

Aus dem Institut für Experimentelle Endokrinologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einflussfaktoren auf Biomarker des Selenstatus ermittelt mit einem  
neu etablierten und kalibrierten Selenoprotein P ELISA

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sandra Hybsier  
aus Karl-Marx-Stadt

Datum der Promotion: 07.12.2018

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Abkürzungen</b> .....	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>5</b>
2.1	Einflussfaktoren auf Biomarker des Selenstatus ermittelt mit einem neu etablierten und kalibrierten Selenoprotein P ELISA.....	5
2.2	Factors influencing biomarkers of selenium status determined with a novel established and calibrated Selenoprotein P ELISA.....	6
<b>3</b>	<b>Einführung</b> .....	<b>7</b>
<b>4</b>	<b>Zielstellung</b> .....	<b>8</b>
<b>5</b>	<b>Methodik</b> .....	<b>9</b>
5.1	Herstellung des rekombinanten humanen SELENOP .....	9
5.2	Monoklonale Antikörper gegen das rekombinante humane SELENOP .....	9
5.3	Quantifizierung des humanen SELENOP mittels ELISA.....	9
5.4	Immunaффinitätschromatographie des humanen SELENOP .....	10
5.5	Bestimmung von Selen.....	10
5.6	Western Blot Analyse.....	10
5.7	Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS).....	11
5.8	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	11
5.9	Aminoglykosid-Wirkung im Tierexperiment.....	11
5.10	Biostatistische Analysen .....	11
<b>6</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>12</b>
6.1	Substitution des Selenocysteins durch Cystein im SELENOP - Molekül .....	12
6.2	Entwicklung, Charakterisierung und Kalibrierung des SELENOP ELISAs.....	13
6.3	Altersabhängiger Geschlechtsdimorphismus von Selen und SELENOP.....	15
6.4	Aminoglykoside führen zur Selenverarmung des SELENOP.....	17
<b>7</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>18</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>23</b>
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>25</b>
<b>10</b>	<b>Anteilsklärung an den erfolgten Publikationen</b> .....	<b>26</b>
<b>11</b>	<b>Druckexemplare der ausgewählten Publikationen</b> .....	<b>27</b>
11.1	Regulation of Selenocysteine Content of Human Selenoprotein P by Dietary Selenium and Insertion of Cysteine in Place of Selenocysteine. ....	27
11.2	Sex-specific and inter-individual differences in biomarkers of selenium status identified by a calibrated ELISA for selenoprotein P. ....	38
11.3	Aminoglycoside-driven biosynthesis of selenium-deficient Selenoprotein P.....	53
<b>12</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>64</b>
<b>13</b>	<b>Komplette Publikationsliste</b> .....	<b>66</b>
<b>14</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>68</b>

## 1 Abkürzungen

APR	.....	<i>Akute-Phase-Reaktion</i>
Bicin	.....	<i>N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)glycin</i>
Bis-Tris	.....	<i>Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan</i>
bzw.	.....	<i>beziehungsweise</i>
Caco-2	.....	<i>Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line</i>
COUP-TF	.....	<i>Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor-Proteine</i>
Cys	.....	<i>Cystein</i>
d.h.	.....	<i>das heißt</i>
DIO	.....	<i>Iodothyronin-Deiodase</i>
DMEM	.....	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	.....	<i>Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic Acid)</i>
DTT	.....	<i>Dithiothreitol</i>
ELISA	.....	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FCS	.....	<i>Fetales Kälberserum</i>
GH	.....	<i>Hypophysäres Wachstumshormon</i>
GPX	.....	<i>Glutathionperoxidase</i>
GR	.....	<i>Glucocorticoid-Rezeptor</i>
HAT	.....	<i>Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin</i>
Hep3B	.....	<i>Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line</i>
Hepa1-6	.....	<i>Murine Hepatocellular Carcinoma Cell Line</i>
HepG2	.....	<i>Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line</i>
HRP	.....	<i>Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase)</i>
HT	.....	<i>Hypoxanthin und Thymidin</i>
IFN- $\gamma$	.....	<i>Interferon-<math>\gamma</math></i>
IL-1 $\beta$	.....	<i>Interleukin-1<math>\beta</math></i>
IL-6	.....	<i>Interleukin-6</i>
kDa	.....	<i>Kilodalton</i>
LAGeSo	.....	<i>Landesamt für Gesundheit und Soziales</i>
LC-MS/MS	.....	<i>Liquid Chromatography Tandem-Mass Spectrometry</i>
LDH	.....	<i>Lactatdehydrogenase</i>
LDS	.....	<i>Lithiumdodecylsulfat</i>
Li-Heparin-Plasma	.....	<i>Lithium-Heparin-Plasma</i>
mM	.....	<i>Millimol</i>
MOPS	.....	<i>3-(N-Morpholino)propansulfonsäure</i>
mRNA	.....	<i>Messenger-RNA</i>
MW $\pm$ SD	.....	<i>Mittelwert <math>\pm</math> Standardabweichung</i>
Ni-NTA	.....	<i>Nickel-Nitrilotriessigsäure</i>
NIST	.....	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
nM	.....	<i>Nanomol</i>
NMD	.....	<i>Nonsense-mediated mRNA decay</i>
ORF	.....	<i>Offenes Leseraster (Open Reading Frame)</i>
PAGE	.....	<i>Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>
PEG	.....	<i>Polyethylenglycol</i>
PPAR	.....	<i>Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren</i>
PSTK	.....	<i>Phosphoseryl-tRNA[Ser]<sup>Sec</sup> Kinase</i>
PVDF	.....	<i>Polyvinylidendifluorid</i>
qPCR	.....	<i>Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion</i>
RAR	.....	<i>Retinsäure-Rezeptoren</i>
RNA	.....	<i>Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)</i>
rRNA	.....	<i>Ribosomale RNA (Ribosomal RNA)</i>

SBP-2 .....	<i>SECIS-Bindendes Protein-2</i>
SDS.....	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
Se.....	<i>Selen</i>
Sec.....	<i>Selenocystein</i>
SECIS.....	<i>Selenocysteine Insertion Sequence</i>
SecS.....	<i>Sec Synthetase</i>
SELENOP .....	<i>Selenoprotein P</i>
SeMet .....	<i>Selenomethionin</i>
SPS-2.....	<i>Selenophosphat Synthetase-2</i>
TGF- $\beta$ .....	<i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></i>
TMB .....	<i>Tetramethylbenzidin</i>
TNF- $\alpha$ .....	<i>Tumornekrosefaktor-<math>\alpha</math></i>
Tris .....	<i>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan</i>
tRNA .....	<i>Transfer-RNA</i>
tRNA <sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> .....	<i>Sec-spezifische tRNA</i>
TR- $\alpha$ 1 .....	<i>Schilddrüsenhormon-Rezeptor-alpha1</i>
TXNRD.....	<i>Thioredoxinreduktase</i>
TXRF.....	<i>Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzspektroskopie</i>
UTR.....	<i>Untranslatierter Bereich (Untranslated Region)</i>
VDR .....	<i>Vitamin D- Rezeptor</i>

Die Formatierung von Gen- und Protein-Namen orientiert sich an den offiziellen Richtlinien. So werden humane Gene und Transkripte kursiv in Großbuchstaben (z.B. *SELENOP*), humane Proteine in Großbuchstaben (z.B. *SELENOP*), murine Gene und Transkripte kursiv beginnend mit einem Großbuchstaben und weiterführend mit kleinen Buchstaben (z.B. *Selenop*) und murine Proteine mit Großbuchstaben (z.B. *SELENOP*) geschrieben.

## 2 **Zusammenfassung**

### 2.1 Einflussfaktoren auf Biomarker des Selenstatus ermittelt mit einem neu etablierten und kalibrierten Selenoprotein P ELISA

Selen (Se) ist ein essentielles Spurenelement, das in Form der modifizierten Aminosäure Selenocystein Bestandteil der Selenoproteine ist. Dort stellt es bei Enzymen der antioxidativen Abwehr und des Schilddrüsenmetabolismus einen Teil des aktiven Zentrums dar. Das über die Nahrung aufgenommene Se wird über Selenoprotein P (SELENOP) von der Leber zu den extrahepatischen Organen transportiert. Eine Unterversorgung mit Se, so wie es bei vielen Europäern der Fall ist, erhöht das Krankheitsrisiko für Inflammation, Krebs, Fertilitätsstörungen und Autoimmunität. Daher ist die Erfassung von Biomarkern des Se-Status von großer Bedeutung. Die SELENOP-Konzentration im Serum bzw. Plasma spiegelt die Versorgungslage der Organe mit dem spezifisch regulierten Se-Pool wider. Jedoch zeigen Publikationen zu SELENOP-Konzentrationen von gesunden Menschen Diskrepanzen um annähernd das Zehntausendfache, was in der Verwendung kommerzieller nicht validierter und unkalibrierter Immunassays begründet liegt. Daher stand die Etablierung eines ELISAs, dessen Charakterisierung und Kalibrierung an einem international zugänglichen NIST Standard Referenz Material im Vordergrund dieser Arbeit. Diese Aufgabe wurde bewältigt und der neue Assay zeigt innerhalb seines großen Arbeitsbereiches (11,6 - 538,4 µg/L) eine sehr gute Richtigkeit (2,9 %) und gute Präzision (9,3 %). Der Vergleich jüngerer und älterer Probanden offenbarte einen altersspezifischen Geschlechtsdimorphismus. Bei jungen Frauen war der lineare Zusammenhang von Gesamt-Se und SELENOP im Serum auffällig gering, und der Quotient aus Se / SELENOP war höher als bei jüngeren oder älteren Männern oder älteren Frauen. Durch diesen Befund bereichert diese Arbeit die Biomarker des Se-Status um den Se/SELENOP-Quotienten. Überdies wird zum ersten Mal gezeigt, dass dieser Quotient durch die Verwendung von Antibiotika negativ beeinflusst werden kann. Bei den hier untersuchten gesunden Teilnehmern liegt er beim isolierten SELENOP mit  $5,4 \pm 0,5$  (MW  $\pm$  SD) deutlich unter dem theoretisch möglichen Wert von 10 Atomen pro Molekül. Zukünftige Studien mit hochqualitativen Proben in validierten und kalibrierten Methoden sind notwendig, um pathophysiologische Resultate in Zusammenhang mit Se-Biomarkern vor dem Hintergrund einer altersabhängigen geschlechtsspezifischen Regulation zu interpretieren. Weiterhin muss geklärt werden, inwieweit der Se/SELENOP-Quotient zusätzlich klinisch relevante Informationen bei der Diagnose von Erkrankungen oder Beurteilung von Mortalitätsraten wie z.B. bei konnatalen Infektionen in der Pädiatrie oder schwerer Sepsis liefert.

