



Regulation der hepatischen Biosynthese von Selenoprotein P

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Bodo Speckmann
aus Mainz

Düsseldorf, Oktober 2009

aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. H. Sies
Koreferent: Prof. L. Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.2009

„Begriffe ohne Anschauungen sind leer,
Anschauungen ohne Begriffe sind blind“

Immanuel Kant

Für meine Eltern!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das essentielle Spurenelement Selen	1
1.1.1	Selenstoffwechsel	1
1.1.2	Selenoproteine	4
1.1.3	„Optimale“ Selenversorgung und Gesundheit	7
1.2	Der Selentransporter Selenoprotein P	10
1.2.1	Eigenschaften und Funktionen von Selenoprotein P	10
1.2.1.1	Funktion von Selenoprotein P als Selentransporter	11
1.2.1.2	Antioxidative Funktion von Selenoprotein P	13
1.2.2	Regulation der Transkription und Translation von Selenoprotein P	14
1.2.2.1	Transkriptionelle Regulation	14
1.2.2.2	Posttranskriptionelle Regulation	15
1.3	Regulation der hepatischen Genexpression durch HNF-4 α , FoxO1 α und PGC-1 α	16
1.3.1	Der Transkriptionsfaktor HNF-4 α	16
1.3.2	Der PI3K/Akt/FoxO-Signalweg	18
1.3.3	Der transkriptionelle Koaktivator PGC-1 α	20
1.3.4	Kooperation von HNF-4 α , FoxO1 α und PGC-1 α bei der Transkriptionskontrolle von hepatischen Genen	21
2	Zielsetzung	25
3	Material und Methoden	26
3.1	Material	26
3.1.1	Puffer und Lösungen	26
3.1.2	Zellkulturmaterialien	27
3.1.2.1	Zellen	27
3.1.3	Kulturmedien	27
3.1.3.1	Bakterienzellkultur	28
3.1.4	Antikörper	29
3.1.4.1	Primäre Antikörper	29
3.1.4.2	Sekundäre Antikörper	29
3.1.5	Enzyme	29
3.1.6	Plasmide	30
3.1.7	Kits und Hilfsmaterialien	30
3.2	Methoden	31
3.2.1	Zellbiologische Methoden	31
3.2.1.1	Allgemeine Zellkultur	31
3.2.1.2	Bestimmung der Zellviabilität mittels MTT-Test	31
3.2.1.3	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen	32
3.2.1.4	Luziferaseassay	32
3.2.2	Immunologische Methoden	33
3.2.2.1	Western Blot	33
3.2.2.2	<i>In-situ</i> Immunfluoreszenz	33
3.2.3	Molekularbiologische Methoden	34
3.2.3.1	RNA-Isolierung und reverse Transkription	34
3.2.3.2	Polymerase chain reaction	35
3.2.3.3	Klonierung von DNA	38
3.2.3.4	Ortsspezifische <i>in-vitro</i> Mutagenese von DNA	41
3.2.3.5	Isolierung nukleärer Proteine und Electrophoretic mobility shift assay	42

4	Ergebnisse	44
4.1	Transkriptionelle Regulation von Selenoprotein P durch HNF-4 α , FoxO1a und PGC-1 α	44
4.1.1	Stimulierung der SeP-Promotoraktivität durch PGC-1 α und FoxO1a in HepG2-Zellen	44
4.1.1.1	Etablierung der transienten PGC-1 α -Überexpression	44
4.1.1.2	Stimulierung der SeP-Promotoraktivität durch PGC-1 α und FoxO1a	48
4.1.2	Identifizierung und Charakterisierung einer Bindestelle für HNF-4 α im humanen SeP-Promotor	52
4.1.2.1	Nachweis der Bindung von HNF-4 α an den humanen SeP-Promotor	55
4.1.3	HNF-4 α -vermittelte gewebespezifische Expression von Selenoprotein P	57
4.1.3.1	Vergleich der mRNA-Expression von Selenoprotein P sowie der drei Faktoren HNF-4 α , FoxO1a und PGC-1 α in Leber- und Hirnzellen	58
4.1.3.2	Transiente Überexpression von HNF-4 α in SH-SY5Y-Zellen	60
4.1.4	Regulation der SeP-Promotoraktivität in humanen Neuroblastomzellen	62
4.2	Hormonelle Regulation der hepatischen Selenoprotein P-Biosynthese	65
4.2.1	Regulation der Biosynthese von Selenoprotein P durch Modulation der endogenen PGC-1 α -Expression	66
4.3	Die Modulation der hepatischen Selenoprotein P-Expression durch die Glucosekonzentration.....	70
4.4	Die Inhibierung der hepatischen SeP-Expression durch Metformin.....	72
4.4.1	Einfluss von Metformin auf die mRNA-Expression von Faktoren der Selenoproteinbiosynthese.....	77
4.4.2	Beteiligung von intrazellulären Signalkaskaden an der Regulation der hepatischen SeP-Expression durch Metformin	79
4.4.2.1	Aktivierung der AMPK in Hepatocyten durch Metformin	79
4.4.2.2	Modulation der SeP mRNA-Expression durch die AMPK.....	81
4.4.2.3	Die Metformin-induzierte Inhibierung der SeP mRNA-Expression ist unabhängig von der AMPK-Aktivierung	83
5	Diskussion	85
5.1	Die Regulation der Selenoprotein P-Expression durch den HNF-4 α / FoxO1a / PGC1 α -Transkriptionskomplex	85
5.1.1	Die Bedeutung von HNF-4 α für die gewebespezifische Expression von Selenoprotein P	86
5.2	Die hormonelle Regulation der hepatischen Selenoprotein P-Expression.....	88
5.3	Die Modulation der hepatischen Selenoprotein P-Expression durch die extrazelluläre Glucosekonzentration	90
5.4	Die Inhibierung der hepatischen SeP-Expression und Sekretion durch Metformin	93
5.5	Ausblick: Selen und Typ 2 Diabetes	99
5.5.1	Beeinflussung der Selenhomöostase durch den Kohlenhydratstoffwechsel ..	100
5.5.2	Beeinflussung der Insulinsignalwirkung durch Selen bzw. Selenoproteine ..	101
6	Zusammenfassung.....	104
7	Literaturverzeichnis.....	106
8	Abkürzungen	130
9	Publikationen.....	132
10	Danksagung.....	133

1 Einleitung

1.1 Das essentielle Spurenelement Selen

Das Element Selen wurde im Jahre 1817 durch den schwedischen Chemiker Jöns Jakob Berzelius entdeckt, der es aufgrund seiner chemischen Verwandtschaft mit dem Gruppennomologen Element Tellur (lat. Tellus = Erde) nach der griechischen Göttin des Mondes Selene benannte. Zunächst wurde es wegen seiner hohen akuten Toxizität für Mensch und Tier lediglich als Gift betrachtet, bis in den 1950er Jahren erstmals protektive Wirkungen von Selen im Säugerorganismus beobachtet wurden. So zeigte sich, dass die Supplementation der Nahrung mit Selen in Form verschiedener organischer wie anorganischer Verbindungen einer Lebernekrose in Ratten vorbeugt (Schwarz und Folz 1957; Schwarz und Folz 1958). Die Identifizierung des ersten Selenoenzyms in Säugetieren, der Glutathionperoxidase (Flohé et al., 1973; Rotruck et al., 1973), bildete die Grundlage für die weitere Erforschung der biochemischen Funktionen von Selen.

Die Aufnahme von Selen erfolgt über die Nahrung; gute Selenquellen sind Fisch, Getreide und Gemüse wie z.B. Zwiebel, Knoblauch oder Brokkoli. Der Selengehalt von pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln ist vom Anbaustandort abhängig; durch große regionale Unterschiede im Selengehalt von Böden und Pflanzen sind Bevölkerungen deshalb unterschiedlich gut mit Selen versorgt. In Deutschland wird die durchschnittliche Selenaufnahme auf 35 µg pro Tag geschätzt (Alfthan und Neve 1996) und befindet sich damit am unteren Ende der gegenwärtig empfohlenen Tagesdosis von 30-70 µg (Rayman 2004).

1.1.1 Selenstoffwechsel

Der Metabolismus von Selen ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt: über die Nahrung werden organische und anorganische Selenverbindungen wie z.B. die Aminosäuren Selenomethionin, Selenocystein und Se-Methylselenocystein sowie die Anionen Selenit und Selenat aufgenommen. Selenit und Selenat werden nicht-enzymatisch zu Selenodiglutathion und anschließend durch NADPH-abhängige Reduktasen zum zentralen Metaboliten Selenwasserstoff reduziert (Ganther 1999). Selenomethionin kann während der Translation anstelle von Methionin in Proteine eingebaut werden, wodurch unspezifische, nicht durch die mRNA codierte Selenoproteine entstehen. Der Abbau von Selenomethionin erfolgt mit den Enzymen der Cysteinbiosynthese über Selenohomocystein und Selenocystathionin zum

Selenocystein (Kajander et al., 1991). Selenocystein wiederum wird durch eine spezifische β -Lyase zu Alanin und Selenwasserstoff abgebaut (Esaki et al., 1982). Ausscheidungsformen von Selen sind die Methylierungsprodukte des Selenwasserstoffs Dimethylselenid und Trimethylselenonium sowie der Selenozucker 1- β -Methylseleno-N-acetyl-D-galactosamin (Suzuki et al., 2005). Für die Biosynthese der spezifischen Selenoproteine wird Selenwasserstoff zu Selenophosphat umgewandelt.

