, X. M., H. Mix, B. A. Carlson, P. J. Grabowski, V. N. Gladyshev, M. J. Berry and D. L. Hatfield (2005) Evidence for direct roles of two additional factors, SECp43 and soluble liver antigen, in the selenoprotein synthesis machinery. *The Journal of biological chemistry*. **280**, 41568-75.
- Yan, J., Y. Zheng, Z. Min, Q. Ning and S. Lu (2013) Selenium effect on selenoprotein transcriptome in chondrocytes. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*. **26**, 285-96.
- Yang, G. Q., K. Y. Ge, J. S. Chen and X. S. Chen (1988) Selenium-related endemic diseases and the daily selenium requirement of humans. *World review of nutrition and dietetics*. **55**, 98-152.
- Yang, W. and A. M. Diamond (2013) Selenium-binding protein 1 as a tumor suppressor and a prognostic indicator of clinical outcome. *Biomarker research*. **1**, 15.
- Zelzer, E., W. McLean, Y. S. Ng, N. Fukai, A. M. Reginato, S. Lovejoy, P. A. D'Amore and B. R. Olsen (2002) Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development*. **129**, 1893-904.
- Zeng, H., J. J. Cao and G. F. Combs, Jr. (2013) Selenium in bone health: roles in antioxidant protection and cell proliferation. *Nutrients*. **5**, 97-110.

- Zhong, L. and A. Holmgren (2000) Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations. *The Journal of biological chemistry*. **275**, 18121-8.
- Zinoni, F., A. Birkmann, T. C. Stadtman and A. Bock (1986) Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine-containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogenlyase-linked) from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **83**, 4650-4.
- Zou, K., G. Liu, T. Wu and L. Du (2009) Selenium for preventing Kashin-Beck osteoarthropathy in children: a meta-analysis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. **17**, 144-51.

7 Anhang

Tab. 7.1: Auflistung aller verwendeten qRT-PCR- Primer.

Gene	Forward Primer	Reverse Primer	Product	UniGene-ID
m18SrRNA	ttgacggaagggcaccaccag	gcaccaccaccacggaatcg	130 bp	NR_003278
mHprt	cctaagatgagcgcaagtgaa	ccacaggactagaacacctgctaa	86 bp	NM_013556
mGpx1	atcagttcgacaccaggag	cattccgcaggaaggtaaag	159 bp	NM_008160
mGpx2	tcactctgaggaacaactaccc	gatctcctcgttctgacagttc	135 bp	NM_030677
mGpx3	aaacaggagccaggcgagaact	cccgttcacatctcctttcctaaa	111 bp	NM_001083929
mGpx4	atgccatcaaatggaactttac	gtgtaggggcacacactgtga	147 bp	NM_001037741
mDio1	ccagttactctggtttgtcctg	gaggcaaagtcatctacgagtc	231 bp	NM_007860
mDio2	ttctcctagatgcctacaaac	ttctccgaggcataattgttac	107 bp	NM_010050
mDio3	ctccaaagaaagtc aaagggtg	caaaaacgtacaaaagggagtc	122 bp	NM_172119
mTxnrd1	caaatgtgacaagaaagtgctg	agtcattgctcactgtgtcttc	197 bp	NM_001042523
mTxnrd2	gcaaattgcatctttgtgtcac	cttctccagattcaaagtcctg	214 bp	NM_013711
mTxnrd3	cagttggagaaaggtttaccag	tcccaatagcataaacatgag	230 bp	NM_001178058
mSephs2	tagcttgtgccaatgtgctc	taatccacgggttgaccact	207 bp	NM_009266
mSepp	gttgaagaagccattaagatcg	attctctgaaggcttactgctg	204 bp	NM_009155
mSelr	aggttttccagaatcacttgcg	tttagggacgaactcagtgag	290 bp	NM_013759
mSepn	tgtaagcatgttccatccac	ctgaagtcacggatgtgtgtag	226 bp	NM_029100
mSep15	atggtgcctaactaacactc	cagacgccgctgaaacg	227 bp	NM_053102
mSelw	cagctcaaggagaagctagaac	ggaacttgctctctgtatccac	160 bp	NM_009156
mSelh	ggtcattgagcattgtacgag	tctcaattctcaaccacctc	248 bp	NM_001033166
mSeli	ctttgaactggttactgcttcc	tttggttctcaatgaaaaag	199 bp	NM_027652
mSelk	gcctgactgatacgcagttc	atggcttgaaaagccagac	252 bp	NM_019979
mSelm	atgacagttgaatcgctaaag	gagtgggattcgtctagttc	151 bp	NM_053267
mSelo	aacactgacaacatgagcattg	ggaactcagtgcaactcctc	238 bp	NM_027905
mSelt	ggcttaataattgttgcaaag	tatctcaaatgcacctgtgac	162 bp	NM_001040396
mSelv	gttccactaaggagatcccatc	ctttctcttggatggatcag	234 bp	NM_175033
mSels	ctaaatgcccaagttgaaaaac	ttggggatgacagatgaagtag	176 bp	NM_024439
mSbp2	accgaagcttcacagtaaacag	cactgctccaactgagaacac	184 bp	NM_029279
mSebp1	caaatgacagatgggctgatac	gaagtaaaggaagcggatc	246 bp	NM_009150
mFabp1	aaactcaccatcacctatggac	tagccttgctaaattctcttc	249 bp	NM_017399
mEif4a3	ggtttcaaggagcagatctatg	aaatttccattcctctcttcc	198 bp	NM_138669
mNcl	gttcctatgaaagccaagagtg	tggattaaggtttccaatgaac	261 bp	NM_010880
mSecp43	accagaactactatgccagtg	attattctaggcctctgccttc	297 bp	NM_027925
mPstk	catgtttgaagaggaatggtga	tccaatgcagtaagcaacaac	190 bp	NM_001039534
mScly	ggaggtggacaagagtgga	cggctgttcaaatggattct	188 bp	NM_016717
mLrp1	cggccatggactcagttat	gtccagcagagtgacacagg	266 bp	NM_008512
mMegaln	ccttttactgtcctagctcac	ttcacaggtcttgatcattg	214 bp	NM_001081088
mApoer2	gtcggatgagcctcagaaag	caggtggcattcacactta	230 bp	NM_001080926