## 2.2 Factors influencing biomarkers of selenium status determined with a novel established and calibrated Selenoprotein P ELISA

Selenium (Se) is an essential trace element inserted in selenoproteins in the form of the modified amino acid selenocysteine. In the active site of enzymes, Se is involved in processes of antioxidant defense and thyroid metabolism. The dietary Se is transported via selenoprotein P (SELENOP) from the liver to the extrahepatic tissues for the synthesis of other selenoproteins. A low Se intake like in Europe increases the risk of inflammation, cancer, fertility problems, and autoimmunity, which makes the detection of biomarkers of the Se status very important. In contrast to total Se, SELENOP in serum or plasma represents the supply of the tissues with the regulated Se-pool. However, publications on SELENOP concentrations of healthy humans differ by almost factor ten thousand, which are outside reasonable limits. These contradictions complicate the comparability of clinical studies. Reasons are the usage of commercial non-validated and uncalibrated immunoassays. Consequently, the establishment of an ELISA, its characterization, and calibration against the internationally available NIST Standard Reference Material SRM1950 is the central part of this work. The new assay shows excellent accuracy (2.9 %) and good precision (9.3 %) within its large working range (11.6 - 538.4  $\mu\text{g} / \text{L}$ ). The comparison of younger and older subjects showed an age-specific sexual dimorphism. In serum, the correlation between total Se and SELENOP was remarkably low in young women, and the Se / SELENOP ratio was higher than that of younger or older men or older women. Because of this finding, this work enriches the biomarkers of Se status by the Se / SELENOP ratio. Moreover, it is shown for the first time that this quotient can be adversely affected using antibiotics. In healthy participants studied here on average  $5.4 \pm 0.5$  (mean  $\pm$  SD) Se atoms per molecule were found in the isolated SELENOP which is below the theoretically possible value of 10. Future studies with high-quality samples in validated and calibrated methods are necessary to interpret pathophysiological results associated with Se biomarkers considering an age-dependent gender-specific regulation. Furthermore, it must be clarified to what extent the Se / SELENOP ratio provides additional clinically relevant information in disease diagnostics or prediction of mortality risks, e.g., in conatal infections in pediatrics or severe sepsis.

### 3 Einführung

Vor circa 200 Jahren wurde von dem schwedischen Chemiker Jöns Jakob Berzelius das Element Selen (Se) entdeckt. In Form der 21. proteinogenen Aminosäure Selenocystein (Sec) ist Se Bestandteil der Selenoproteine [1]. Mit Hilfe der Bioinformatik sind heute 25 Gene im Menschen bekannt, die für Selenoproteine kodieren [2]. Die meisten charakterisierten Proteine sind Enzyme, wie z.B. die Glutathionperoxidasen (GPX 1-4 & 6), die drei Isozyme der Thioredoxinreduktasen (TXNRD 1-3) und die Iodothyronin-Deiodasen (DIO 1-3) [3].

Sec ist die einzige Aminosäure in Eukaryonten, deren Biosynthese an einer eigenen tRNA erfolgt [4]. Die Insertion von Sec in die Polypeptidkette während der Translation unterliegt einem komplexen molekularen Mechanismus, reguliert durch cis- und trans-wirkende Faktoren. So besitzt die mRNA im offenen Leseraster (ORF) mindestens ein UGA-Codon, welches normalerweise als Stoppcodon fungiert. Eine Haarnadelstruktur (SECIS) in der 3'-UTR der mRNA rekodiert UGA in Anwesenheit der Sec-spezifischen tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> (TRU-TCA1-1) zu einem Sec-Insertionssignal und verhindert damit die Termination an dieser Stelle [5]. Das über die Nahrung zugeführte Se wird mittels des Transportproteins Selenoprotein P (SELENOP) von der Leber zu den extrahepatischen Organen transportiert. SELENOP besitzt als einziges Selenoprotein 10 UGA-Codone im ORF seiner kanonischen mRNA, deren Rekodierung von zwei SECIS-Elementen bewerkstelligt wird. Über 90% des Plasma-SELENOP stammen aus der Leber [3]. Damit beeinflusst die Syntheserate von SELENOP in der Leber den gesamten Se-Haushalt des Körpers [6, 7].

Eine mangelnde Versorgung mit Se, wie bei den meisten Europäern, erhöht das Risiko für Fertilitätsstörungen, Autoimmunität, Krebs, Inflammation, Kaschin-Beck- und Keshan-Krankheit [8]. Daher ist es wichtig, den Se-Status zu erfassen und Einflussfaktoren, die zu einer Veränderung der Se-Versorgung der Organe führen, näher zu untersuchen.

Für die Erfassung des Se-Status im Serum bzw. Plasma können drei Biomarker herangezogen werden. Zwei dieser Biomarker sind Proteine, d.h., GPX 3 und SELENOP, die den spezifischen und regulierten Se-Pool repräsentieren. Beide Selenoproteine erreichen bei hoher Se-Aufnahme ein Plateau, was als adäquate Versorgung des Organismus interpretiert wird. Zirkulierendes GPX3 entstammt hauptsächlich der Niere und erreicht signifikant früher eine Sättigung als das hepatisch sezernierte SELENOP. Deshalb wird SELENOP als aussagekräftigster Biomarker angesehen [9]. Ein dritter Biomarker ist die totale Se-Konzentration, dessen Messung die beiden Selenoproteine, unspezifisch eingebautes Selenomethionin und kleine Se-haltige Metabolite umfasst. Dieser Biomarker erreicht keine Sättigung bei zunehmender Selenomethionin-Aufnahme [3, 10].

#### 4 Zielstellung

Während die Vermessung von Se über verschiedene Methoden erfolgen kann und weltweit etabliert ist, fehlte für SELENOP eine zuverlässige und kalibrierte Methode. Kommerziell erhältliche Immunassays für SELENOP lieferten in der Vergangenheit SELENOP-Konzentrationen bei gesunden Menschen, die sich beinahe um das Zehntausendfache voneinander unterschieden [11-13].

Um zu standardisierten SELENOP-Messungen zu kommen, wurde deshalb in dieser Arbeit ein neuer Sandwich-ELISA im 96-well-Plattenformat auf Basis monoklonaler Antikörper entwickelt, charakterisiert und gegen das kommerziell erhältliche NIST Standard Referenz Material SRM1950 [14, 15] kalibriert. Dieser Test ist gerade für selenärmere Regionen wie Europa von großer Bedeutung, da hier die Selenaufnahme individuell unterschiedlich ist und SELENOP so über einen großen Konzentrationsbereich variiert [16]. Im Se-Metabolismus gibt es überdies geschlechter- und altersspezifische Unterschiede [17], deren Bedeutung für die SELENOP Expression in Gesundheit und Krankheit von Männern und Frauen noch nicht gut charakterisiert ist. Zudem zeigten neue Ergebnisse von Xu et al. [18] einen Syntheseweg für Cystein an der tRNA<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup>, der durch Se-Status, Sulfid und Thiophosphat beeinflusst wird. Eine zuverlässige SELENOP Bestimmungsmethode sollte auch geeignet sein, diese Interaktion vor dem Hintergrund der Sec-reichen SELENOP Biosynthese molekular zu charakterisieren.

Weiterhin ist SELENOP als ein negatives Akute-Phase-Protein bekannt [19-21], dessen Biosynthese im Rahmen einer Akute-Phase-Reaktion (APR), z.B. bei Infektionen, reduziert wird. Zur Therapie werden in der Klinik Aminoglykosid-Antibiotika wie z.B. Gentamicin eingesetzt, vor allem in Entwicklungsländern [22]. Studien in Säugetierzellen zeigten aber, dass Aminoglykoside die Selenoprotein-Biosynthese stören können [23]. Hierdurch könnte eine doppelt negative Regulation der SELENOP-Biosynthese mit niedrigem Selenstatus und gestörter Sec-Insertion resultieren, was mit einer negativen Prognose bei kritischen Erkrankungen assoziiert sein könnte [24, 25]. Auch aus diesem Grund erscheint es notwendig, einen zuverlässigen und kalibrierten SELENOP ELISA zu entwickeln, um in der Pädiatrie bei konnataler Infektion den Se-Status und die SELENOP Konzentrationen vor dem Hintergrund einer Aminoglykosid-Therapie zu charakterisieren und quantitativ zu analysieren.



## **5 Methodik**

### **5.1 Herstellung des rekombinanten humanen SELENOP**

Für eine effiziente rekombinante Expression von humanem SELENOP wurden die 10 UGA-Codons im ORF durch Cystein-Codons ersetzt. Das synthetische Leseraster wurde über Gensynthese hergestellt (Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Deutschland), in den Baculovirus Transfervektor pFastBac<sup>TM</sup>1 kloniert (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland) und in kompetente DH10Bac<sup>TM</sup> E. coli (Thermo Fisher) Zellen transformiert. Die rekombinante bacmid DNA wurde isoliert, um damit Sf9 Insektenzellen (Thermo Fisher) zu transfizieren und den rekombinanten Virus anzureichern. Mit dem rekombinanten Virus wurde in High-Five (Thermo Fisher) Insektenzellen per Suspensionskultur rekombinantes Sec-freies SELENOP exprimiert und über Ni-NTA Agarose (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) isoliert.

### **5.2 Monoklonale Antikörper gegen das rekombinante humane SELENOP**

Im Rahmen eines genehmigten Tierversuchs (LAGeSo Berlin, Nr. H0331/12) wurde BALB/c Mäusen Sec-freies SELENOP in TiterMax<sup>®</sup>Gold Adjuvant (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA) injiziert. Die Maus mit dem höchsten Antikörper-Titer wurde getötet, die Lymphozyten der Milz isoliert, mit Hilfe von PEG1500 (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland) mit der Krebszelllinie PAI-0 (RRID: CVCL\_Z070) fusioniert und kultiviert. Hybridomazellen wurden im HAT-DMEM- und anschließend im HT-DMEM-Medium selektiert und subkloniert in DMEM-Medium mit 10% Pferdeserum, 4mM L-Glutamin, 1 µg/mL Fungizone<sup>TM</sup>, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin und 1mM Natriumpyruvat. Durch das Grenzverdünnungsklonen wurden positive Klone vereinzelt, expandiert und noch einmal subkloniert. Acht monoklonale Antikörper wurden dann aus den Zellkulturüberständen über eine Affinitätschromatographie mittels ProsepG-Säule (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) isoliert und bei 4°C in PBS, pH7,4 eingelagert.

### **5.3 Quantifizierung des humanen SELENOP mittels ELISA**

Das SELENOP aus einer Probe wurde von zwei spezifischen monoklonalen Maus-Antikörpern erkannt. Der Fänger-Antikörper war auf einer 96-well Polystyrol-Platte gekoppelt, der Detektionsantikörper mit Biotin markiert. Der Sandwich-Immun-Komplex wurde mit einem Streptavidin-HRP-Konjugat (F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz) inkubiert. Als HRP-Substrat diente Tetramethylbenzidin (TMB, Diarect AG, Freiburg, Deutschland). Die blaue

Farbreaktion wurde mit Schwefelsäure abgestoppt. Der sich dadurch gebildete gelbe Farbkomplex wurde im Photometer bei 450 nm vermessen.

#### 5.4 Immunaффinitätschromatographie des humanen SELENOP

Ein monoklonaler Maus anti-human SELENOP-Antikörper wurde an AminoLink® Plus Coupling Resin (Thermo Fisher) gebunden. Das Säulenmaterial wurde über Nacht bei 4°C mit Zellkulturüberstand bzw. Serum oder Plasma inkubiert und anschließend in eine Leersäule mit Fritte überführt. Nach einer Waschprozedur mit PBS, pH 8, wurde das humane SELENOP mittels 50 mM Zitronensäure, pH 2, eluiert und mit 1 M Tris, pH 9, neutralisiert. Für die Isolierung im 96-well-Format wurden alle Inkubationsschritte in einer Filterplatte vorgenommen.

#### 5.5 Bestimmung von Selen

Die Quantifizierung von Selen erfolgte in einem Röntgenspektrometer (S2 PICOFOX, Bruker Nano GmbH, Berlin, Deutschland) nach dem Prinzip der Totalreflexions-Röntgenfluoreszenz-Analyse (TXRF). Für die Konzentrationsermittlung wurde jeder Probe eine definierte Menge eines Gallium-Standards (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) hinzugefügt. Das Proben-Gallium-Gemisch wurde auf einen Quarzträger pipettiert, getrocknet und anschließend im Gerät analysiert.