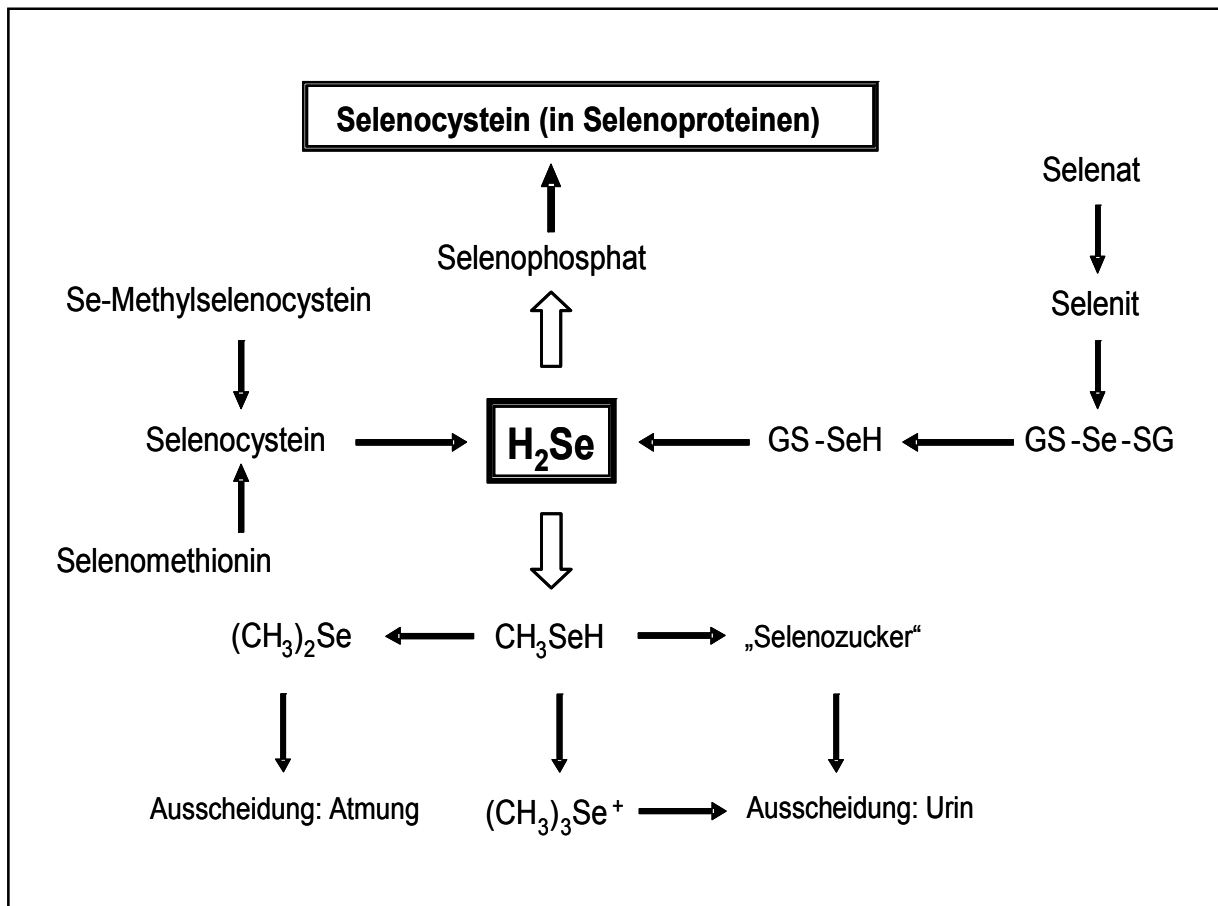


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Metabolismus von Selenverbindungen (modifiziert nach: Ip 1998)

Spezifische Selenoproteine enthalten die Aminosäure Selenocystein (Sec), die während der Translation von der selenocysteinspezifischen tRNA^{Sec} übertragen wird. Im Unterschied zu den anderen 20 proteinogenen Aminosäuren wird Sec direkt auf der tRNA synthetisiert. Die Beladung von tRNA^{Sec} beginnt mit der Generierung des aktiven Selendonors Selenophosphat, das durch Reaktion von ATP mit Selenwasserstoff entsteht. Diese Reaktion wird durch die Selenophosphat-Synthetase 2 katalysiert (Xu et al., 2007), die wiederum in den meisten Organismen, einschließlich dem humanen, selbst ein Selenoenzym ist. Selenophosphat wird durch die Selenocystein-Synthase auf Phosphoseryl- tRNA^{Sec} übertragen, woraus nach Abspaltung von Phosphat Selenocysteyl- tRNA^{Sec} ($\text{Sec-tRNA}^{\text{Sec}}$) entsteht (Xu et al., 2007).

Das aktivierte tRNA-Substrat der Selenocystein-Synthase entsteht nach Beladung der tRNA^{Sec} mit Serin, gefolgt von der Phosphorylierung des Serinrests durch die Phosphoseryl-tRNA^{Sec} Kinase (Carlson et al., 2004).

Während der Translation am Ribosom wird Selenocystein durch UGA codiert (Chambers et al., 1986), das normalerweise als Stopcodon fungiert. An der Umkodierung von UGA innerhalb des offenen Leserahmens einer mRNA sind neben der Sec-tRNA^{Sec} eine Vielzahl weiterer trans-Faktoren beteiligt, von denen hier die wichtigsten vorgestellt werden sollen (s. Abbildung 2). Ein entscheidendes Merkmal aller für Selenoproteine codierenden mRNAs ist die Anwesenheit einer Haarnadelstruktur im nicht-codierenden 3'-Ende. Diese als SECIS-Element (= Selenoceystein-Insertionssequenz) bezeichnete Struktur befindet sich in variablem Abstand zum internen UGA-Codon, der bis zu mehreren Tausend Nukleotide betragen kann. An das SECIS-Element bindet das *SECIS binding protein 2* (SBP2), das wiederum mit dem Selenocystein-spezifischen Elongationsfaktor eEFSec und der Sec-tRNA^{Sec} interagiert (Fagegaltier et al., 2000). Dieser Komplex befindet sich nach Faltung der gebundenen mRNA am Ribosom, wo er die Insertion von Selenocystein in die entstehende Polypeptidkette vermittelt (Papp et al., 2007). Daneben wurden in den letzten Jahren weitere Proteine identifiziert, die ebenfalls an der Inkorporation von Sec beteiligt sind. Zu diesen zählen das *ribosomal protein* L30, das ein Bestandteil des Ribosoms ist und spezifisch an SECIS-Elemente bindet (Chavatte et al., 2005), und das 43-kDa *RNA-binding protein* (SECp43). SECp43 bindet zusammen mit der Selenocystein-Synthase an die Sec-tRNA^{Sec} und reguliert die Bildung zweier Isoformen dieser tRNA (Xu et al., 2005). Eine Funktion von SECp43 bei der Decodierung der multiplen UGA-Codons der Selenoprotein P-mRNA und deren Stabilisierung wird diskutiert (Small-Howard et al., 2006).

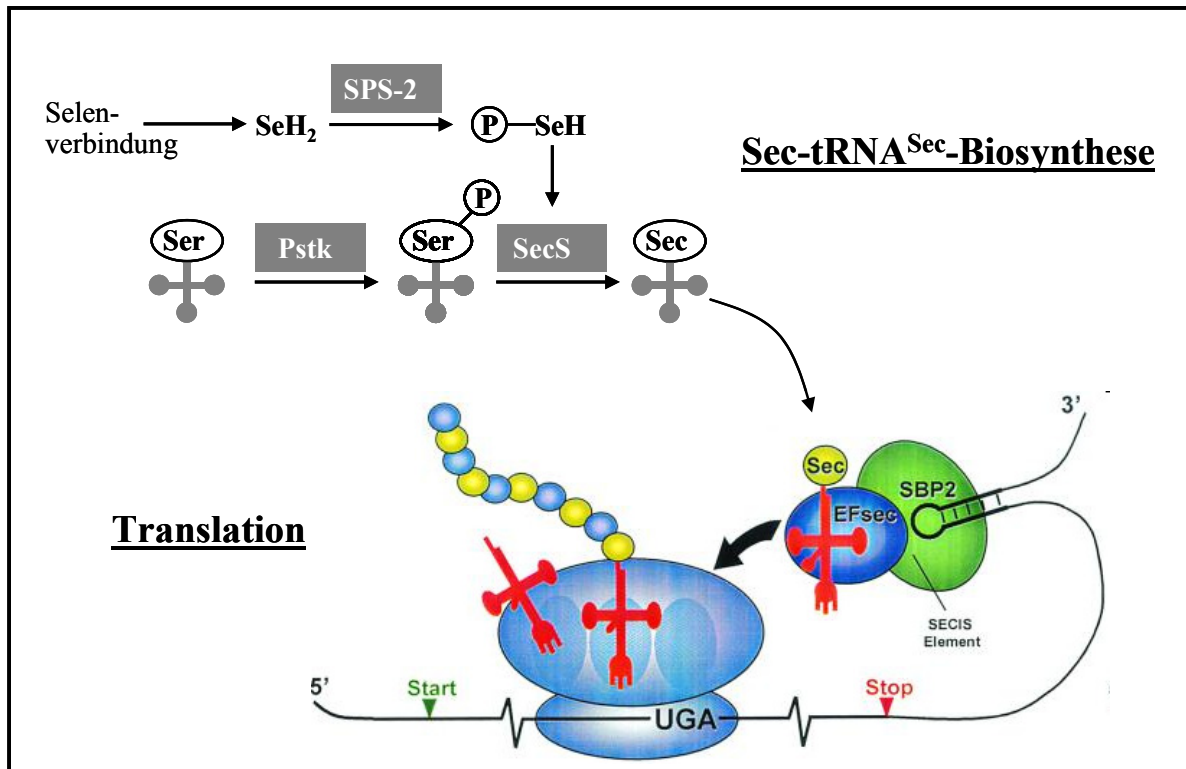


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Biosynthese von Selenoproteinen. SPS-2, Selenophosphat-Synthetase 2; Pstk, Phosphoseryl-tRNA^{Sec} Kinase; SecS, Selenocystein-Synthase; eEFsec, *Sec-specific eukaryotic elongation factor*; SBP2, *SECIS binding protein 2*. Modifiziert nach: Hatfield und Gladyshev 2002.