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Die Bedeutung von Se im Wandel der Zeit.	3
Abb. 1.2: Vereinfachte Darstellung des Se-Stoffwechsels.	7
Abb. 1.3: Inkorporation von Se und die Selenoproteinbiosynthese.	11
Abb. 1.4: Schematische Darstellung der <i>SePP</i> -mRNA-Struktur.....	16
Abb. 1.5: <i>SePP</i> und seine Rezeptoren.....	18
Abb. 1.6: Die <i>Sepp</i> -KO-Maus.....	19
Abb. 1.7: Das dynamische menschliche Skelett.....	20
Abb. 1.8: Schematischer Aufbau eines Knochens.....	21
Abb. 1.9: Knochenentwicklung am Beispiel eines Röhrenknochens.	23
Abb. 1.10: Längenwachstum von Knochen in der Wachstumsfuge.....	24
Abb. 1.11: Remodellierung von Knochengewebe (<i>turnover</i>).	25
Abb. 1.12: Einfluss von Se auf die Knochengesundheit.	30
Abb. 3.1: Versuchstiergruppen und experimentelles Design.	40
Abb. 3.2: Dekalzifizierung muriner Knochen.....	41
Abb. 3.3: Die Total-Reflektions-Röntgenfluoreszenz-Analytik (TRFA).	58
Abb. 3.4: Mikroradiographische Untersuchung der Knochenmineralisierung.	60
Abb. 4.1: HE-Färbung der Knochen von männlichen <i>Sepp</i> -Mäusen (P35-40).	65
Abb. 4.2: Alcian blau-Färbung der Knochen von <i>Sepp</i> ^{+/+} - und <i>Sepp</i> ^{-/-} -Mäusen.....	66
Abb. 4.3: Spurenelementkonzentrationen in Sera und Knochen von <i>Sepp</i> -Mäusen.	68
Abb. 4.4: Der Se-Gehalt in der anorganischen und organischen Knochenmatrix.....	69
Abb. 4.5: Expression von <i>Sepp</i> in murinen Organen.....	73
Abb. 4.6: <i>SePP</i> als hepatischer Se-Transporter für den Knochen.....	74
Abb. 4.7: Enzymaktivitäten von GPx, GPx4 und TrxR im Knochen der <i>Sepp</i> -Mäuse.	76
Abb. 4.8: Detektion des intrazellulären Se-bindenden Proteins <i>Sebp1</i> in murinen Organen.	79