#### 5.6 Western Blot Analyse

Die zu analysierenden Proben wurden in einem LDS Probenpuffer (Thermo Fisher) mit DTT (Sigma-Aldrich) 5 min bei 95°C reduziert. Über eine SDS-PAGE wurden die Proteine anschließend mit einem MOPS SDS Laufpuffer in einem 10%-igen Bis-Tris-Gel aufgetrennt, und auf eine 0,2 µm PVDF Membran per Elektrotransfer mit einem Tris-Bicin-Methanol Transferpuffer geblottet. Die Proteinbanden wurden reversibel mit Ponceau S (Sigma-Aldrich) rot angefärbt und die Membran mit fettfreiem Milchpulver abgesättigt. Die Immundetektion erfolgte mit primären Antikörpern und HRP-markierten Spezies-spezifischen Sekundäntikörpern. Der Nachweis erfolgte über ein Chemilumineszenz-Reagenz (Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare GmbH, München, Deutschland) mit Dokumentation auf Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm, GE).

### 5.7 Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Aufgereinigtes humanes SELENOP wurde mittels DTT reduziert und über 2-Iodacetamid alkyliert. Nach einem proteolytischen Verdau mit Trypsin wurde das Peptidgemisch mittels einer Umkehrphasenchromatographie (Magic C18AQ Säule, Bruker Corp., Billerica, MA, USA) in einem Acetonitril-Gradienten aufgetrennt. Mit einem LTQ Orbitrap Velos Tandem-Massenspektrometer (Thermo Fisher) wurden die Moleküle ionisiert, nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis getrennt und analysiert. Die Spektren wurden mit Hilfe der Software SEQUEST (Version 28, Thermo Fisher) gegen die International Protein Index (IPI) Bioinformatik-Datenbank (<https://www.ebi.ac.uk/IPI>, European Bioinformatics Institute (EBI), Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, UK) abgeglichen.

### 5.8 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Mit Hilfe der qPCR wurden Genexpressionsanalysen vorgenommen. Dafür wurde zuerst die Gesamt-RNA isoliert (Aurum™ Total RNA Mini Kit, Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, California, USA), in komplementäre DNA umgeschrieben (iScript™ cDNA Synthesis Kit, BioRad) und in einem Thermozykler mittels des Absolute QPCR SYBR Green Fluorescein Mix (Thermo Fisher) und dem entsprechenden Primer-Paar, das den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankierte, amplifiziert. Die Expressionsraten der Gene von Interesse wurden gegen Haushaltsgene wie beta Actin bzw. 18S rRNA normalisiert.

### 5.9 Aminoglykosid-Wirkung im Tierexperiment

Die Tierversuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Kostja Renko gemäß der Genehmigung (LAGeSo Berlin, Nr. G0064/15) durchgeführt. Die Untersuchung des Einflusses von Aminoglykosiden nach subkutaner Injektion auf die Synthese der Selenoproteine in der Maus erfolgte sowohl unter einer Se-Mangelernährung (< 0,08 ppm Se, Ssniff GmbH, Soest, Deutschland) als auch unter Se-Supplementierung (0,4 ppm Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>). An zwei aufeinanderfolgenden Tagen wurde entweder G418 (25 mg/kg Körpergewicht), Gentamicin (50 mg/kg) oder das Lösungsmittel injiziert. Danach wurden die Tiere (n=7 pro Gruppe) getötet, die Organe entnommen, auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C eingelagert.

### 5.10 Biostatistische Analysen

Die Software GraphPadPrism® Version 6.04 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) wurde für statistische Auswertungen verwendet. Der D'Agostino-Pearson omnibus test wurde benutzt, um Resultate hinsichtlich ihrer Normalverteilung zu überprüfen. Da die Ergebnisse

normal verteilt waren, wurden diese bei einem Vergleich von zwei Gruppen mit einem Zweistichproben-t-Test (unpaired t-test) und bei mehreren Gruppen einer Einfaktoriellen Varianzanalyse (one-way ANOVA) mit einem paarweise multiplen Vergleichstest nach Tukey auf signifikante Unterschiede hin überprüft. Um den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei normal verteilten Parametern zu beschreiben wurde der Pearson Korrelationskoeffizient berechnet. Mit der Software IBM® SPSS® Statistics, Version 22 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt. Zur Einschätzung der Signifikanz wurde der p-Wert berechnet. Dabei galten p-Werte < 0,05 als signifikant.

## **6 Ergebnisse**

### **6.1 Substitution des Selenocysteins durch Cystein im SELENOP - Molekül**

SELENOP kann in Menschen, Ratten und Mäusen maximal 10 Sec in der Polypeptidkette tragen. In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass der Selengehalt des SELENOP bei Ratten aber nur  $7,5 \pm 1,0$  [26] und bei Mäusen ungefähr 5 Atome [27] pro Molekül betrug. Ein verkürzter C-Terminus kann durch einen prämaturen Translationsstopp oder durch limitierte Proteolyse entstehen [15, 28, 29]. Zusammen mit einer Arbeitsgruppe der Harvard Medical School in Boston haben wir den Se-Gehalt von humanem SELENOP, das in der HepG2-Zelllinie als *in vitro* Modell synthetisiert wurde, analysiert. Die Zellen wurden in DMEM-Medium ohne bzw. mit Zusatz von 100 nM Natriumselenit oder 1 mM Natrium Thiophosphat für 24-48h inkubiert. SELENOP wurde dann mittels Metallaffinitätschromatographie aus 250 mL Zellkulturüberstand über seine Histidin-reichen Regionen isoliert und per LC-MS/MS analysiert. Die Sec-Positionen drei, vier und fünf konnten massenspektroskopisch ausgewertet werden. Selbst bei unbehandelten Zellen im Kontrollansatz waren bis zu 18% Sec durch Cys ersetzt. Während eine Behandlung mit Selenit zu einer 100%-igen Besetzung der Positionen mit Sec führte, resultierte die Inkubation mit Thiophosphat zu einer nahezu 100%-igen Insertion von Cys in die genannten Positionen (Tab. 1).

Somit unterliegt auch die SELENOP-Biosynthese einer Regulation durch das Selenit- bzw. Thiophosphatangebot, welches den Sec/Cys-Gehalt beeinflusst. Um zu charakterisieren, wie hoch das Sec zu Cys Verhältnis im SELENOP beim Menschen ist, wurde SELENOP aus einem Plasmapool von fünf Spendern der Charité (genehmigte Studie; Ethik-Antragsnummer: EA2/103/10) per Immunaффinitätschromatographie isoliert und der MS-Analytik zugeführt. Die Analyse der Sec-Positionen zwei bis fünf ergab, dass in Abhängigkeit der Positionen bis zu

8,5% Sec durch Cys ersetzt waren. In Anbetracht der Ergebnisse aus der Zellkultur ist diese Prozentzahl aber als variabel anzusehen, die von anderen Parametern wie z.B. Se-Status, Thiophosphat Konzentration und inflammatorischen Signalen beeinflusst wird.

**Tabelle 1:** Sec-haltige SELENOP-Peptide nach Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>- bzw. Na<sub>3</sub>SPO<sub>3</sub>-Behandlung von HepG2-Zellen

Probe	Tryptisches Peptid	Cystein [%]	Sec [%]
Kontrolle	TGSAIT <u>U</u> QCK	0	100
	ENLPSLCS <u>U</u> QGLR	0	100
	AEENITESC <u>QUR</u>	18,2	81,8
Na-Selenit	TGSAIT <u>U</u> QCK	0	100
	ENLPSLCS <u>U</u> QGLR	0	100
	AEENITESC <u>QUR</u>	0	100
Na-Thiophosphat	TGSAIT <u>U</u> QCK	100	0
	ENLPSLCS <u>U</u> QGLR	100	0
	AEENITESC <u>QUR</u>	95,5	4,5

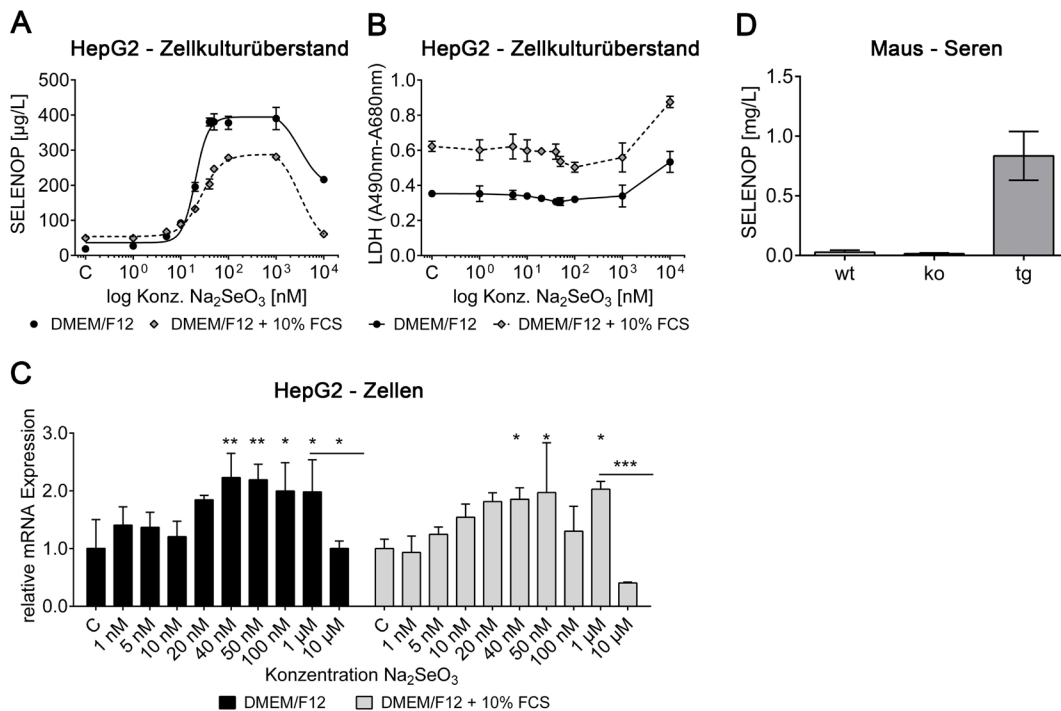
In Anlehnung an Table 1 aus [30]. LC-MS/MS-Analysen der SELENOP-Sec-Positionen drei bis fünf nach Selenit- bzw. Thiophosphat-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten HepG2-Zellen. Das Vorhandensein von Selenit begünstigte den Einbau von Sec, während Thiophosphat die Insertion von Cys anstelle von Sec förderte.

## 6.2 Entwicklung, Charakterisierung und Kalibrierung des SELENOP ELISAs

Nach der Immunisierung von Mäusen mit rekombinantem humanen Se-freien SELENOP konnten acht monoklonale Antikörper etabliert werden, von denen zwei als Kandidaten für die Testentwicklung ausgewählt wurden. Ein ELISA Standard wurde aus 30 Seren von US-Bürgern (Interstate Blood Bank Inc., Memphis, TN38134, USA) erstellt und gegen das charakterisierte NIST Plasma kalibriert [14]. Mit Hilfe der bekannten Se-Beladung des SELENOP-Moleküls in Ratten [31], der Dichte von Plasma mit 1,028 kg/L, dem mittleren Molekulargewicht des glykosylierten SELENOP von 51 kDa und dem Molekulargewicht von Se mit 78,96 g/mol konnte die SELENOP-Ausgangskonzentration des NIST Standards von 4,44 mg/L berechnet werden.