1.1.2 Selenoproteine

Eine bioinformatische Untersuchung des humanen Genoms auf Transkripte, die ein putatives SECIS-Element enthalten, führte zur Identifizierung von 25 Selenoproteinen (Kryukov et al., 2003). Alle humanen Selenoproteine enthalten mindestens einen Selenocysteinrest in ihrer Peptidkette und mindestens ein SECIS-Element in ihrer mRNA. Funktionen und zelluläre Lokalisation der wichtigsten Selenoproteine sind, soweit bisher bekannt, in Tabelle 1 aufgelistet. Das Selenoproteom umfasst somit nur eine sehr kleine Gruppe von Proteinen. Nichtsdestotrotz sind sie für Säugetiere essentiell, was anhand von *Knock-out*-Mäusen gezeigt wurde, bei denen die Abschaltung der Selenoproteinbiosynthese durch Deletion des tRNA^{Sec}-Gens zum Tod im frühen Embryonalstadium führte (Bösl et al., 1997). Weitere Versuche mit *Knock-out*-Mäusen zeigten, dass mindestens drei Selenoproteine lebensnotwendig sind: Thioredoxinreduktase 1 und 2 sowie Glutathionperoxidase 4.

Die meisten bisher charakterisierten Selenoproteine sind Oxidoreduktasen, an deren enzymatischer Aktivität ein Selenocysteinrest im katalytischen Zentrum beteiligt ist. Selenoproteine sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, einschließlich des Abbaus

von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), der Biosynthese von Desoxynukleotiden für die DNA-Synthese, der Regulation redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren, dem Thyroidhormonmetabolismus, der Proteinfaltung sowie dem Transport und der Speicherung von Selen (Papp et al., 2007). Im Unterschied zum Schwefel besitzt Selen eine höhere Polarisierbarkeit, und mit einem pK_S -Wert von 5.2 (zum Vergleich: 8.3 für Cystein) liegt Selenocystein bei physiologischen pH-Werten überwiegend als Selenolat vor. Dadurch ist Selenocystein ein reaktiveres Nucleophil und stärkeres Reduktionsmittel verglichen mit Cystein. Die katalytische Potenz des Sec-Restes in Selenoenzymen wurde eindrucksvoll durch die Erzeugung rekombinanter Sec-Cys-Mutanten mehrerer Selenoproteine gezeigt, deren enzymatische Aktivitäten *in vitro* durch den Austausch des Selens gegen Schwefel um bis zu einem Faktor von 1000 erniedrigt waren (zusammengefasst in: Johansson et al., 2005).

Zu den bestuntersuchten Selenoproteinen zählen die Enzymfamilien der Glutathionperoxidasen (Gpx), der Thioredoxinreduktasen (TrxR) und der Iodothyronindeiodinasen (DIO). Die Glutathionperoxidasen haben eine zentrale Bedeutung bei der Abwehr von oxidativen Zellschäden, indem sie verschiedene Hydroperoxide wie z.B. Wasserstoffperoxid und Lipidhydroperoxide reduzieren. In einem katalytischen Zyklus wird das von den Glutathionperoxidasen oxidierte Glutathion durch die Glutathionreduktase unter Verwendung von NADPH regeneriert. Die Isoformen der Glutathionperoxidasen unterscheiden sich bezüglich ihrer Substratspezifität und ihrer Lokalisation im Körper bzw. in der Zelle. Neben den vier in Tabelle 1 genannten Isoformen existieren drei weitere, die jedoch im Menschen noch nicht beschrieben wurden (Gpx 6), bzw. Cystein anstelle von Selenocystein enthalten (Gpx5 und Gpx7) und somit keine Selenoproteine darstellen. Thioredoxinreduktasen reduzieren unter Verbrauch von NADPH ein sehr breites Spektrum von Substraten und sind dadurch ebenfalls an der Abwehr von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt. Sie sind als einzige Enzyme in der Lage, Thioredoxin zu reduzieren, das selbst wiederum die Aktivität von Enzymen der DNA-Synthese, der Proteinfaltung sowie redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, AP-1 und p53 reguliert. Die Familie der Deiodinasen katalysiert die Iodabspaltung aus den Schilddrüsenhormonen T3 und T4, wodurch deren Aktivität reguliert wird.

Neben diesen drei Enzymfamilien und den anderen in Tabelle 1 genannten Selenoproteinen wurden noch neun weitere Selenocystein enthaltende Proteine identifiziert, deren Funktionen jedoch noch kaum bekannt sind.

Selenoenzym	Funktion	Lokalisation
Glutathionperoxidasen	Reduktion von Hydroperoxiden	
Gpx1	Antioxidans. Redox-Signaling	ubiquitär, cytosolisch
Gpx2	Antioxidans im Gastrointestinaltrakt (GIT)	Leber, GIT versch. Tumore
Gpx3	evtl. extrazelluläres Antioxidans	Plasma, GIT
Gpx4	Antioxidans. Strukturprotein in Spermien. Redox-Signaling	ubiquitär, Spermien
Thioredoxinreduktasen	Reduktion von Thioredoxin und zahlreichen anderen Substraten	
TrxR1	Antioxidans. Redoxregulation. Red. der Ribonucleotidreductase	ubiquitär, cytosolisch
TrxR2	Antioxidans. Redoxregulation.	ubiquitär, mitochondrial
TGR (TrxR3)	unbekannt	Testes
Iodothyronindeiodinasen	Reduktion der Thyroidhormone	
DIO1	Generierung und Abbau von T3 sowie rT3 ((revers)-Triiodthyronin)	Leber, Niere, Schilddrüse, Hypophyse
DIO2	Generierung von T3 und Abbau von rT3	Plazenta, ZNS, Schilddrüse, Muskel braunes Fettgewebe
DIO3	Generierung von rT3 und Abbau von T3	Gehirn, Plazenta, Uterus
Selenophosphat-Synthetase 2	Selenoproteinsynthese	ubiquitär
Selenoprotein 15	Proteinprozessierung im endoplasmatischen Reticulum (ER)	Prostata, Testes, Gehirn, Niere, Leber
Selenoprotein N	Regulation der Ca ²⁺ -Freisetzung im ER im Muskel	Skelettmuskel, ubiquitär
Selenoprotein P	Selentransport. Antioxidans	Plasma (von Leber und Niere sezerniert), ubiquitär
Selenoprotein R	Reduktion von Methionin-R- sulfoxiden	u.a. Gehirn, Augenlinse
Selenoprotein W	Antioxidans	ubiquitär, ZNS, Skelettmuskel

Tabelle 1: Die wichtigsten humanen Selenoproteine im Überblick. Die Angaben sind Übersichtsartikeln entnommen (Papp et al., 2007; Gromer et al., 2005; Reeves et al., 2009).

1.1.3 „Optimale“ Selenversorgung und Gesundheit

Selen ist ein essentielles Spurenelement mit geringer therapeutischer Breite. Richtwerte für eine empfohlene Tagesdosis beziehen sich auf die Selenmenge, die für eine maximale Expression von Selenoenzymen ausreichend ist. Als repräsentative Marker werden dabei die beiden Plasmaproteine Glutathionperoxidase-3 und Selenoprotein P (SeP) gemessen, deren Aktivität bzw. Konzentration bei Plasmaselenkonzentrationen von etwa 90 µg/l (Duffield et al., 1999; Xia et al., 2005) bzw. 125 µg/l (Burk et al., 2006a) maximiert sind. Zur Maximierung der Gpx3-Aktivität wird eine tägliche Aufnahme von etwa 50-60 µg Selen benötigt, für die Maximierung der SeP-Konzentration dagegen mehr als 90 µg (Xia et al., 2005; Burk et al., 2006a). Die zur Optimierung der beiden Biomarker Gpx3 und SeP benötigte Selenmenge hängt insbesondere von der chemischen Form der aufgenommenen Selenverbindung ab; so hat Selen in der Form von Selenomethionin eine deutlich höhere Bioverfügbarkeit als Natriumselenit, weshalb es meist das Mittel der Wahl in Supplementationsstudien ist (Xia et al., 2005). Daneben können individuelle Faktoren wie Krankheitszustände oder Polymorphismen in Genen von Selenoproteinen oder Enzymen der Selenoproteinsynthese eine verminderte Biosynthese oder Aktivität von Selenoproteinen zur Folge haben und somit einen höheren Selenbedarf erfordern. Die Weltgesundheitsorganisation WHO empfiehlt zurzeit eine tägliche Selendosis von 55 µg bei einem oberen Sicherheitswert von 400 µg. Der weitaus größte Teil der westlichen Bevölkerung nimmt Selen in einer Menge von 30-200 µg täglich zu sich (Combs 2001), weswegen akute Mangelercheinungen oder Intoxikationen durch Selen höchst selten auftreten. Eine drastische Selenunterversorgung (~10 µg/Tag) war Ursache einer epidemischen Kardiomyopathie in einer isolierten chinesischen Provinz mit selenverarmten Böden. Die nach dieser Provinz benannte Keshan-Krankheit war vermutlich die Folge einer Immunschwäche gegenüber dem Coxsackievirus und konnte durch Selensupplementation sehr erfolgreich bekämpft werden (Cheng und Qian 1990). Chronische Selenvergiftungen (Selenosis) dagegen traten in einer anderen isolierten Provinz Chinas auf, wo durch den Verzehr von Pflanzen extrem selenhaltiger Böden durchschnittlich 5 mg Selen/Tag aufgenommen wurden und Selenkonzentrationen von mehr als 3 mg/l Blut gemessen wurden (Yang et al., 1983). Dabei betrugen die Mortalitätsraten der am meisten betroffenen Bevölkerungsgruppen über einen Zeitraum von vier Jahren bis zu 50 %.