Abb. 4.9: Untersuchung der Expression der Sepp-Rezeptoren im Knochen.....	81
Abb. 4.10: <i>In vitro</i> Expression von Sepp, Sebp1 und Apoer2.....	82
Abb. 4.11: <i>In vitro</i> Assay zur spezifischen SePP-Apoer2 Interaktion.	83
Abb. 4.12: Geschlechterstudie zur Mineralisierung in <i>Sepp</i> ^{+/+} - und <i>Sepp</i> ^{+/-} -Mäusen.	85
Abb. 4.13: Genotypenstudie zur Mineralisierung in <i>Sepp</i> ^{+/+} - und <i>Sepp</i> ^{+/-} -Mäusen.	86
Abb. 4.14: Konzentrationen von fT3-, PINP- und SePP- im humanem Serum.....	89
Abb. 4.15: Beziehung des Zn-, Cu- und Se-Status auf das Frakturrisiko in der OPUS- Kohorte.....	92
Abb. 5.1: Die Bedeutung von Se für die Knochenhomöostase.....	111

Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1.1: Selen-Status weltweit sowie Prävalenz für einen niedrigen Se-Status.....</i>	<i>5</i>
<i>Tab. 1.2: Übersicht der humanen Selenoproteine, deren Lokalisation und Funktion. .8</i>	<i>8</i>
<i>Tab. 1.3: Allgemeine Eigenschaften von Se und S sowie Sec und Cys im Vergleich.</i>	<i>10</i>
<i>Tab. 3.1: Verwendete Laborgeräte und deren Hersteller.</i>	<i>35</i>
<i>Tab. 3.2: Software und Datenbanken.....</i>	<i>36</i>
<i>Tab. 3.3: Gebrauchsfertige Reaktionssysteme und deren Hersteller.</i>	<i>37</i>
<i>Tab. 3.4: Verwendete Antikörper und deren Verdünnung.</i>	<i>37</i>
<i>Tab. 3.5: In der Zellkultur verwendete Medien und Zusätze.....</i>	<i>38</i>
<i>Tab. 3.6: Verwendete Zelllinien.</i>	<i>38</i>
<i>Tab. 3.7: Zusammensetzung des Extraktionspuffers.</i>	<i>41</i>
<i>Tab. 3.8: Genotypisierungs-PCR.....</i>	<i>42</i>
<i>Tab. 3.9: cDNA-Synthese.....</i>	<i>44</i>
<i>Tab. 3.10: qRT-PCR-Reaktionsansatz und PCR-Programm.....</i>	<i>45</i>
<i>Tab. 3.11: Zutaten der DNA- und RNA-Agarosegele.</i>	<i>46</i>
<i>Tab. 3.12: Zusammensetzung der Puffer für die Proteinisolation.....</i>	<i>47</i>
<i>Tab. 3.13: Puffer, Lösungen und Proteinkonzentrationen für die SDS-PAGE.....</i>	<i>48</i>
<i>Tab. 3.14: Reagenzien für den Western Blot und die Immundetektion.</i>	<i>48</i>
<i>Tab. 3.15: Reagenzien für den GPx-Aktivitäts Assay.....</i>	<i>50</i>
<i>Tab. 3.16: Reagenzien für den TrxR-Enzymassay.....</i>	<i>51</i>
<i>Tab. 3.17: Zusammensetzung der Alcian Blau-Lösung.....</i>	<i>52</i>
<i>Tab. 3.18: Entparaffinisierung und Paraffinisierung von Gewebsschnitten.</i>	<i>53</i>
<i>Tab. 3.19: Auflistung der verwendeten siRNA-Oligonukleotide gegen ApoER2.....</i>	<i>56</i>
<i>Tab. 4.1: Vergleich der Knochenlänge von Sepp-Mäusen.</i>	<i>64</i>
<i>Tab. 4.2: Geschlechtsspezifische Unterschiede der Knochentranskript-Level Se- bezogener Gene in WT-Mäusen sowie in in silico Expressionsanalysen. ..</i>	<i>70</i>