Die technische Charakterisierung des ELISA mit den Parametern Richtigkeit, Präzision, Sensitivität, Parallelität und Stabilität erfolgte mit Serum. So zeigte sich bei drei Kontrollseren in insgesamt 18 Assays im Mittelwert eine Abweichung von 2,9% von der Nominalkonzentration. Der mittlere Variationskoeffizient der Intra-Assay- bzw. Inter-Assay-Präzision lag bei 6,2% bzw. 10,5%, und die Labor-zu-Labor-Variation betrug 11,3%. Die Nachweisgrenze betrug 6,7 µg/L und die obere und untere Bestimmungsgrenze 538,4 µg/L und 11,6 µg/L. Die Untersuchung der Parallelität ergab bei vier Matrizen, dass das NIST Li-Heparin-Plasma als Kalibrator für unseren Serumstandard geeignet ist. Allerdings haben Plasmen eine geringere SELENOP-Konzentration als Seren. So ergaben sich in den Experimenten mit 54 Matrix-Paaren SELENOP-Konzentrationen von  $3,4 \pm 0,8$  mg/L in Citrat-

Plasma und  $4,0 \pm 0,9$  mg/L in Serum ( $r = 0,909$ ;  $p < 0,0001$ ). Stabilitätsuntersuchungen wurden über 48 Stunden von drei unverdünnten bzw. verdünnten Seren in Probenpuffer vorgenommen. Ein Vermessen von klinischen Seren innerhalb eines Arbeitstages bei Raumtemperatur ist möglich. Bei höheren Temperaturen sollten die Proben mit Probenpuffer versetzt bei  $2-8^{\circ}\text{C}$  bis zu deren Vermessung eingelagert werden. Weiterhin zeigte die Einfrier- und Auftaustabilität, dass die Seren bis zu drei Zyklen stabil sind.



**Abbildung 1:** In Anlehnung an Figure 2 aus [32]. Überprüfung der Spezifität des SELENOP-ELISA. Alle Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SD. (A-C) Natriumselenit-Stimulation von HepG2-Zellen für 24h in biologischen Triplikaten in DMEM- bzw. DMEM-Medium + 10% FCS. (A) Vermessung der Zellkulturüberstände im SELENOP-ELISA. Mit steigender Selenitkonzentration steigt die SELENOP-Konzentration bis zu einem Plateau und sinkt bei einer zytotoxischen Selenit-Konzentration von  $10\mu\text{M}$  wieder ab. (B) Die LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand ist ein Indikator zytotoxischer Effekte bei  $10\mu\text{M}$  Selenit. (C) Die SELENOP mRNA steigt mit zunehmender Selenitkonzentration an und fällt bei  $10\mu\text{M}$  Selenit wieder ab. (D) Vermessung von jeweils drei weiblichen und männlichen Mäuseseren pro Gruppe im SELENOP-ELISA. SELENOP wird nur in den transgenen Mäusen (tg) detektiert, die das humane SELENOP in der Leber synthetisieren. Das murine SELENOP der Wildtyp (wt)- und *Selenop*-Knockout (ko)-Mäuse zeigt hingegen keine Signale im SELENOP ELISA.

Um die Spezifität des ELISAs zu demonstrieren, wurden humane Hepatozyten mit einer aufsteigenden Konzentration an Natriumselenit stimuliert. Da SELENOP ein Se-sensitiver Biomarker ist, zeigte sich im ELISA ein paralleler Anstieg der SELENOP-Konzentration in den Zellkulturüberständen bis zur zytotoxischen Konzentration von  $10\mu\text{M}$  Selenit (Abb. 1 A-C). Parallel dazu stieg auch die Transkriptmenge an. Es gab jedoch in Abhängigkeit des Kulturmediums Unterschiede, die vor allem auf Translationsebene zu beobachten waren. Fetales Kälberserum (FCS)-haltiges Medium erhöhte die mittlere Effektivdosis Selenit,

verringerte die Steilheit der Kurve und die Breite zwischen minimaler und maximaler Wirkung von Selenit im Vergleich zur Verwendung von serumfreiem Medium. Ein weiterer Test der Spezifität lag in der Vermessung der Seren von sechs Mäusen pro Genotyp Wildtyp (*Selenop*<sup>+/+</sup>), homozygot *Selenop* Knockout (*Selenop*<sup>-/-</sup>) und homozygot *Selenop* Knockout Maus mit einem humanen *SELENOP* Transgen in der Leber (*Selenop*<sup>-/-tg</sup>) [33]. Nur die transgenen Mäuse zeigten Signale im SELENOP ELISA (Abb. 1D).

### 6.3 Altersabhängiger Geschlechtsdimorphismus von Selen und SELENOP

Als Se-sensitiver Biomarker korreliert SELENOP mit dem Gesamtselen im Serum. Einige Arbeiten zeigen jedoch, dass der Se-Metabolismus geschlechterspezifische Unterschiede aufweist [17]. Es ist unklar, inwieweit sich dieser Geschlechtsdimorphismus auch auf den linearen Zusammenhang beider Parameter auswirkt. Eine lineare Regressionsanalyse von 99 Serumproben (43 Männer, 18-64 Jahre, 56 Frauen, 18-55 Jahre) zeigte, dass die männlichen (Beta = 0,766; P < 0,0001) gegenüber weiblichen (Beta = 0,576; P < 0,0001) Probanden einen höheren standardisierten Regressionskoeffizienten aufwiesen, obwohl die Se- und SELENOP-Konzentrationen keinen geschlechtsspezifischen Unterschied zeigten. Diese Aussage konnte in einer zweiten Kohorte, der Berliner Altersstudie II (Base-II) [34], bestätigt werden, aus der Seren von jungen (22-26 Jahre) und älteren (73-79 Jahre) Männern (Beta = 0,956; P < 0,0001) und Frauen (Beta = 0,628; P = 0,003) analysiert wurden (n=10 pro Gruppe). Diese Studie eignete sich aufgrund ihres Studiendesigns auch hervorragend dafür, um zusätzlich zum Selen den Einfluss des Alters auf den linearen Zusammenhang von Se und SELENOP zu untersuchen. Hier zeigte sich in einer multiplen Regressionsanalyse, dass nur bei Frauen der Determinationskoeffizient erhöht wird (korrigiertes R<sup>2</sup> = 0,705 vs. 0,361), wobei Se einen größeren Einfluss (Beta = 0,655; P < 0,0001) auf SELENOP besaß als das Alter (Beta = 0,585; P < 0,0001).

Nachfolgend wurde untersucht, ob der geschlechterspezifische Korrelationsunterschied auch teilweise durch eine unterschiedliche Se-Beladung des SELENOP-Moleküls herbeigeführt wird. Zu diesem Zweck wurde aus der zweiten Kohorte SELENOP aus dem Serum isoliert und dieses Eluat mittels TXRF und im ELISA auf seinen Se- und SELENOP-Gehalt hin untersucht. Der Einfluss des Alters bei Frauen in der linearen Regressionsanalyse verschwand in der Untersuchung des isolierten Moleküls (Tab. 2). Unabhängig von Alter oder Geschlecht konnte ein Se zu SELENOP Verhältnis von  $5,4 \pm 0,5$  (MW  $\pm$  SD) mit der vorgenommenen Assay-Kalibrierung ermittelt werden (Abb. 2B).

Tabelle 2: Geschlechtsspezifische lineare Regressionsanalysen von Selen und SELENOP.

Kohorte	Sex	N	Modell	Prädiktor	Angepasstes R <sup>2</sup>	B (95% CI)	Beta	P
1	männlich	43	1	Se	0,577	0,052 (0,038; 0,066)	0,766	0 #
			2	Se	0,568	0,053 (0,039; 0,067)	0,771	0 #
				Alter		0,003 (-0,012; 0,019)	0,045	0,664 ns
	weiblich	56	1	Se	0,319	0,035 (0,021; 0,048)	0,576	0 #
			2	Se	0,349	0,034 (0,021; 0,047)	0,569	0 #
				Alter		0,016 (-0,001; 0,033)	0,203	0,068 ns
2 Serum	männlich	20	1	Se	0,909	0,064 (0,054; 0,074)	0,956	0 #
			2	Se	0,903	0,064 (0,054; 0,075)	0,956	0 #
				Alter		0,000 (-0,007; 0,007)	-0,001	0,994 ns
	weiblich	20	1	Se	0,361	0,047 (0,018; 0,077)	0,628	0,003 **
			2	Se	0,705	0,049 (0,030; 0,069)	0,655	0 #
				Alter		0,015 (0,008; 0,022)	0,585	0 #
2 Eluat	männlich	20	1	Se	0,899	0,126 (0,106; 0,146)	0,951	0 #
			2	Se	0,893	0,126 (0,105; 0,148)	0,954	0 #
				Alter		0,001 (-0,007; 0,008)	0,015	0,851 ns
	weiblich	20	1	Se	0,738	0,118 (0,084; 0,151)	0,867	0 #
			2	Se	0,742	0,114 (0,080; 0,148)	0,84	0 #
				Alter		0,004 (-0,003; 0,011)	0,136	0,27 ns

In Anlehnung an Table 1 aus [32]. Untersuchung des Einflusses von Selen (Modell 1) bzw. von Selen und Alter (Modell 2) auf das SELENOP im Serum in zwei Kohorten und im Eluat nach Immunaffinitätschromatographie in Kohorte 2. Der Effekt von Se auf SELENOP war bei Männern deutlich stärker ausgeprägt als bei Frauen. Das Alter hatte nur eine Auswirkung bei den weiblichen Probanden auf das SELENOP, was sich vor allem in der Kohorte 2 zeigte, die vom Studiendesign auf das Alter ausgelegt war. Nach der Aufreinigung von SELENOP aus Serum der Kohorte 2 verschwand der altersabhängige Geschlechtsdimorphismus. Somit erscheint der Selengehalt des isolierten SELENOP unabhängig von Alter und Geschlecht. P < 0.0001 (#); P < 0.01 (\*\*); nicht signifikant (ns).

Im Serum vor der Aufreinigung war dieses Verhältnis bei jungen Frauen deutlich höher als in den anderen Gruppen, was zu dem beobachteten Korrelationsunterschied führte (Abb. 2A). So ist auch der prozentuale Anteil des Gesamtselens zugehörig zum SELENOP in der Gruppe der jungen Frauen signifikant geringer als in den anderen Gruppen (junge Frauen:  $48,3 \pm 5,4\%$ ; junge Männer:  $54,5 \pm 5,5\%$ ; ältere Frauen:  $56,0 \pm 7,3\%$ ; ältere Männer:  $56,1 \pm 8,8\%$ ; MW  $\pm$  SD).