Aus zahlreichen epidemiologischen und Interventionsstudien ergeben sich Hinweise auf positive Effekte einer adäquaten Selenzufuhr für die Prävention von Erkrankungen des Herz-Kreislauf- und des Immunsystems sowie auf Fertilität und Gesamtmortalität

(zusammengefasst in: Rayman 2008). In einer epidemiologischen Studie von Schrauzer et al. wurde erstmals eine inverse Korrelation von Krebsmortalität und Selenzufuhr beim Menschen beobachtet (Schrauzer et al., 1977). Mehrere vielzitierte Interventionsstudien, die in selenarmen Regionen Chinas (Qidong- und Linxianstudie) sowie in den USA (*Nutritional Prevention of Cancer Study*, NPC) durchgeführt wurden, bestätigten diesen protektiven Effekt, da die Supplementation mit Selen die Inzidenz von Tumoren der Leber, des Ösophagus, der Prostata, der Lunge und des Kolons verringerte (Yu et al., 1997; Blot et al., 1993; Clark et al., 1996). Aus epidemiologischen Daten und der Verwendung von Tiermodellen geht hervor, dass der tumorpräventive Effekt von Selen vor allem durch die Maximierung der Aktivität bzw. der Expression von Selenoenzymen hervorgerufen wird (zusammengefasst in: Steinbrenner und Sies 2009; Rayman 2009). Desweiteren sind Polymorphismen in den Genen für Glutathionperoxidase-1 und -4, Selenoprotein 15, Thioredoxinreduktase-1 und Selenoprotein P mit teils erheblich erhöhtem Risiko der Entstehung von Tumoren verschiedener Organe verbunden (Rayman 2009). Allerdings profitieren Populationen mit bereits gesättigter Selenoproteinexpression nicht von einer weiteren Steigerung der Selenzufuhr. Dies zeigte die kürzlich vorzeitig beendete Studie *Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial* (SELECT), bei der die Supplementation mit täglich 200 µg Selenomethionin über einen Zeitraum von durchschnittlich fünf Jahren zu keiner Verringerung der Inzidenz aller untersuchten Tumoren einschließlich der Prostata, der Lunge und des Kolons im Vergleich zur placebobehandelten Kontrollgruppe führte (Lippman et al., 2009). Die mehr als 30.000 Teilnehmer der SELECT-Studie wiesen bereits vor Beginn der Studie Serumselenkonzentrationen von durchschnittlich 136 µg/l auf, bei denen von einer Sättigung der Konzentration bzw. Aktivität aller Selenoenzyme einschließlich Selenoprotein P ausgegangen werden kann (Burk et al., 2006a). Die zusätzliche Selengabe führt demzufolge zu einem Anstieg der Konzentration von Selenmetaboliten und / oder unspezifischen Selenoproteinen, was jedoch bei den Probanden der SELECT-Studie keine Verringerung der Tumorzinzidenz zur Folge hatte. Bei den Teilnehmern der NPC-Studie dagegen hatte die Supplementation mit Selen den größten Effekt in der Gruppe mit dem niedrigsten initialen Selenspiegel (≤ 106 µg/l), bei dem noch keine Sättigung der SeP-Konzentration erreicht ist (Xia et al., 2005; Burk et al., 2006a). Bis zu einer Serumselenkonzentration von 130 µg/l korreliert eine Selenzufuhr mit verringerter Prostata- und Gesamtkrebsmortalität (Bleys et al., 2008).

Es stellt sich demnach die Frage, ob eine weitere Erhöhung der Selenzufuhr in Populationen mit bereits ausreichender Selenoproteinexpression zu empfehlen ist. In der Tat zeigten sich

bereits adverse Effekte durch langfristige Supplementation selengesättigter Probanden mit täglich 200 µg Selen, was der Hälfte des von der Weltgesundheitsorganisation angegebenen Sicherheitswerts von 400 µg als „*tolerable upper intake level*“ für Selen entspricht. Einen überraschenden Befund lieferte hierbei eine Sekundäranalyse der NPC-Studie in Bezug auf die Inzidenz des Typ 2 Diabetes (Stranges et al., 2007). Teilnehmer der Selengruppe erhielten über einen Zeitraum von knapp acht Jahren eine tägliche Selendosis von 200 µg in Form einer Selenhefetablette und hatten gegenüber der Placebogruppe ein um 55 % erhöhtes Risiko, Typ 2 Diabetes zu entwickeln. Im Tertil mit den höchsten Plasmaselenkonzentrationen (> 122 µg/l) zu Beginn der Studie hatte die Selensupplementation sogar eine Erhöhung dieses Risikos um 140 % zur Folge. Drei weitere Studien, der *National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004* (NHANES) und NHANES III sowie die *Supplementation with Antioxidant Vitamins and Minerals* study (SU.VI.MAX) zeigten ebenfalls eine Korrelation von hohen Selenspiegeln und der Diabetesprävalenz bzw. dem Nüchternblutglucosespiegel (Laclaustra et al., 2009; Bleys et al., 2007; Czernichow et al., 2006). Aus den Resultaten der Studien an selengesättigten Kollektiven lässt sich folgern, dass zukünftige Selensupplementationsstudien in selenarmen Populationen, z.B. in bestimmten Gegenden Chinas oder Europas, durchgeführt werden sollten. So werden die Risiken einer Überversorgung mit Selen verringert und zusätzlich die Effekte der Maximierung der Expression von Selenoenzymen durch die Selensupplementation erst sichtbar.

Die Ergebnisse der bisherigen Studien machen deutlich, dass eine „Optimierung“ der täglichen Selenzufuhr innerhalb eines engen Dosisbereichs stattfindet und dass diese Optimierung von mehreren Einflussfaktoren abhängig ist. Dies sind zum einen individuelle Faktoren wie bestehende Krankheiten und Genotypen, die eine verminderte Fähigkeit zur Metabolisierung von Selen bzw. zur Biosynthese von Selenoproteinen zur Folge haben. Zusätzlich sind die chemischen Formen der aufgenommenen Selenverbindungen von Bedeutung, da sie unterschiedliche Bioverfügbarkeiten besitzen und mit unterschiedlicher Effizienz für den Einbau in Selenoproteine genutzt werden können. Zur Optimierung der Selenzufuhr ist eine Nutzen-Risikoabwägung epidemiologischer Studien nützlich, die protektive wie adverse Effekte von Selen bezüglich verschiedener Krankheiten untersuchen. Eine optimale Selenzufuhr könnte möglicherweise bei einer gesättigten Konzentration von Selenoprotein P im Plasma erreicht sein, das als Biomarker für den Selenstatus des Menschen angesehen wird.

1.2 Der Selentransporter Selenoprotein P

1.2.1 Eigenschaften und Funktionen von Selenoprotein P

Wenige Jahre nach der Charakterisierung der Glutathionperoxidase als Selenoprotein (Flohé et al., 1973; Rotruck et al., 1973) wurde im Jahr 1977 ein weiteres Selenoprotein im Plasma von Ratten entdeckt (Herrman 1977), das im Hinblick auf seine hauptsächliche Lokalisation als Selenoprotein P (SeP; P für Plasma) benannt wurde (Motsenbocker und Tappel 1982). Im Unterschied zu allen anderen Selenoproteinen enthält es in seiner mRNA zehn für Sec codierende UGA-Codons und zwei SECIS-Elemente. Durch eine alternative Nutzung im offenen Leserahmen gelegener UGA-Codons als Stop-Codons finden sich im Plasma neben *full-length* SeP auch Isoformen mit verkürzten C-terminalen Enden (*truncated* SeP). Humanes Plasma enthält zwei Isoformen mit Molekulargewichten von 51 und 61 kDa, wobei die kürzere Isoform aus dem Abbruch der Translation am zweiten UGA-Codon hervorgeht (Mostert et al., 1998). Aus dem Plasma von Ratten wurden vier Isoformen isoliert, von denen drei verkürzte C-Termini am zweiten, dritten oder siebten UGA besitzen (Ma et al., 2002). Wie die meisten Plasmaproteine ist auch Selenoprotein P hochglykosyliert. Durch die massenspektrometrische Untersuchung von aus Rattenplasma isoliertem SeP wurden insgesamt vier Aminosäurepositionen identifiziert, die N- bzw. O-glykosyliert vorliegen (Ma et al., 2003). Die Glykosylierung und Sezernierung von neusynthetisiertem SeP verläuft über den sekretorischen Weg via ER und Golgiapparat, was anhand von humanen Hepatomzellen gezeigt wurde, die die gleichen Isoformen in das Kulturmedium abgeben, die auch im humanen Plasma gefunden werden (Steinbrenner et al., 2007). Mehr als 50 % des Gesamtselengehalts in humanem Plasma ist in Form von SeP gebunden (Saito und Takahashi 2002), das vor allem von der Leber und in geringerem Ausmaß auch von den Nieren sezerniert wird (Carlson et al., 2004). Seine Konzentration im Plasma beträgt 40 nM bzw. 5mg/l. SeP wird als Biomarker für den Selenstatus des Menschen angesehen (Xia et al., 2005; Gromadzinska et al., 2008).

Selenoprotein P besitzt bis dato zwei gut untersuchte Funktionen: den Transport und die Speicherung von Selen sowie die Funktion als Antioxidans. In Abbildung 3 sind die genomische Organisation des SEPP1-Gens sowie die Strukturen der SeP-mRNA und des SeP-Proteins schematisch dargestellt, anhand derer sich Charakteristika wie die Bifunktionalität und die vornehmliche Plasmalokalisation von SeP erklären. Das Präprotein mit einem Molekulargewicht von 45 kDa enthält eine N-terminale Signalsequenz von 19 Aminosäuren, die während der Prozessierung im ER abgespalten wird (Akesson et al., 1994), wodurch das

aus 362 Aminosäuren bestehende reife Protein entsteht. Die Selenocysteinreste von SeP verteilen sich auf zwei Domänen: ein Selenocystein befindet sich am N-terminalen Ende (AS 59) und neun Reste bilden einen Cluster am Carboxyterminus (AS 300-378).