<i>Tab. 4.3: mRNA-Expressionsmuster der Selenoproteine in murinen Knochen.</i>	<i>71</i>
<i>Tab. 4.4: Vergleichende Analyse der Se-Konzentration in allen Sepp-Mausgruppen.</i>	<i>75</i>
<i>Tab. 4.5: Expression wichtiger Gene des Selenoproteinmetabolismus und in silico Analyse.....</i>	<i>77</i>
<i>Tab. 4.6: mRNA Expressionsmuster wichtiger Gene des Selenoproteinmetabolismus.</i>	<i>78</i>
<i>Tab. 4.7: Untersuchung der Expression der Sepp-Rezeptoren im Knochen.</i>	<i>80</i>
<i>Tab. 4.8: Analyse der Expression der Sepp-Rezeptoren in allen Sepp-Genotypen. .</i>	<i>80</i>
<i>Tab. 4.9: Expressionsmuster in Knochen-ähnlichen Zellen.....</i>	<i>82</i>
<i>Tab. 4.10: Der Se-Status in Bezug auf Parameter der Knochengesundheit in der OPUS-Kohorte.....</i>	<i>87</i>
<i>Tab. 4.11: Der Cu-Status in Bezug auf Parameter der Knochengesundheit in der OPUS-Kohorte.....</i>	<i>88</i>
<i>Tab. 4.12: Der Zn-Status in Bezug auf Parameter der Knochengesundheit in der OPUS-Kohorte.....</i>	<i>88</i>
<i>Tab. 4.13. Korrelationen zwischen Spurenelementen und Parametern der Knochengesundheit in der OPUS-Kohorte.</i>	<i>90</i>
<i>Tab. 4.14: Beziehung zwischen Se-Status und Frakturrisiko.</i>	<i>90</i>
<i>Tab. 4.15: Beziehung zwischen Cu-Level und Frakturrisiko.....</i>	<i>91</i>
<i>Tab. 4.16: Beziehung zwischen Zn-Level und Frakturrisiko.</i>	<i>92</i>
<i>Tab. 7.1: Auflistung aller verwendeten qRT-PCR- Primer.</i>	<i>126</i>

Liste der Publikationen und Präsentationen

Publikationen:

1. Michaelis M, Gralla O, Behrends T, Scharpf M, Endermann T, Rijntjes E, **Pietschmann N**, Hollenbach B, Schomburg L. Selenoprotein P in seminal fluid is a novel biomarker of sperm quality. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
2. **Pietschmann N**, Rijntjes E, Hoeg A, Stoedter M, Schweizer U, Seemann P, Schomburg L. Selenoprotein P is the essential selenium transporter for bone. *Metallomics*.
3. **Pietschmann N**, Rijntjes E, Gogakos A, Hoeg A, Reid DM, Glüer CC, Murphy E, Felsenberg D, Roux C, Eastell R, Williams GR, Schomburg L. Copper status influences bone turnover markers and fracture risk in postmenopausal women. In Bearbeitung, wird eingereicht bei *Nutrition*.

Vorträge:

1. **Pietschmann N**, Rijntjes E, Hoeg A, Schomburg L. On the importance of selenium for bone physiology. International Conference on Progress in Bone and Mineral Research 2012. Wien, Österreich, 29.11.-01.12.2012.
2. **Pietschmann N**, Rijntjes E, Hoeg A, Schweizer U, Seemann P, Schomburg L. Murine models of altered Selenium transport highlight bone as a privileged target tissue. 10th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine 2013, Berlin, Deutschland, 14.-18.09.2013.

Poster:

1. **Pietschmann N**, Hoeg A, Seemann P, Koehle J, Schomburg L. Influence of Selenium and Gender on Bone Development and Regeneration. Bregenz Summer School on Endocrinology, Bregenz, Österreich, 18.-22.07.2010.
2. **Pietschmann N**, Rijntjes E, Hoeg A, Schomburg L. On the importance of selenium for bone physiology, European Calcified Tissue Society 2013, Lissabon, Portugal, 18.-21.05.2013.
3. **Pietschmann N**, Rijntjes E, Hoeg A, Schomburg L. On the importance of selenium for bone physiology, GMS Jahrestagung 2013, Berlin, Deutschland, 13.-15.09.2013.
4. Minich WB, Schuette A, Welsink T, Schwiebert C, **Pietschmann N**, Schomburg L. Autoimmunity against Selenoprotein P in human sera. 10th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine 2013, Berlin, Deutschland, 14.-18.09.2013

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation mit dem Titel "Selen und Knochen? Selen und Knochen!" in allen Teilen von mir selbstständig angefertigt wurde und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben worden sind.

Ich versichere, dass die Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität vorgelegen hat.

Veröffentlichungen von irgendwelchen Teilen der vorliegenden Dissertation sind von mir wie folgt vorgenommen worden:

"Selenoprotein P is the essential selenium transporter for bone", bei *Metallomics*.

"Copper status influences bone turnover markers and fracture risk in postmenopausal women", vorläufiger Titel, wird eingereicht bei *Nutrition*.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt.

Nicole Pietschmann