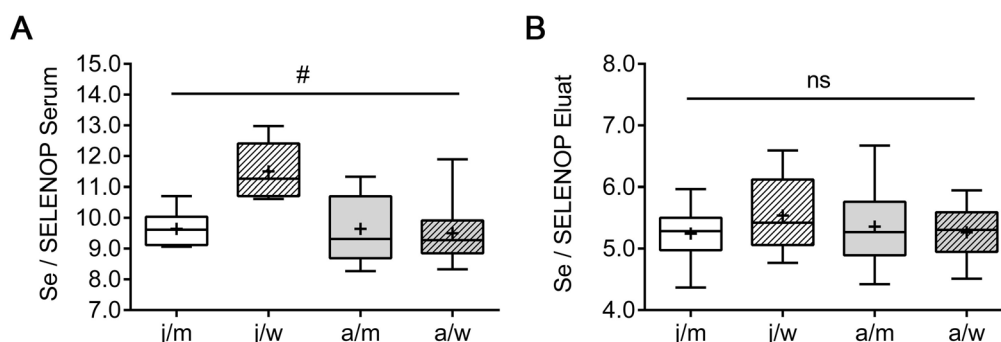
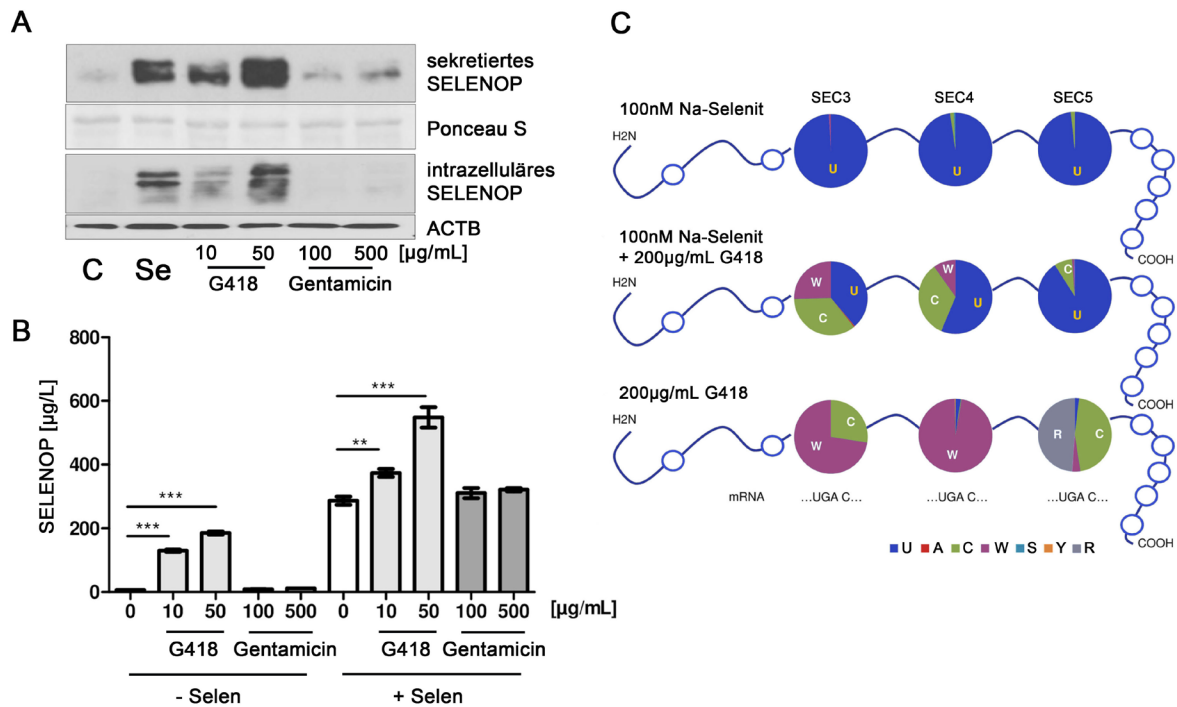


Abbildung 2: In Anlehnung an Figure 6G/H aus [32]. Analyse von 40 Probanden (n=10 pro Gruppe; j/m=junge Männer; j/w=junge Frauen; a/m=ältere Männer; a/w=ältere Frauen) aus der Base-II-Studie hinsichtlich ihres Selen- und SELENOP-Gehaltes im Serum und im immunaffinitätsgereinigten Eluat mittels eines anti-SELENOP-Antikörpers. Boxplot mit Mittelwert (+) und 5-95ter Perzentile der Se zu SELENOP Verhältnisse des (A) Serums und (B) Eluates. Das Se/SELENOP Verhältnis war im Serum bei jungen Frauen signifikant höher als in den anderen Gruppen. Nach der SELENOP-Anreicherung verschwand dieser Unterschied.



## 6.4 Aminoglykoside führen zur Selenverarmung des SELENOP

Aminoglykosid-Antibiotika binden in Eukaryonten an die kleine 40S-Untereinheit des Ribosoms, was zum Überlesen des Stopp-Codons führen kann („readthrough“) [35, 36]. Die Effizienz des Überlesens ist beim Sec-spezifischen UGA-Codon höher als bei UAG oder UAA [37], und hängt von der Struktur des SECIS-Elementes, der Nukleinbase an Stelle +4 und dem Se-Status der Zelle ab [38].



**Abbildung 3:** In Anlehnung an Figure 1A (Ausschnitt), 2 und 5A-C aus [39]. *In vitro* Effekte von G418 und Gentamicin auf die SELENOP-Synthese. (A) Kultivierung von HepG2-Zellen für 48 h mit 100 nM Na-Selenit (Se), G418 oder Gentamicin. Western Blot-Analyse zeigte eine starke Erhöhung der SELENOP-Menge unter dem Einfluss von Se und G418, und einen geringen Effekt von Gentamicin. (B) Vermessung der Zellkulturüberstände im SELENOP-ELISA (SEPP1). G418 erhöht die SELENOP-Menge konzentrationsabhängig, während der Effekt von Gentamicin messtechnisch nicht fassbar war. Die Zugabe von Selenit verstärkte die Auswirkung von G418. (Mittelwert ± SEM, n = 6, ANOVA mit Dunnett's Post Hoc Test). (C) Die LC-MS/MS-Analyse der Sec-Positionen drei bis fünf zeigte, dass Selenit die Insertion von Sec begünstigte, während G418 zum Einbau anderer Aminosäuren am UGA-Codon führte. Codon-positionenabhängig wurde Tryptophan (W) an Sec3 und Sec4 präferiert, Cystein (C) und Arginin (R) an Sec5.

Die Auswirkungen auf die SELENOP-Biosynthese sind nicht im Detail charakterisiert und wurden in dieser Arbeit sowohl *in vitro* in Hepatozyten (HepG2, Hep3B und Hepa1-6) als auch *in vivo* in Mäusen untersucht. Als Positivkontrolle wurde das DNA damage-inducible transcript 3 (DDIT3) verwendet [40]. Das Aminoglykosid G418 zeigte auf Transkriptions- und Translationsebene einen starken positiven Einfluss auf die Expression des SELENOP (Abb. 3A-B). Während eine Supplementation mit G418 in HepG2-Zellen schon bei 10-50 µg/mL (22-72 µM) eine hohe SELENOP-Expression bewirkte, waren > 2000 µg/mL (> 1,3 mM) des

Aminoglykosids Gentamicin nötig, um einen vergleichbaren Effekt zu erzielen. HepG2-Zellen wurden in Gegenwart von 100 nM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> oder 200 µg/mL G418 oder deren Kombination kultiviert, um den Effekt von G418 auf SELENOP molekular zu charakterisieren. SELENOP wurde aus dem Zellkulturüberstand isoliert und einer LC-MS/MS-Analyse zugeführt. Die Sec-Positionen drei bis fünf waren bei Zugabe von G418 Codon-spezifisch durch Tryptophan (W), Cystein (C) und Arginin (R) ersetzt (Abb. 3C). Die Zugabe von Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> erhöhte den Anteil von Sec-haltigem SELENOP, während G418 zu einem Se-armen SELENOP führte. Auch in den murinen Hepatozyten Hepa1-6 wurde die SELENOP-Synthese durch G418 beeinflusst. Im Mausversuch ließ sich hingegen kein Effekt von G418 oder Gentamicin auf die zirkulierenden Selenoproteine, wohl aber auf *Ddit3* in der Niere, erkennen.

## 7 Diskussion

Selenoproteine sind an der Regulation vieler physiologischer Prozesse beteiligt. Eine fehlende Translation des gesamten Selenoproteoms ist für den Organismus tödlich [41]. So sind Selenoproteine essentiell für Embryogenese, Wachstum, Fertilität, neurologische Funktionen, Schilddrüsenfunktion, Immunsystem, Sehvermögen und Muskelaufbau [42]. Daher ist es wichtig, den Selenstatus über geeignete Biomarker im Serum oder Plasma zu erfassen.

Bei Veröffentlichungen zum Selenstatus von gesunden Probanden ist auffällig, dass die SELENOP-Werte stark schwanken. Sie reichen im Mittel von 6,7 µg/L in einer türkischen [11], 362 µg/L in einer südkoreanischen [12], 5,3 mg/L in einer japanischen [43] und 52,3 mg/L in einer chinesisch-australischen Studie [13]. Wenn man davon ausgeht, dass 50% des Gesamtselens im Serum via Sec in SELENOP eingebaut ist [14], im Durchschnitt 7,5 Se-Atome pro SELENOP-Molekül vorliegen [26] und das Molekulargewicht von SELENOP im Mittel 51 kDa beträgt, würde das zu Selenkonzentrationen von minimal 0,16 und maximal 1215 µg/L im Serum führen [32]. Beide Extreme liegen entweder weit unter bzw. über den Konzentrationen, die jemals in Menschen gemessen wurden. So wurde in der Region Chinas, wo aufgrund von Se-Mangel die Keshan-Erkrankung auftritt, Selenkonzentrationen von 16-24 µg/L gemessen, während dort, wo aufgrund toxischer Konzentrationen Vergiftungserscheinungen (Selenose) auftreten, Konzentrationen von 357 - 494µg/L beschrieben sind [44]. Diese Diskrepanz ist vor allem auf die Verwendung von kommerziell erhältlichen Immunassays zurückzuführen, die teilweise weder hinsichtlich ihres Immunogens charakterisiert noch mit Hilfe eines Referenz-Materials konzentrationstechnisch kalibriert wurden.

Bei der SELENOP-Konzentrationsermittlung gibt es weltweit noch kein Referenzmaterial. Eine Herausforderung hierbei ist, dass dieses Protein in Abhängigkeit vom Genotyp [45, 46], einem vorzeitigen Syntheseabbruch am UGA-Codon [28], einer sequentiell begrenzten Proteolyse [29] oder einer Sec Substitution durch Cystein (Cys) [30] in unterschiedlichen Varianten vorliegen kann. Das kommerziell erhältliche NIST Standard Referenz Material SRM1950 (SRM1950) wurde bezüglich der Se-Konzentrationen zugehörig zum SELENOP, GPX3 und Selenalbumin charakterisiert [14]. Dadurch konnte in dieser Arbeit eine theoretische Berechnung der SELENOP-Konzentration des SRM1950 erfolgen. Mit 4,44 mg/L SELENOP und 108,5 µg/L Gesamtselen liegen diese Konzentrationen in Größenordnungen, die auch von Experten im Selenfeld bei gesunden Probanden publiziert sind [47-49].