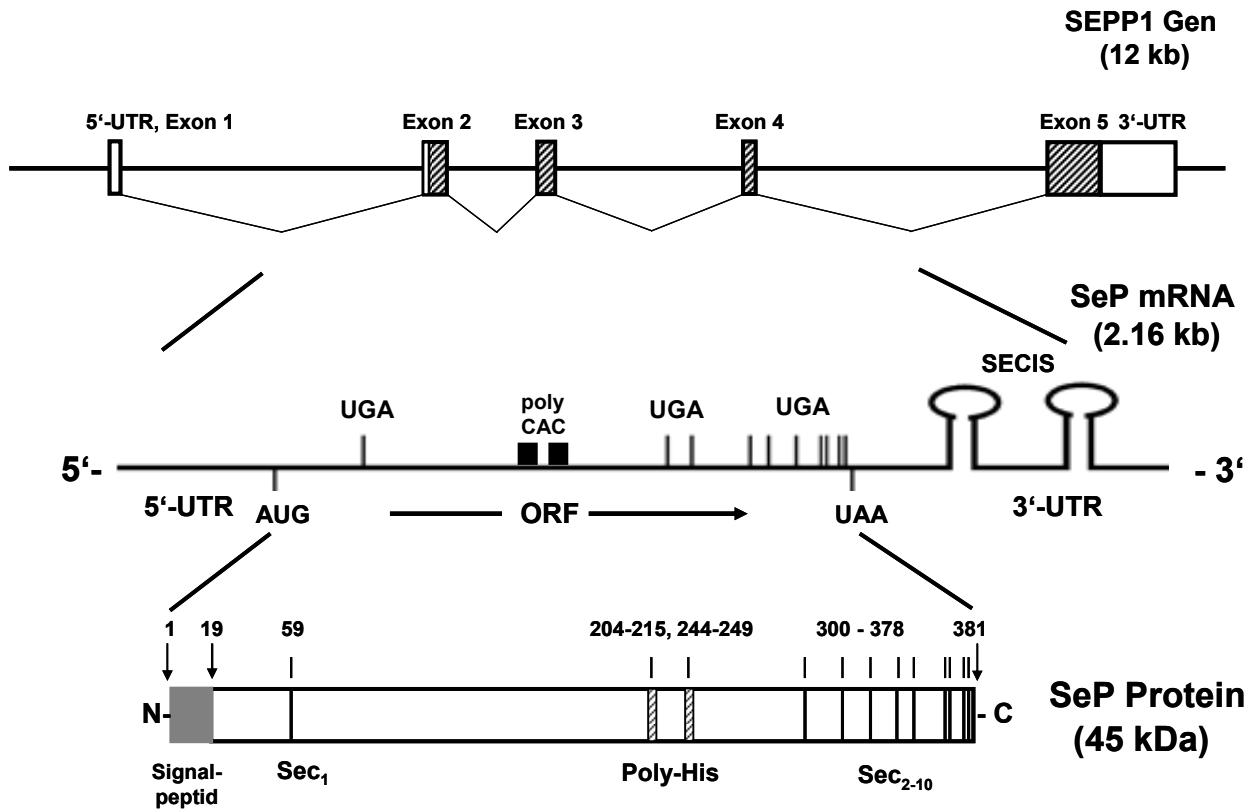


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Gen-, mRNA- und Proteinstruktur von humanem Selenoprotein P. Protein-codierende DNA-Abschnitte sind schraffiert dargestellt.

1.2.1.1 Funktion von Selenoprotein P als Selentransporter

Aufgrund des außergewöhnlich hohen Selengehalts von SeP und seinem Vorkommen im Plasma wurde es bereits kurz nach seiner Entdeckung als Selentransportprotein postuliert. Untersuchungen von Motsenbocker und Tappel unterstützten diese Hypothese: der Metabolismus von radioaktiv markiertem Selenit in selendefizienten Ratten ist durch eine schnelle Akkumulation in der Leber gekennzeichnet, gefolgt von der Inkorporation in Selenoprotein P, das Selen zu extrahepatischen Geweben wie Niere und Testes transportiert (Motsenbocker und Tappel 1982). Die experimentelle Deletion des SeP-Gens bewirkt eine

deutliche Reduktion der Selengehalte und der Aktivität von Selenoenzymen im Gehirn, den Testes und der Niere von SeP *knock-out* Mäusen und führt gleichzeitig zur Akkumulation von Selen in der Leber und vermehrter Ausscheidung von Selenmetaboliten durch den Harn (Schomburg et al., 2003; Hill et al., 2003; Burk et al., 2006b). Ein unterschiedlicher Phänotyp von SeP *knock-out*- im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen äußert sich etwa zwanzig Tage nach der Geburt: verringertes Körpergewicht, mangelhafte motorische Koordination und Infertilität des Männchens. Die Infertilität ist eine Folge der Selendefizienz in den Testes, unter der keine funktionalen Spermien produziert werden können (Olson et al., 2005). Der neurologische Phänotyp kann in SeP *knock-out* Mäusen durch die erhöhte Zufuhr von Selen verhindert werden (Hill et al., 2004), nicht jedoch die Infertilität (Olson et al., 2005). Demzufolge sind die Testes auf Selenoprotein P als alleinige Selenquelle angewiesen; während das Gehirn dazu ebenfalls primär SeP nutzt, kann es jedoch auch durch niedermolekulare Selenverbindungen versorgt werden. Die lokale Expression von SeP im Gehirn scheint außerdem für die Speicherung von Selen insbesondere unter Selenmangelbedingungen bedeutsam zu sein (Richardson 2005).

Die Frage des Aufnahmemechanismus von Selenoprotein P konnte kürzlich für mehrere Zielgewebe beantwortet werden. So wurden zwei Mitglieder der Lipoproteinrezeptorfamilie identifiziert, die in der Niere, den Testes und im Gehirn die endozytotische Aufnahme von SeP vermitteln. In der Niere von Mäusen gelangt SeP in den Primärharn und wird dann von Epithelzellen des proximalen Tubulus durch Bindung an Megalin aufgenommen (Olson et al., 2008). Ein weiterer Rezeptor für SeP wurde in den Testes gefunden; hier bindet SeP an den Apolipoprotein-E-Rezeptor-2 (ApoER2), der sich in der Zellmembran von Sertolizellen befindet. Sertolizellen versorgen reifende Samenzellen mit Nährstoffen und die Deletion des ApoER2-Gens führt ebenso wie die Deletion des SeP-Gens zu drastisch reduzierten Selengehalten und der Bildung von defekten Spermien in den Testes von *knock-out* Mäusen (Olson et al., 2007). Beide Rezeptoren, ApoER2 und Megalin, werden neben den Testes bzw. der Niere vor allem auch im Gehirn exprimiert, und deutlich erniedrigte Selengehalte im Gehirn von ApoER2 *knock-out* Mäusen zeigen, dass dieser Rezeptor auch zur Selenversorgung dieses selenakkumulierenden Organs beiträgt (Burk et al., 2007). Wie im Fall des SeP *knock-outs* zeigen auch *apoER2*^{-/-} Mäuse unter Selendefizienz neurologische Fehlfunktionen sowie eine verkürzte Lebensspanne, die durch adäquate Selenzufuhr verhindert werden können.

1.2.1.2 Antioxidative Funktion von Selenoprotein P

Durch proteolytische Spaltung von SeP mit Plasma-Kallikrein kann man SeP in einen carboxyterminalen und einen aminoterminalen Teil spalten. Der selenreiche carboxyterminale Bereich dient als Selentransporter, während der Selenocysteinrest im N-Terminus *in vitro* enzymatisch aktiv ist (Saito et al., 2004). Dieser Befund wird durch eine *in vivo* Studie unterstützt, in der die Überexpression der N-terminalen Domäne von Selenoprotein P in Mäusen vor den Folgen einer durch Infektion mit Trypanosomen verursachten Gewebeschädigung schützte (Bosschaerts et al., 2008). Das N-terminale Selenocystein bildet eine Selenylsulfidbrücke mit einem Cysteinrest innerhalb einer CXXU-Sequenz (Ma et al., 2003), einem klassischen Motiv redoxaktiver Zentren. Die nähere Charakterisierung der enzymatischen Funktion gelang mit aus humanem Plasma aufgereinigtem Selenoprotein P; dabei reduzierte es Phospholipidhydroperoxide, nicht jedoch niedermolekulare Hydroperoxide wie z.B. H_2O_2 , unter Verwendung von Glutathion und anderer Thiole als Cosubstrat (Saito et al., 1999). In einer Studie mit Ratten schützte eine erhöhte SeP-Expression vor einer durch das Herbizid Diquat induzierten Membranschädigung in der Leber (Burk et al., 1995). Selenoprotein P schützt Plasmaproteine vor Oxidation und Nitrierung durch Peroxynitrit (Arteel et al., 1998; Traulsen et al., 2004) und komplexiert Schwermetalle wie Quecksilber und Cadmium *in vitro* (Sasakura und Suzuki 1998).

SeP enthält zwei histidinreiche Sequenzen sowie einen Cluster aus Histidin- und Lysinresten. *In vitro* wurde eine Bindung von SeP an das Proteoglykan Heparin gezeigt; die Bindung ist in einem physiologischen Bereich pH-abhängig und wird vor allem durch den Cluster von Histidin- und Lysinresten in SeP vermittelt (Arteel et al., 2000; Hondal et al., 2001). Die Imidazolringe von Histidinresten in Proteinen haben pK_A -Werte von ~ 6.5 , so dass sie bei pH-Werten ≤ 7.0 protoniert werden. In dieser Form können sie an (negativ geladene) Heparine binden, die ein Gemisch von veresterten Proteoglykanen bilden und ähnliche Eigenschaften wie die Glykokalyx auf Zelloberflächen aufweisen. Die Bindung an Heparin gibt somit einen Hinweis auf eine mögliche Interaktion des Proteins mit Zellmembranen. In der Tat wurden durch Bindungsstudien mit isolierten Membranen sowie immunchemische Färbungen von Gewebeschnitten die Assoziation von SeP mit Endothelien in Niere, Gehirn und Leber nachgewiesen (Wilson und Tappel 1993; Burk et al., 1997). Die pH-sensitive Bindung von SeP an Heparin bzw. an körpereigene Proteoglykane hat vermutlich zur Folge, dass sich SeP in Entzündungsarealen anreichert, die durch erniedrigte pH-Werte gekennzeichnet sind, und dort zum antioxidativen Schutz der (Endothel-)Zellen beitragen könnte.