Es ist gelungen, einen hochwertigen ELISA zur Detektion des humanen SELENOP basierend auf monoklonalen Antikörpern aufzubauen. Mit der Publikation und der Kalibrierung am SRM1950 kann zum ersten Mal ein internationaler Vergleich von SELENOP-Konzentrationen in verschiedenen Studien erfolgen. Der neue Test weist im Vergleich zum Referenzassay mit polyklonalen Schafantikörpern [19] nicht nur eine höhere Sensitivität auf [32], sondern stellt aufgrund der Verwendung von Hybridomazellen auch eine theoretisch unerschöpfliche Ressource für die Herstellung der Assays dar. Die Spezifität der Antikörper konnte durch den Nachweis der Selenit stimulierten SELENOP-Synthese in humanen Hepatozyten und die spezifische Detektion des transgen exprimierten SELENOP in Mäusen nachgewiesen werden [33]. Die positive Regulation der SELENOP-Synthese mit steigender Selenit-Zufuhr geht auf die bessere Verfügbarkeit Sec-beladener tRNA und die Erhöhung der Stabilität des Transkripts gegenüber dem Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) zurück [50]. In Zellkultur konnte eine Differenz der Dosis-Wirkungskurve von Selenit auf SELENOP vor allem auf Translationsebene in Abhängigkeit des Kulturmediums beobachtet werden. Dabei verringerte FCS-haltiges Medium signifikant die Differenz zwischen minimaler und maximaler Reaktion auf die Selenit-Stimulation. Durch FCS werden Zytokine und Wachstumsfaktoren in die Zellkultur eingebracht [51, 52]. Für Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Interleukin-6 (IL-6) und Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) konnte in der Literatur eine negative Regulation des *SELENOP*-Promotors *in vitro* gezeigt werden, die durch Stimulationsexperimente in Zellkultur mit HepG2-Zellen [53-56] und mit der Dickdarm Tumorzelllinie Caco-2 bestätigt wurde. Zusätzlich wurden einige Ko-Faktoren der Translation auf mRNA-Ebene unterdrückt [57]. Diese Regulationen könnten auch den geringeren Effekt auf Transkriptionsebene im Vergleich zur Translation des SELENOP in den hier dargestellten Experimenten mit serumfreien und FCS-haltigen Medien erklären.

Es ist bekannt, dass der Selen-Metabolismus geschlechter- und altersspezifische Unterschiede aufweist [17]. Deshalb war in dieser Arbeit von großem Interesse, inwieweit sich dieser altersabhängige Dimorphismus auch in der Korrelation von SELENOP mit dem neuen Test und Gesamtselen im Serum widerspiegelt. Es zeigte sich, dass die Gruppe der jungen und älteren Männer und die der älteren Frauen einen deutlich höheren linearen Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern aufweisen als jüngere Frauen. Die gebildete Ratio Se/SELENOP weist bei gleichen Se- und SELENOP-Konzentrationen in allen Gruppen eine signifikante Erhöhung bei den jungen Frauen im Vergleich zu den anderen drei Gruppen auf. Die Einflussnahme von Kontrazeptiva konnte hierbei nicht nachgewiesen werden. Nach der Isolierung des SELENOP und der Bestimmung des Se-Gehaltes des Proteins war dieser altersabhängige Geschlechtsdimorphismus nicht mehr vorhanden. Mit durchschnittlich  $5,4 \pm 0,5$  Se-Atomen pro SELENOP-Molekül liegt die Beladung deutlich unter dem theoretisch möglichen Wert von 10. Die mangelnde Korrelation von Se und SELENOP und der erhöhte Se/SELENOP-Quotient bei prämenopausalen Frauen könnte ein Hinweis darauf sein, dass GPX3, die immerhin 23% des Se-Anteils im Plasma ausmacht [14, 58], geschlechtsspezifisch reguliert wird. So beschrieben aus unserer Arbeitsgruppe Riese et al. [59], dass 35 Tage (P35) alte weibliche Mäuse bei suffizienter Se-Versorgung eine 1,3-fach höhere GPX-Aktivität im Serum aufwiesen als deren männliche Geschwister. Eine Folgepublikation beschrieb mit ein Jahr alten Mäusen, dass sowohl die GPX- als auch die Se-Werte im Serum keine Geschlechtsabhängigkeit zeigen. Während sich jedoch die Se-Konzentrationen auf dem Niveau der jungen Mäuse hielten, waren die GPX-Aktivitäten in diesen Tieren auf 52% in männlichen und 34% in weiblichen Mäusen gesunken [60], was für einen starken altersabhängigen Effekt spricht, der bei Weibchen stärker ausgeprägt ist. Diese Modellstudien deuten darauf hin, dass GPX3 in jungen weiblichen Individuen einen relativ hohen Se-Anteil darstellt, was den auffälligen Se/SELENOP- Quotienten bei jungen Frauen erklären könnte.

Verschiedene geschlechts- und altersspezifische Stimuli können die Se-Homöostase beeinflussen. Hierzu zählen die Schilddrüsenhormone, deren Konzentrationen über die Selenoproteine DIO1-3 reguliert werden. Schilddrüsenhormone beeinflussen den Selengehalt des Serums über den Schilddrüsenhormon-Rezeptor TR- $\alpha$ 1 [61]. Der TR- $\alpha$ 1 gehört zur Familie der nukleären Rezeptoren, die nach Liganden-Bindung als Transkriptionsfaktoren die Genexpression regulieren, ähnlich wie die Retinsäure-Rezeptoren (RAR), der Vitamin D-Rezeptor (VDR), die Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) und die Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor Proteine (COUP-TF) [62]. Da sich diese Rezeptoren über molekularen Cross-Talk und gemeinsame Transkriptionsfaktoren gegenseitig

beeinflussen, könnten auch andere Hormone und Liganden einen modulierenden Einfluss auf die Selen-Homöostase nehmen, wie es für den Glukokorticoide-Rezeptor (GR) und SELENOP in Zellkultur gezeigt wurde [63]. Eine Störung der hypophysären Wachstumshormons (GH)-Freisetzung kann zu einer geschlechtsdimorphen Verringerung der hepatischen GR-Expression führen [64] und darüber möglicherweise die SELENOP-Expression beeinflussen. Dieser Effekt könnte während der Somatopause des Menschen über den GH-Konzentrationsabfall [65] zu einer altersabhängigen Repression der Transkription des *SELENOP*-Gens führen.

Die Vielfältigkeit der möglichen Einflussfaktoren zeigt sich auch in anderen Studien zu Selen und selenhaltigen Proteinen. In einer Subkohorte einer epidemiologischen Studie aus Athen (ATTICA), Griechenland, wurde eine geschlechtsspezifische Verteilung der Se-Beladung von SELENOP, GPX3 und Selenalbumin berichtet, ohne die dazugehörigen Proteinkonzentrationen zu erfassen [66]. In einer anderen Untersuchung mit jungen gesunden Probanden in Waterloo, Kanada, waren die GPX3-Konzentration und -Aktivität in Frauen höher als in Männern, unabhängig von der Estradiol-Konzentration [67]. Im selben Jahr veröffentlichten Ha und Smith über junge gesunde Frauen in den USA, dass deren GPX3-Aktivität im Plasma positiv mit Plasma-Se und Estradiol korreliert [68]. Eine weitere große Studie (NHANES III) in den USA zeigte, dass Männer eine höhere Se-Konzentration aufweisen als Frauen, und dass nur in Frauen die Se-Konzentration positiv mit dem Alkohol-Konsum korreliert [69]. In dänischen Probanden wiesen Männer eine höhere SELENOP-Konzentration auf als Frauen [70]. Eine Interventionsstudie in den USA berichtete, dass Frauen während einer SeMet-Supplementation mehr Se im Urin ausscheiden als Männer [71]. Eine weitere Subkohorte der ATTICA-Studie zeigte, dass die Gesamtselenkonzentration im Serum mit dem Alter abnimmt [72], während eine dänische Studie berichtete, dass Se und SELENOP mit dem Alter zunehmen [70]. Die hier präsentierte Untersuchung von Korrelationsunterschieden zwischen Se und SELENOP in Abhängigkeit des Geschlechtes und Alters ist bislang einzigartig, aber zu den hier erwähnten Studienergebnissen kompatibel.

Die in dieser Arbeit dargelegten negativen Effekte von Aminoglykosiden auf den korrekten Se-Einbau in SELENOP könnten bei kritischen Erkrankungen wie der Sepsis von großer klinischer Bedeutung sein. Der Se-Status sinkt in der Akutphase durch eine reduzierte Biosynthese von SELENOP ab. Die Verwendung von Aminoglykosiden könnte somit in solchen Erkrankungen zu einem zusätzlichen Absinken des Se-Status und des SELENOP-abhängigen Se-Transports führen. Diese beiden Effekte unterstützen die adjuvanten Therapieansätze, bei denen in der Sepsis und Infektion eine Se-Supplementation erwogen wird. Jedoch beschreibt eine aktuelle Übersichtsarbeit keine eindeutigen Hinweise, dass eine Se-Supplementation bei kritisch

Kranken die Sterblichkeit reduziert. Dies führen die Autoren auf ein potentiell hohes Verzerrungspotential (Bias) der publizierten Studien zurück [25]. Möglich ist, dass die negative Regulation von SELENOP bei der Sepsis verhindern soll, das Infektionserreger vom Se profitieren [3]. Hier sind gut konzipierte Studien mit geringem Bias in Zukunft notwendig, um die Wirkung von Se abschließend zu beurteilen [25].