1.2.2 Regulation der Transkription und Translation von Selenoprotein P

Das humane SEPP1-Gen befindet sich auf Chromosom 5 und hat eine Größe von etwa 12 kB. Das dominierende mRNA-Transkript (NM_005410) besteht aus fünf Exons mit einer Gesamtgröße von 2164 Nukleotiden (s. Abbildung 3). Zwei weitere Transkriptvarianten wurden identifiziert, die in Abbildung 3 nicht dargestellt sind: Variante 2 (NM_001085486) enthält ein zusätzliches, nichtcodierendes Exon am 5'-Ende der mRNA, aus der durch Verwendung des gleichen Translationsstartpunkts Isoform 1 entsteht; während aus einer dritten Transkriptvariante (NM_001093726) eine SeP-Variante mit einem um 30 Aminosäuren verlängerten N-Terminus entsteht. Zwei relativ häufige (>5%) Polymorphismen in der humanen SeP-mRNA wurden beschrieben. Ein Polymorphismus innerhalb der proteincodierenden Sequenz resultiert in einem Aminosäureaustausch an Position 234 (Ala234Thr), der andere ist im nichtcodierenden 3'-Ende der mRNA lokalisiert. Diese Polymorphismen scheinen unter adäquater Selenzufuhr keinen Einfluss auf den SeP-Spiegel im Plasma zu haben (Méplan et al., 2007), dagegen korrelieren sie mit einem unterschiedlichen Verteilungsmuster der beiden SeP-Isoformen im Plasma. Unabhängig von der Plasmaselenkonzentration haben heterozygote Träger des Ala234Thr-Polymorphismus einen geringeren Anteil der *full-length* SeP-Isoform am gesamten SeP-Gehalt im Vergleich zum dominierenden Genotyp (Méplan et al., 2009).

1.2.2.1 Transkriptionelle Regulation

Die Untersuchung eines humanen genomischen SeP-Klons identifizierte mehrere potentiell regulatorische Elemente im Promotorbereich des SeP-Gens, darunter eine TATA-Box und eine CAAT-Box. Eine Inhibierung der Promotoraktivität durch die proinflammatorischen Cytokine IL-1 β , IFN γ und TNF α sowie durch TGF- β führten zur Hypothese einer verminderten Produktion von SeP während einer akuten Entzündungsreaktion. Dabei wurden eine IFN γ -responsive und eine TGF- β -responsive Sequenz im SeP-Promotor ermittelt (Dreher et al., 1997a; Mostert et al., 2001). Desweiteren wurde im humanen SeP-Promotor kürzlich eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor FoxO1a identifiziert, welcher insulinabhängig die Promotoraktivität und die Transkription von SeP reguliert. Die Überexpression von FoxO1a in Hepatomzellen führte hier zur verstärkten Expression von SeP, die umgekehrt durch insulininduzierte Aktivierung des PI3Kinase/Akt-Signalweges mit nachfolgender Inaktivierung von FoxO1a reprimiert wurde (Walter et al., 2008).

1.2.2.2 Posttranskriptionelle Regulation

In Abschnitt 1.1.1 wurden Enzyme des zellulären Selenoproteinsyntheseapparats beschrieben, die auch für die posttranskriptionelle Regulation von Selenoprotein P von Bedeutung sind. Die Insertion der bis zu zehn Selenocysteinreste an den Sec-Codons der SeP-mRNA erfolgt durch zwei SECIS-Elemente, wobei die Umcodierung des ersten UGA-Codons, anscheinend verlangsamt, durch das zweite SECIS-Element initiiert wird und die Insertion der bis zu neun weiteren Sec-Reste von SECIS 2 abhängt (Stoytcheva et al., 2006). An diesen Insertionsprozessen ist das Protein SBP-2 beteiligt, für das im Menschen verschiedene Mutationen beschrieben wurden, deren Träger deutlich verringerte Expressionsniveaus bzw. enzymatische Aktivität von SeP, DIO2 sowie Gpx1 und -3 aufweisen (Dumitrescu et al., 2005).

Ein limitierender Faktor der Biosynthese von Selenoproteinen ist die Verfügbarkeit von Selen; in selendefizienten Ratten und Menschen können die Serumkonzentrationen von SeP und Glutathionperoxidase-3 (Gpx3) durch Supplementation mit Selen dosisabhängig gesteigert werden (Yang et al., 1989; Xia et al., 2005). Der Selenstatus hat keinen Einfluss auf die Transkriptionsrate von SeP (Burk und Hill 1994), die steady-state Menge der SeP mRNA nimmt unter Selendefizienz jedoch ab (Hill et al., 1992). Verglichen mit Gpx3 und Gpx1 ist die mRNA von SeP gegenüber einem Selenmangel jedoch deutlich stabiler, und zusätzlich wird SeP bei Selenrepletion bzw. bei limitierter Verfügbarkeit von Selen bevorzugt synthetisiert: Man spricht in diesem Zusammenhang von einer Hierarchie der Selenoproteinexpression (Brigelius-Flohé 1999). Die Ursachen der unterschiedlichen Stabilitäten und Translationseffizienzen der mRNAs von Selenoproteinen sind komplex. Die Mehrzahl der Selenoproteintranskripte, darunter die der Glutathionperoxidasen und von SeP, sind unter Selendefizienz Substrate des *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) (Maquat 2001; Squires et al., 2007), einem Kontrollmechanismus der aberrante mRNAs mit verfrühten Terminationscodons erkennt und eliminiert. Die Effizienz der UGA-Decodierung entscheidet wesentlich über die Fortsetzung der Translation oder deren Termination, worauf die mRNA als Substrat des NMD erkannt werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass der Codonkontext des UGA einen entscheidenden Einfluss auf die Sec-Insertion hat (Nasim et al., 2000). Mit Sec beladene Sec-tRNA^{Sec} kommt in zwei Isoformen vor, die sich bzgl. der Modifikation des Nukleotids an Position 34 im Anti-Codon unterscheiden. Die Bildung der methylierten Isoform, Methyl-carboxymethyluridin-2-O-methylribose (mcm⁵Um) erfolgt selenresponsiv (Diamond et al., 1993) und deren Auftreten korreliert somit mit der mRNA- und Proteinmenge von Gpx1 und -3. Wird die Bildung von mcm⁵Um durch genetische

Manipulation der tRNA^{Sec} von Mäusen verhindert, so führt dies trotz adäquater Selenversorgung zur drastisch reduzierten Expression der beiden Gpx-Isoformen. Gleichzeitig ist die Expression von SeP und anderen Selenoproteinen bei Abwesenheit von mcm⁵U nur geringfügig vermindert oder unbeeinflusst, so dass Unterschiede in der Affinität zu -selenabhängigen- tRNA^{Sec}-Isoformen zur Erklärung der hierarchischen Selenoproteinexpression beitragen (Carlson et al., 2005). Kürzlich wurde mit dem eukaryotischen Initiationsfaktor 4a3 (eIF4a3) ein weiterer durch den Selenstatus regulierter Faktor beschrieben, der die differentielle Translation von Selenoproteintranskripten bei Selenmangel bewirkt. eIF4a3 wird bei Selenmangel vermehrt gebildet und bindet in Konkurrenz zu SBP-2 an das SECIS-Element der Gpx1 mRNA, wodurch dessen Translation inhibiert wird. Das SECIS-Element der unter Selenmangel stabil exprimierten Gpx4 wird dagegen nicht durch eIF4a3 gebunden (Budiman et al., 2009). Eine Regulation der SeP-mRNA durch eIF4a3 wurde noch nicht untersucht.

Während einer Sepsis sind die Plasma-SeP-Spiegel deutlich verringert. Neben der Bindung von SeP in inflammatorischen Geweben ist eine verringerte Neusynthese in der Leber eine mögliche Erklärung. In einem Entzündungsmodell in Mäusen wurde durch Injektion von bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) eine Akutphasereaktion ausgelöst, in deren Folge ebenfalls deutlich verringerte Plasmakonzentrationen von SeP gemessen wurden. Dabei wurde die Inhibition der hepatischen Expression mehrerer Gene des Biosyntheseweges der Sec-tRNA^{Sec} beobachtet, wodurch eine posttranskriptionelle Regulation der SeP-Synthese während einer Entzündungsreaktion erklärt werden kann (Renko et al., 2009). Eine immunmodulierte Regulation von SeP wurde zusätzlich in Kolonepithelzellen von Mäusen beschrieben, in denen nicht-pathogene Darmbakterien eine Inhibition der SeP mRNA-Expression hervorriefen (Fukushima et al., 2003).

1.3 Regulation der hepatischen Genexpression durch HNF-4 α , FoxO1 α und PGC-1 α

1.3.1 Der Transkriptionsfaktor HNF-4 α

Der Transkriptionsfaktor *hepatocyte nuclear factor-4 alpha* (HNF-4 α) gehört zur Familie der nukleären Rezeptoren und nimmt eine Schlüsselposition in der Regulation der hepatischen Differenzierung und des hepatischen Stoffwechsels ein. HNF-4 α wurde erstmals aus Zellkernextrakten der Rattenleber durch Bindung an spezifische DNA-Sequenzen isoliert und in der Folge kloniert und charakterisiert (Sladek et al., 1990). Neben der Leber wird HNF-4 α

auch in der Niere, dem Darm und in den β -Zellen des Pankreas exprimiert (Jiang et al., 2003). HNF-4 α besitzt eine den Steroidrezeptoren verwandte Struktur (s. Abbildung 4) und besteht aus einer zwei Zinkfinger enthaltenden DNA-bindenden Domäne, einer ligandenbindenden Domäne sowie den beiden Transaktivierungsdomänen AF-1 und AF-2 (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1997). HNF-4 α ist konstitutiv aktiv, ohne einen externen Liganden zu benötigen, und wird deshalb den *orphan nuclear receptors* zugeordnet (Yoon et al., 2001). Die essentielle Fettsäure Linolsäure wurde vor kurzem als ausschließlicher endogener Ligand von HNF-4 α unter *in vivo* Bedingungen identifiziert. Interessanterweise bewirkt die Bindung von Linolsäure in der ligandenbindenden Domäne jedoch keine Änderung der transkriptionellen Aktivität von HNF-4 α und der Expression von dessen Zielgenen (Yuan et al., 2009). Durch diese konstitutive Aktivität unterscheidet sich HNF-4 α von den ligandenaktivierten nukleären Rezeptoren, deren Aktivität „an- und ausschaltbar“ ist. Bindungsstudien mit Deletionsmutanten von HNF-4 α zeigten, dass es als Homodimer an DNA-Zielsequenzen bindet (Sladek et al., 1990). Im Unterschied zu Steroidhormonrezeptoren, die meist an aus zwei Halbseiten mit definierter Orientierung und konservierter Sequenz bestehende DNA-Motive binden, sind diese Motive im Falle von HNF-4 α bezüglich ihrer Sequenz und der Orientierung der beiden Halbseiten hochvariabel (Kel et al., 2008). Diese Variabilität hat eine große Anzahl von Bindestellen an Promotoren humaner Gene zur Folge. Putative Bindestellen für HNF-4 α im gesamten humanen Genom wurden mittels eines DNA-Chips identifiziert, der Promotorteilbereiche von 13.000 Genen enthielt. Die Hybridisierung HNF-4 α -gebundenen Chromatins zeigte, dass mehr als zehn Prozent der Promotoren in Hepatocyten durch diesen Transkriptionsfaktor besetzt sind und damit potentiell durch ihn reguliert werden (Odom et al., 2004). In Übereinstimmung mit diesem Befund werden durch eine Deletion des HNF-4 α -Gens in der Leber von *knock-out* Mäusen etwa zehn Prozent der Gene in ihrer Expression verändert (Holloway et al., 2008). Zu den in der Leber durch HNF-4 α regulierten Stoffwechselwegen zählen die Glycolyse und die Gluconeogenese, die Synthese und der Transport von Lipiden, die Harnstoffsynthese, die Synthese von Koagulationsfaktoren und der Katabolismus endogener wie exogener Stoffe durch Phase-I und -II Reaktionen katalysierende Enzyme (Gonzalez 2008).

Die transkriptionelle Regulation der Gluconeogenese durch HNF-4 α erfolgt über die Regulation der Schlüsselenzyme Glucose-6-phosphatase (G6Pase) und Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK), die im folgenden Kapitel eingehender erläutert wird. Gene des Fettsäuremetabolismus und -transports, die durch HNF-4 α beeinflusst werden, sind insbesondere die Fettsäuresynthase (Adamson et al., 2006) und Apolipoproteine

wie ApoA-II, ApoA-IV, ApoB und ApoC-III (Li et al., 2000; Hayhurst et al., 2001; Martínez-Jiménez et al., 2006). Die Resorption von Fetten aus dem Darm erfolgt mit Hilfe des *liver fatty acid-binding protein* (L-FABP) und von Gallensäuren, deren Aufnahme und Synthese von Hepatocyten durch die HNF-4 α -regulierte Expression der Transportproteine *sodium taurocholate cotransporter protein* (Ntcp) und *organic anion transporter protein 1* (Oatp1) sowie des Schlüsselenzyms der Gallensäuresynthese CYP7A1 erfolgt (Li et al., 2000; Hayhurst et al., 2001; Martínez-Jiménez et al., 2006). Weitere Zielgene von HNF-4 α sind das Enzym Ornithintranscarbamoylase, das an der Harnstoffsynthese beteiligt ist (Inoue et al., 2002), sowie zahlreiche Blutgerinnungsfaktoren, darunter XII und XIIIb (Inoue et al., 2006). Außerdem besitzt HNF-4 α eine Schlüsselfunktion bei der Morphogenese der Leber während der Embryonalentwicklung, indem es die Differenzierung von Hepatocyten durch die Aktivierung anderer leberspezifischer Transkriptionsfaktoren wie HNF-1 α und PXR (*pregnane X receptor*) einleitet, die wiederum die Expression weiterer Gene regulieren (Kuo et al., 1992; Li et al., 2000; Kamiya et al., 2003).

Eine Modulation der HNF-4 α -abhängigen Genexpression erfolgt durch posttranslationale Modifizierung des Proteins sowie durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren und assoziierten Proteinen wie Koaktivatoren. So bewirkt eine Inkubation humaner Hepatomzellen mit dem proinflammatorischen Cytokin Interleukin-1 β (IL-1 β) eine spezifische Phosphorylierung von HNF-4 α durch die Kinase p38, woraufhin das Koaktivatorprotein PC4 rekrutiert und in dessen Folge die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) verstärkt wird (Guo et al., 2007). Desweiteren wurden Phosphorylierungen durch Kinasen wie z.B. *AMP-activated protein kinase* (AMPK) und Proteinkinase C beschrieben, die die Halbwertszeit, die intrazelluläre Lokalisation und die Bindung an Koaktivatoren von HNF-4 α verändern (Leclerc et al., 2001; Sun et al., 2007). Daneben interagiert HNF-4 α mit anderen Transkriptionsfaktoren, wodurch HNF-4 α -abhängige Gene induziert und reguliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sind vor allem der Koaktivator *peroxisomal proliferator activated receptor- γ coactivator 1 α* (PGC-1 α) und der Transkriptionsfaktor *forkhead box protein class O1a* (FoxO1a) als Interaktionspartner von HNF-4 α von Bedeutung.

1.3.2 Der PI3K/Akt/FoxO-Signalweg

FoxO bezeichnet eine Familie von Transkriptionsfaktoren, deren DNA-bindende Proteindomäne aufgrund ihrer gabelspitzenähnlichen Struktur als *forkhead box* bezeichnet wird (Kaestner et al., 2000). Die *forkhead box* Familie wird in 19 Untergruppen von A bis S

eingeteilt; zur Gruppe *forkhead box class O* (FoxO) gehören die vier Mitglieder FoxO1a, FoxO3a, FoxO4 und FoxO6. Von den beiden erstgenannten Proteinen existieren Pseudogene, die deshalb zur eindeutigen Benennung mit einem Affix gekennzeichnet sind. FoxO1a, FoxO3a und FoxO4 werden ubiquitär exprimiert (Anderson et al., 1998); FoxO6 wurde dagegen nur im frühen Embryonalstadium im Gehirn detektiert (Jacobs et al., 2003). FoxOs binden als Monomere an das konservierte DNA-Sequenzmotiv GTAAA(C/T)A in Promotoren ihrer Zielgene, was in der Regel zur Verstärkung von deren Transkription führt (Brunet et al., 1999; Furuyama et al., 2000). Die Regulation der transkriptionellen Aktivität von FoxOs erfolgt primär durch die Regulation von deren intrazellulärer Lokalisation über den PI3K/Akt-Signalweg. Nach Bindung von Wachstumsfaktoren wie Insulin oder dem *insulin-like growth factor* an deren jeweilige Tyrosinkinaserzeptoren kommt es zur Aktivierung der membranständigen Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K). Diese phosphoryliert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in 3'-Position des Inositolrings wodurch das Trisphosphat PIP₃ entsteht, ein sekundärer Botenstoff der Signaltransduktion. An PIP₃ bindet u.a. die Proteinkinase PDK1 (*3'-phosphoinositid-dependent protein kinase*), die die ebenfalls an PIP₃ bindende Proteinkinase Akt phosphoryliert und dadurch aktiviert (zusammengefasst in: Mounier und Posner 2006). Akt phosphoryliert daraufhin FoxO an drei konservierten Positionen. Dies führt zur Bindung des Proteins 14-3-3 und Akkumulation von FoxO1a im Cytosol, so dass es im Zellkern nicht mehr als Transkriptionsfaktor wirken kann (Brunet et al., 1999, Zhao et al., 2004).

FoxOs induzieren ein breites Spektrum an Zielgenen, deren Hauptfunktionen bzgl. des Metabolismus und des Zellwachstums denen der durch Insulin induzierten Gene entgegengesetzt sind. Zu diesen Funktionen zählt die Arretierung des Zellzyklus durch FoxO-abhängige Induktion der Zellzyklusinhibitoren p21 und p27 sowie die Reprimierung der Zellzyklusaktivatoren Zyklin D1 und D2. FoxOs vermitteln Stressresistenz gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Induktion ROS-detoxifizierender Enzyme wie z.B. der manganabhängigen Superoxiddismutase (MnSOD) und der Katalase. Zusätzlich wird durch die Induktion von GADD45 (*growth arrest and Dna damage-inducible protein 45*) und DDB1 (*damage-specific DNA-binding protein 1*) die Kapazität der Zellen für die Reparatur durch ROS verursachter DNA-Schäden erhöht (zusammengefasst in: Greer und Brunet 2005). FoxO1a ist auch ein wichtiger Faktor bei der Kontrolle der hepatischen Gluconeogenese, die in 1.3.4 eingehend besprochen wird.