Die Erfassung des Se/SELENOP- Quotienten im Serum und im isolierten SELENOP stellt eine Erweiterung der spezifischen Biomarker des Se-Status dar. Die altersabhängigen Geschlechtsunterschiede der Korrelation zwischen Gesamtselen und SELENOP-Konzentrationen im Serum zeigen, dass trotz der Se-Sensitivität von SELENOP nicht von einem Biomarker des Se-Status linear auf den anderen geschlossen werden kann. Die Se-Beladung des Moleküls scheint unabhängig von Alter und Geschlecht zu sein, nicht aber unabhängig vom Se-Status und eingenommenen Antibiotika. Somit bleibt es spannend zu klären, inwieweit Se-Verbindungen der Nahrung, der individuelle Genotyp, die akuten endokrinen oder inflammatorischen Signale und andere pharmakologische Interventionen Einfluss auf den Se-Status und den Se/SELENOP- Quotienten nehmen. Von noch größerer Bedeutung ist aber die Frage nach der diagnostischen und prospektiven Bedeutung des Se/SELENOP-Quotienten, und inwieweit dieser zusammengesetzte Biomarker des Selenstatus diagnostisch relevante Zusatzinformationen zu den schon bestehenden Biomarkern des Se-Status für die Gesundheit und Krankheitsrisiken liefert. Dafür sind jedoch weitere Studien mit hochqualitativen klinischen Proben notwendig, die hinsichtlich ihrer Präanalytik auf die entsprechende validierte und vor allem kalibrierte Methodik abgestimmt sind.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Flohe L. *Biochim. Biophys. Acta* 2009;11(403):7.
2. Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, Gladyshev VN. *Science* 2003;300(5624):1439-43.
3. Burk RF, Hill KE. *Annu. Rev. Nutr.* 2015;35:109-34.
4. Xu XM, Carlson BA, Mix H, Zhang Y, Saira K, Glass RS, Berry MJ, Gladyshev VN, Hatfield DL. *PLoS Biol* 2007;5(1).
5. Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN. *Physiol. Rev.* 2014;94(3):739-77.
6. Schomburg L, Schweizer U, Holtmann B, Flohe L, Sendtner M, Kohrle J. *Biochem. J.* 2003;370(Pt 2):397-402.
7. Hill KE, Zhou J, McMahan WJ, Motley AK, Atkins JF, Gesteland RF, Burk RF. *J. Biol. Chem.* 2003;278(16):13640-6.
8. Duntas LH, Benvenga S. *Endocrine* 2015;48(3):756-75.
9. Xia Y, Hill KE, Li P, Xu J, Zhou D, Motley AK, Wang L, Byrne DW, Burk RF. *Am. J. Clin. Nutr.* 2010;92(3):525-31.
10. Burk RF, Norworthy BK, Hill KE, Motley AK, Byrne DW. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2006;15(4):804-10.
11. Altinova AE, Iyidir OT, Ozkan C, Ors D, Ozturk M, Gulbahar O, Bozkurt N, Toruner FB, Akturk M, Cakir N, Arslan M. *Gynecol. Endocrinol.* 2015:1-3.
12. Yang SJ, Hwang SY, Choi HY, Yoo HJ, Seo JA, Kim SG, Kim NH, Baik SH, Choi DS, Choi KM. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(8):2011-0620.
13. Chen M, Liu B, Wilkinson D, Hutchison AT, Thompson CH, Wittert GA, Heilbronn LK. *Obes Res Clin Pract* 2016;11(16):30070-9.
14. Ballihaut G, Kilpatrick LE, Davis WC. *Anal. Chem.* 2011;83(22):8667-74.
15. Ballihaut G, Kilpatrick LE, Kilpatrick EL, Davis WC. *Metallomics* 2012;4(6):533-8.
16. Combs GF, Jr. *Nutrients* 2015;7(4):2209-36.
17. Schomburg L, Schweizer U. *Biochim. Biophys. Acta* 2009;11(62):25.
18. Xu XM, Turanov AA, Carlson BA, Yoo MH, Everley RA, Nandakumar R, Sorokina I, Gygi SP, Gladyshev VN, Hatfield DL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010;107(50):21430-4.
19. Hollenbach B, Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A, Kohrle J, Schomburg L. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2008;22(1):24-32.
20. Renko K, Hofmann PJ, Stoedter M, Hollenbach B, Behrends T, Kohrle J, Schweizer U, Schomburg L. *FASEB J.* 2009;23(6):1758-65.
21. Forceville X, Mostert V, Pierantoni A, Vitoux D, Le Toumelin P, Plouvier E, Dehoux M, Thuillier F, Combes A. *Eur. Surg. Res.* 2009;43(4):338-47.
22. Obiero CW, Seale AC, Berkley JA. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2015;34(6):659-61.
23. Tobe R, Naranjo-Suarez S, Everley RA, Carlson BA, Turanov AA, Tsuji PA, Yoo MH, Gygi SP, Gladyshev VN, Hatfield DL. *J. Biol. Chem.* 2013;288(21):14709-15.
24. Forceville X, Vitoux D, Gauzit R, Combes A, Lahilaire P, Chappuis P. *Crit. Care Med.* 1998;26(9):1536-44.
25. Allingstrup M, Afshari A. *Cochrane Database Syst Rev* 2015;27(7).
26. Burk RF, Hill KE. *J. Nutr.* 1994;124(10):1891-7.
27. Hill KE, Zhou J, Austin LM, Motley AK, Ham AJ, Olson GE, Atkins JF, Gesteland RF, Burk RF. *J. Biol. Chem.* 2007;282(15):10972-80.
28. Ma S, Hill KE, Caprioli RM, Burk RF. *J. Biol. Chem.* 2002;277(15):12749-54.
29. Saito Y, Sato N, Hirashima M, Takebe G, Nagasawa S, Takahashi K. *Biochem. J.* 2004;381(Pt 3):841-6.
30. Turanov AA, Everley RA, Hybsier S, Renko K, Schomburg L, Gygi SP, Hatfield DL, Gladyshev VN. *PLoS One* 2015;10(10).
31. Read R, Bellew T, Yang JG, Hill KE, Palmer IS, Burk RF. *J. Biol. Chem.* 1990;265(29):17899-905.
32. Hybsier S, Schulz T, Wu Z, Demuth I, Minich WB, Renko K, Rijntjes E, Kohrle J, Strasburger CJ, Steinhagen-Thiessen E, Schomburg L. *Redox Biol* 2017;11:403-14.
33. Renko K, Werner M, Renner-Muller I, Cooper TG, Yeung CH, Hollenbach B, Scharpf M, Kohrle J, Schomburg L, Schweizer U. *Biochem. J.* 2008;409(3):741-9.
34. Bertram L, Bockenhoff A, Demuth I, Duzel S, Eckardt R, Li SC, Lindenberger U, Pawelec G, Siedler T, Wagner GG, Steinhagen-Thiessen E. *Int. J. Epidemiol.* 2014;43(3):703-12.
35. Poulidakos P, Falagas ME. *Expert Opin Pharmacother* 2013;14(12):1585-97.
36. Malik V, Rodino-Klapac LR, Viollet L, Mendell JR. *Ther Adv Neurol Disord* 2010;3(6):379-89.
37. Howard MT, Shirts BH, Petros LM, Flanigan KM, Gesteland RF, Atkins JF. *Ann. Neurol.* 2000;48(2):164-9.
38. Martitz J, Hofmann PJ, Johannes J, Kohrle J, Schomburg L, Renko K. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2016;37:104-10.

39. Renko K, Martitz J, Hybsier S, Heynisch B, Voss L, Everley RA, Gygi SP, Stoedter M, Wisniewska M, Kohrle J, Gladyshev VN, Schomburg L. *Sci Rep* 2017;7(1):017-04586.
40. Tao L, Segil N. *Front Cell Neurosci* 2015;9(190).
41. Bosl MR, Takaku K, Oshima M, Nishimura S, Taketo MM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997;94(11):5531-4.
42. Kasaikina MV, Hatfield DL, Gladyshev VN. *Biochim Biophys Acta* 2012;9(42):13.
43. Saito Y, Watanabe Y, Saito E, Honhoh T, Takahashi K. *J Health Sci* 2001;47(4):346-52.
44. Combs GF, Jr. *Br. J. Nutr.* 2001;85(5):517-47.
45. Meplan C, Nicol F, Burtle BT, Crosley LK, Arthur JR, Mathers JC, Hesketh JE. *Antioxid Redox Signal* 2009;11(11):2631-40.
46. Hellwege JN, Palmer ND, Ziegler JT, Langefeld CD, Lorenzo C, Norris JM, Takamura T, Bowden DW. *Gene* 2014;534(1):33-9.
47. Xia Y, Hill KE, Byrne DW, Xu J, Burk RF. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005;81(4):829-34.
48. Hurst R, Armah CN, Dainty JR, Hart DJ, Teucher B, Goldson AJ, Broadley MR, Motley AK, Fairweather-Tait SJ. *Am. J. Clin. Nutr.* 2010;91(4):923-31.
49. Saito Y, Watanabe Y, Saito E, Honjoh T, Takahashi K. *Journal of Health Science* 2001;47(4):346-52.
50. Seyedali A, Berry MJ. *RNA* 2014;20(8):1248-56.
51. van der Valk J, Bieback K, Buta C, Cochrane B, Dirks WG, Fu J, Hickman JJ, Hohensee C, Kolar R, Liebsch M, Pistollato F, Schulz M, Thieme D, Weber T, Wiest J, Winkler S, Gstraunthaler G. *Altex* 2017;9(10):1705101.
52. Zheng X, Baker H, Hancock WS, Fawaz F, McCaman M, Pungor E, Jr. *Biotechnology Progress* 2006;22(5):1294-300.
53. Dreher I, Jakobs TC, Kohrle J. *J. Biol. Chem.* 1997;272(46):29364-71.
54. Mostert V, Dreher I, Kohrle J, Abel J. *FEBS Letters* 1999;460(1):23-6.
55. Mostert V, Wolff S, Dreher I, Kohrle J, Abel J. *Eur. J. Biochem.* 2001;268(23):6176-81.
56. Martitz J, Becker NP, Renko K, Stoedter M, Hybsier S, Schomburg L. *Metallomics* 2015;7(11):1515-21.
57. Speckmann B, Pinto A, Winter M, Forster I, Sies H, Steinbrenner H. *Free Radic. Biol. Med.* 2010;49(5):777-85.
58. Avissar N, Ornt DB, Yagil Y, Horowitz S, Watkins RH, Kerl EA, Takahashi K, Palmer IS, Cohen HJ. *Am. J. Physiol.* 1994;266(2 Pt 1):C367-75.
59. Riese C, Michaelis M, Mentrup B, Gotz F, Kohrle J, Schweizer U, Schomburg L. *Endocrinology* 2006;147(12):5883-92.
60. Schomburg L, Riese C, Renko K, Schweizer U. *Biol. Chem.* 2007;388(10):1035-41.
61. Mittag J, Behrends T, Hoefig CS, Vennstrom B, Schomburg L. *PLoS One* 2010;5(9):0012931.
62. Yen PM. *Physiol. Rev.* 2001;81(3):1097-142.
63. Rock C, Moos PJ. *Biometals* 2009;22(6):995-1009.
64. Rando G, Wahli W. *Biochimica et Biophysica Acta* 2011;8:964-73.
65. Chahal HS, Drake WM. *Journal of Pathology* 2007;211(2):173-80.
66. Letsiou S, Nomikos T, Panagiotakos DB, Pergantis SA, Fragopoulou E, Pitsavos C, Stefanadis C, Antonopoulou S. *Biofactors* 2014;40(5):524-35.
67. Rush JW, Sandiford SD. *Clin. Biochem.* 2003;36(5):345-51.
68. Ha EJ, Smith AM. *J. Am. Coll. Nutr.* 2003;22(1):43-51.
69. Kafai MR, Ganji V. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2003;17(1):13-8.
70. Rasmussen LB, Hollenbach B, Laurberg P, Carle A, Hog A, Jorgensen T, Vejbjerg P, Ovesen L, Schomburg L. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2009;23(4):265-71.
71. Combs GF, Jr., Jackson MI, Watts JC, Johnson LK, Zeng H, Idso J, Schomburg L, Hoeg A, Hoefig CS, Chiang EC, Waters DJ, Davis CD, Milner JA. *Br. J. Nutr.* 2012;107(10):1514-25.
72. Letsiou S, Nomikos T, Panagiotakos D, Pergantis SA, Fragopoulou E, Antonopoulou S, Pitsavos C, Stefanadis C. *Biol. Trace Elem. Res.* 2009;128(1):8-17.



## 9 Eidesstattliche Versicherung

"Ich, Sandra Hybsier, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einflussfaktoren auf Biomarker des Selenstatus ermittelt mit einem neu etablierten und kalibrierten Selenoprotein P ELISA“ selbständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

---

Unterschrift

## 10 Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Sandra Hybsier hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

**Publikation 1:** Anton A. Turanov, Robert A. Everley, **Sandra Hybsier**, Kostja Renko, Lutz Schomburg, Steven P. Gygi, Dolph L. Hatfield, Vadim N. Gladyshev; Regulation of Selenocysteine Content of Human Selenoprotein P by Dietary Selenium and Insertion of Cysteine in Place of Selenocysteine, PLoS One, 2015

Impact Factor 2015: 3.057, Eigenfactor Score: 1.814, Rank 11/63 (Q1), Multidisciplinary Sciences (InCites, Journal Citation Reports, Thomson Reuters Corp.)

Beitrag im Einzelnen: Isolierung von SELENOP aus humanem Plasma, Charakterisierung des isolierten SELENOP, Beitrag zum Text; entsprechend Fig. 2 (teilweise) + S1 (vollständig).

**Publikation 2:** **Sandra Hybsier**, Torsten Schulz, Zida Wu, Ilja Demuth, Waldemar B. Minich, Kostja Renko, Eddy Rijntjes, Josef Köhrle, Christian J. Strasburger, Elisabeth Steinhagen-Thiessen, Lutz Schomburg; Sex-specific and inter-individual differences in biomarkers of selenium status identified by a calibrated ELISA for selenoprotein P, Redox Biology, 2016

Impact Factor 2016: 6.337, Eigenfactor Score: 0.00915, Rank 34/290 (Q1), Biochemistry & Molecular Biology (InCites, Journal Citation Reports, Thomson Reuters Corp.)

Beitrag im Einzelnen: Planung der Experimente, Herstellung und Charakterisierung der Antikörper gegen humanes SELENOP, Isolierung und Charakterisierung des Antigens aus Serum, Entwicklung, Validierung und Kalibrierung des Assays, Zellkulturversuche, Untersuchungen zum altersabhängigen Geschlechtsdimorphismus, entscheidende Beiträge zum Text, entsprechend Fig. 1-6, Table 1, Supplemental Table 1+2 (vollständig).

**Publikation 3:** Kostja Renko, Janine Martitz, **Sandra Hybsier**, Bjoern Heynisch, Linn Voss, Robert A. Everley, Steven P. Gygi, Mette Stoedter, Monika Wisniewska, Josef Köhrle, Vadim N. Gladyshev, Lutz Schomburg; Aminoglycoside-driven biosynthesis of selenium-deficient Selenoprotein P, Scientific Reports, 2017

Impact Factor 2016: 4.259, Eigenfactor Score: 0.3874, Rank 10/64 (Q1), Multidisciplinary Sciences (InCites, Journal Citation Reports, Thomson Reuters Corp.)

Beitrag im Einzelnen: Bereitstellung des neuen ELISAs zur Analyse von SELENOP Konzentrationen, Reinigung von SELENOP aus Zellkulturmedium, Auswertung der MS-Daten, Beitrag zum Text; entsprechend Fig. 1, 2, 4, 5 (je teilweise).

Unterschrift, Datum und Stempel des

betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

## 11 Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

### 11.1 Regulation of Selenocysteine Content of Human Selenoprotein P by Dietary Selenium and Insertion of Cysteine in Place of Selenocysteine.

Anton A. Turanov, Robert A. Everley, **Sandra Hybsier**, Kostja Renko, Lutz Schomburg, Steven P. Gygi, Dolph L. Hatfield, Vadim N. Gladyshev; Regulation of Selenocysteine Content of Human Selenoprotein P by Dietary Selenium and Insertion of Cysteine in Place of Selenocysteine, PLoS One, 2015

Impact Factor 2015: 3.057, Eigenfactor Score: 1.814, Rank 11/63 (Q1), Multidisciplinary Sciences (InCites, Journal Citation Reports, Thomson Reuters Corp.)

URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140353>

11.2 Sex-specific and inter-individual differences in biomarkers of selenium status identified by a calibrated ELISA for selenoprotein P.

**Sandra Hybsier**, Torsten Schulz, Zida Wu, Ilja Demuth, Waldemar B. Minich, Kostja Renko, Eddy Rijntjes, Josef Köhrle, Christian J. Strasburger, Elisabeth Steinhagen-Thiessen, Lutz Schomburg; Sex-specific and inter-individual differences in biomarkers of selenium status identified by a calibrated ELISA for selenoprotein P, Redox Biology, 2016

Impact Factor 2016: 6.337, Eigenfactor Score: 0.00915, Rank 34/290 (Q1), Biochemistry & Molecular Biology (InCites, Journal Citation Reports, Thomson Reuters Corp.)

URL: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.025>

11.3 Aminoglycoside-driven biosynthesis of selenium-deficient Selenoprotein P.

Kostja Renko, Janine Martitz, **Sandra Hybsier**, Bjoern Heynisch, Linn Voss, Robert A. Everley, Steven P. Gygi, Mette Stodter, Monika Wisniewska, Josef Köhrle, Vadim N. Gladyshev, Lutz Schomburg; Aminoglycoside-driven biosynthesis of selenium-deficient Selenoprotein P, Scientific Reports, 2017

Impact Factor 2016: 4.259, Eigenfactor Score: 0.3874, Rank 10/64 (Q1), Multidisciplinary Sciences (InCites, Journal Citation Reports, Thomson Reuters Corp.)

URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04586-9>

## **12 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

### 13 **Komplette Publikationsliste**

1. Krassas GE, Pontikides N, Tziomalos K, Tzotzas T, Zosin I, Vlad M, Luger A, Gessl A, Marculescu R, Toscano V, Morgante S, Papini E, Pirags V, Konrade I, **Hybsier S**, Hofmann PJ, Schomburg L, Köhrle J. Selenium status in patients with autoimmune and non-autoimmune thyroid diseases from four European countries. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism* 2014;9(6):685-92.
2. Hughes DJ, Fedirko V, Jenab M, Schomburg L, Meplan C, Freisling H, Bueno-de-Mesquita HB, **Hybsier S**, Becker NP, Czuban M, Tjonneland A, Outzen M, Boutron-Ruault MC, Racine A, Bastide N, Kuhn T, Kaaks R, Trichopoulos D, Trichopoulou A, Lagiou P, Panico S, Peeters PH, Weiderpass E, Skeie G, Dagrund E, Chirlaque MD, Sanchez MJ, Ardanaz E, Ljuslinder I, Wennberg M, Bradbury KE, Vineis P, Naccarati A, Palli D, Boeing H, Overvad K, Dorronsoro M, Jakszyn P, Cross AJ, Quiros JR, Stepien M, Kong SY, Duarte-Salles T, Riboli E, Hesketh JE. Selenium status is associated with colorectal cancer risk in the European prospective investigation of cancer and nutrition cohort. *Int. J. Cancer* 2015;136(5):1149-61.
3. Martitz J, Becker NP, Renko K, Stoedter M, **Hybsier S**, Schomburg L. Gene-specific regulation of hepatic selenoprotein expression by interleukin-6. *Metallomics* 2015;7(11):1515-21.
4. Turanov AA, Everley RA, **Hybsier S**, Renko K, Schomburg L, Gygi SP, Hatfield DL, Gladyshev VN. Regulation of Selenocysteine Content of Human Selenoprotein P by Dietary Selenium and Insertion of Cysteine in Place of Selenocysteine. *PLoS One* 2015;10(10).
5. Hughes DJ, Duarte-Salles T, **Hybsier S**, Trichopoulou A, Stepien M, Aleksandrova K, Overvad K, Tjonneland A, Olsen A, Affret A, Fagherazzi G, Boutron-Ruault MC, Katzke V, Kaaks R, Boeing H, Bamia C, Lagiou P, Peppas E, Palli D, Krogh V, Panico S, Tumino R, Sacerdote C, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Engeset D, Weiderpass E, Lasheras C, Agudo A, Sanchez MJ, Navarro C, Ardanaz E, Dorronsoro M, Hemmingsson O, Wareham NJ, Khaw KT, Bradbury KE, Cross AJ, Gunter M, Riboli E, Romieu I, Schomburg L, Jenab M. Prediagnostic selenium status and hepatobiliary cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. *Am. J. Clin. Nutr.* 2016;104(2):406-14.
6. Wiehe L, Cremer M, Wisniewska M, Becker NP, Rijntjes E, Martitz J, **Hybsier S**, Renko K, Buhner C, Schomburg L. Selenium status in neonates with congenital infection. *Br. J. Nutr.* 2016;116(3):504-13.
7. Ambroziak U, **Hybsier S**, Shahnazaryan U, Krasnodebska-Kiljanska M, Rijntjes E, Bartoszewicz Z, Bednarczyk T, Schomburg L. Severe selenium deficits in pregnant women irrespective of autoimmune thyroid disease in an area with marginal selenium intake. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2017;44:186-91.
8. **Hybsier S**, Schulz T, Wu Z, Demuth I, Minich WB, Renko K, Rijntjes E, Köhrle J, Strasburger CJ, Steinhagen-Thiessen E, Schomburg L. Sex-specific and inter-individual differences in biomarkers of selenium status identified by a calibrated ELISA for selenoprotein P. *Redox Biol* 2017;11:403-14.

9. Renko K, Martitz J, **Hybsier S**, Heynisch B, Voss L, Everley RA, Gygi SP, Stoedter M, Wisniewska M, Kohrle J, Gladyshev VN, Schomburg L. Aminoglycoside-driven biosynthesis of selenium-deficient Selenoprotein P. *Sci Rep* 2017;7(1):017-04586.
10. Stepien M, Hughes DJ, **Hybsier S**, Bamia C, Tjonneland A, Overvad K, Affret A, His M, Boutron-Ruault MC, Katzke V, Kuhn T, Aleksandrova K, Trichopoulou A, Lagiou P, Orfanos P, Palli D, Sieri S, Tumino R, Ricceri F, Panico S, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Weiderpass E, Lasheras C, Bonet Bonet C, Molina-Portillo E, Dorransoro M, Huerta JM, Barricarte A, Ohlsson B, Sjoberg K, Werner M, Shungin D, Wareham N, Khaw KT, Travis RC, Freisling H, Cross AJ, Schomburg L, Jenab M. Circulating copper and zinc levels and risk of hepatobiliary cancers in Europeans. *Br. J. Cancer* 2017;116(5):688-96.



## 14 Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen, denen ich nachfolgend meinen herzlichsten Dank aussprechen möchte.

Voran stelle ich alle Institutsmitglieder der Experimentellen Endokrinologie der Charité, die für eine nette und kollektive Arbeitsatmosphäre gesorgt haben.

Im Besonderen danke ich Prof. Dr. Lutz Schomburg für sein Mentoring bei dieser Arbeit. Seine Fachkompetenz im Bereich Biochemie war für mich eine Bereicherung für meine eigene Arbeit. Sein Ideenreichtum reicht für mehr als ein Wissenschaftlerleben.

Weiterhin wird mir Prof. Dr. Josef Köhrle in Erinnerung bleiben, der aufgrund seines Engagements als Institutsdirektor bis 2017 häufig mit mir als Letztes das Institut verließ.

Prof. Dr. Christian Strasburger und Dr. Zida Wu konnten durch ihre Hilfestellung bei der Entwicklung monoklonaler Antikörper in den Laboren der Medizinischen Klinik für Endokrinologie der Charité entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beitragen.

Auch Dr. Waldemar Minich, der durch sein enormes Wissen im Bereich der Herstellung rekombinanter Proteine einen unschätzbaren Wert für das Institut darstellt, erkenne ich seinen Beitrag in diesem Bereich zu dieser Arbeit hoch an.

Dr. Kostja Renko war für mich eine wertvolle Unterstützung in wissenschaftlichen Fragen rund ums Labor. Seinen Erfindergeist fand ich sehr beeindruckend. Durch ihn habe ich mich mit dem Einfluss von Aminoglykosiden auf Selenoproteine beschäftigt.

Vartitèr Seher, Carola Geiler, Katja Schreiber, Sabine Wricke und Sabine Kaiser. All diese Menschen haben in mühsamer technischer Assistenz Daten für mich und mit mir produziert.

An Frau Elke Abdel-Karim entsinne ich mich mit Wertschätzung an ihre stetige Hilfe im Sekretariat.

Den Mitarbeitern der ICI GmbH und InVivo GmbH, insbesondere Siegmund Karasch und Torsten Schulz, danke ich für die Bereitstellung der industriellen Peripherie für die Herstellung des ELISAs im Großmaßstab und für den großartigen kollektiven Beitrag.

Abschließend möchte ich meinen Dank meiner Frau Constance für die jahrelange Unterstützung und meinem Sohn Hugo aussprechen, der nach monatelangen schlaflosen Nächten ein humanes Schlafverhalten an die Nacht legte und damit die Beendigung dieser Arbeit in meiner Elternzeit möglich machte.