1.3.3 Der transkriptionelle Koaktivator PGC-1 α

Während FoxO1 α und HNF-4 α den Transkriptionsprozess ihrer Zielgene durch sequenzspezifische DNA-Bindung in Promotorbereichen beeinflussen, fungiert PGC-1 α als transkriptioneller Koaktivator. Als solcher bindet er selbst nicht an DNA, sondern an den basalen Transkriptionskomplex sowie an Transkriptionsfaktoren, wodurch deren Transaktivierungspotential moduliert wird. Die Beobachtung, dass der Transkriptionsfaktor PPAR γ bei der Fettzelldifferenzierung zu braunem Fettgewebe (BAT, *brown adipose tissue*) zwingend auf die Anwesenheit eines Kofaktors angewiesen ist, führte zur Entdeckung und Benennung von PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α*). Außer im BAT wird PGC-1 α besonders stark im Herz, im Skelettmuskel, in der Niere und im Gehirn exprimiert. Der N-Terminus des Proteins enthält eine Transaktivierungsdomäne und ein LXXLL-Sequenzmotiv, über das PGC-1 α mit nukleären Rezeptoren wie z.B. dem Östrogenrezeptor (Tcherepanova et al., 2000), dem Glucocorticoidrezeptor (Knutti et al., 2000) und den Transkriptionsfaktor HNF-4 α (Yoon et al., 2001) interagiert. Unabhängig vom LXXLL-Motiv bindet PGC-1 α auch über andere Domänen an Transkriptionsfaktoren wie z.B. PPAR γ (Puigserver et al., 1998) und FoxO1 α (Puigserver et al., 2003). Über die N-terminale Aktivierungsdomäne rekrutiert PGC-1 α die Proteine *steroid receptor coactivator-1* (SRC1) und *CREB binding protein* (CBP/p300) (Puigserver et al., 1999). Diese sind ebenfalls Koaktivatoren, besitzen aber im Gegensatz zu PGC-1 α zusätzlich enzymatische Aktivität als Histonacetyltransferasen, wodurch sie eine lokale Öffnung des Chromatins bewirken und so die Assemblierung des Transkriptionskomplexes ermöglichen. Der C-Terminus enthält eine Serin- und Argininreiche Domäne und ein RNA-bindendes Motiv, über die PGC-1 α an der RNA-Prozessierung während der Transkription beteiligt ist (Monsalve et al., 2000).

Die PGC-1 α -Expression wird durch verschiedene hormonelle Stimuli reguliert. Kälteexposition bewirkt eine erhebliche Steigerung der mRNA Expression von PGC-1 α im BAT und im Skelettmuskel von Mäusen (Puigserver et al., 1998). Dem liegt eine Aktivierung des β -adrenergen Rezeptors und nachfolgender cAMP-abhängiger Signalwege zugrunde. CREB (*cAMP-responsive element binding protein*) induziert zusammen mit dem Koaktivator TORC2 (*transducer of regulated CREB activity 2*) (Shaw et al., 2005) die Transkription des PGC-1 α -Gens; in der Leber wird CREB ebenfalls durch Catecholamine über den β -adrenergen Rezeptor und während des Fastens durch Glucagon aktiviert (Herzig et al., 2001). Die hepatische PGC-1 α -Expression wird durch CREB in Synergismus mit Glucocorticoiden bzw. dem Glucocorticoidrezeptor induziert (Yoon et al., 2001). Posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen und Acetylierungen beeinflussen die Stabilität und die

Aktivität von PGC-1 α . Die Deacetylase SIRT1 (*silent information regulator T1*) wird während des Fastens aktiviert und deacetyliert TORC2 und PGC-1 α , wodurch dessen Expression und Aktivität gesteigert werden und in der Folge die hepatische Gluconeogenese induziert wird (Liu et al., 2008; Rodgers und Puigserver 2007). Der wichtigste negative Regulator der Expression und Aktivität von PGC-1 α in der Leber ist das Insulin (s. 1.3.4).

Zusätzlich zu PPAR γ wurden zahlreiche weitere Interaktionspartner identifiziert, mit denen PGC-1 α vor allem im Fett- und Muskelgewebe sowie in der Leber Gene der mitochondrialen Biogenese und des Energiestoffwechsels reguliert. Dazu zählen die beiden Transkriptionsfaktoren *nuclear respiratory factor-1* und -2 (NRF-1 und NRF-2), die im Skelettmuskel und im braunen Fettgewebe durch PGC-1 α koaktiviert werden (Wu et al., 1999). Die NRFs induzieren die Expression von Tfam (*mitochondrial transcription factor A*), einem für die Replikation und Transkription mitochondrialer DNA wichtigen Protein. Außerdem regulieren sie die Expression nukleärer Gene, die für Proteine der mitochondrialen Atmungskette codieren (Puigserver et al., 1998; Scarpulla 2002).

Zusätzlich bewirkt PGC-1 α in Neuronen und in Gefäßendothelzellen die Aktivierung von Genen für Enzyme, die reaktive Sauerstoffspezies detoxifizieren und verhindert so zellschädigende Auswirkungen einer mit verstärkter mitochondrialer Aktivität einhergehenden erhöhten ROS-Produktion (St-Pierre et al., 2006; Valle et al., 2005).

1.3.4 Kooperation von HNF-4 α , FoxO1a und PGC-1 α bei der Transkriptionskontrolle von hepatischen Genen

Die Koaktivierung von HNF-4 α und FoxO1a durch PGC-1 α ist von entscheidender Bedeutung für die Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels in der Leber. Beim Fasten und paradoxerweise auch in diabetischen Mäusen und Menschen kommt es zu einem starken Anstieg der hepatischen PGC-1 α -Expression, gefolgt von der Induktion zweier Schlüsselenzyme der Gluconeogenese: Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) und Glucose-6-phosphatase (G6Pase). In isolierten Hepatocyten bewirkt eine hormonstimulierte wie auch eine ektopische PGC-1 α -Überexpression ebenfalls die Aktivierung der Gluconeogenese einschließlich eines starken Anstiegs der hepatischen Glucoseabgabe (Yoon et al., 2001). PGC-1 α reguliert die Gluconeogenese dabei durch Koaktivierung von HNF-4 α : die leberspezifische Deletion dieses Transkriptionsfaktors in *knock-out* Mäusen führt zu einem Verlust der PGC-1 α -induzierten Stimulation der gluconeogenetischen Gene (Rhee et al., 2003). Die Promotoren von G6Pase und PEPCK enthalten mehrere Bindestellen für HNF-

4 α , über die hauptsächlich die Responsivität für PGC-1 α vermittelt wird (Yoon et al., 2001; Schilling et al., 2006). Mittels Präzipitationsversuchen von Proteindeletionskonstrukten wurden die Domänen ermittelt, über die PGC-1 α und HNF-4 α interagieren (s. Abbildung 4). Die Interaktion mit HNF-4 α wird durch eine carboxyterminale Domäne und durch das LXXLL-Motiv im N-Terminus (aa 142-146) von PGC-1 α vermittelt (Puigserver et al., 2003; Yoon et al., 2001).

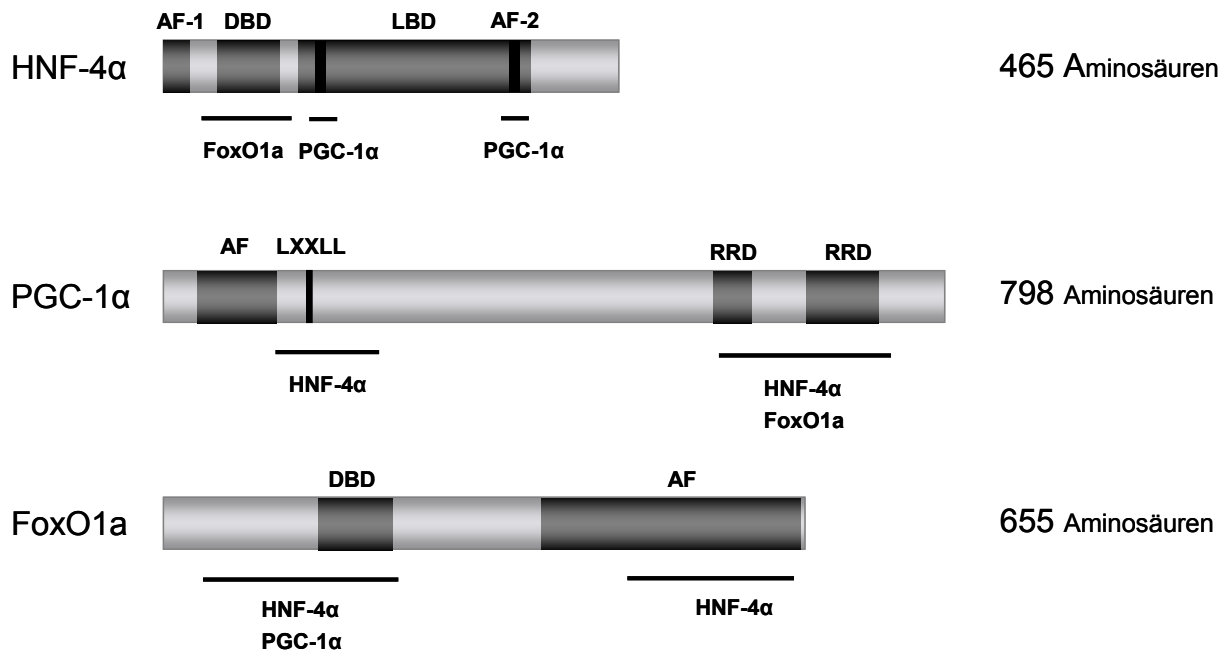


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Interaktionsdomänen von HNF-4 α , PGC-1 α und FoxO1a. AF, activation function; DBD, DNA binding domain; LBD, ligand binding domain; RRD, RNA recognition domain.

Der Kohlenhydratstoffwechsel wird durch antagonistische Hormone reguliert. Bei einem niedrigen Blutglucosespiegel und bei Stressreaktionen werden Glucagon und Glucocorticoide ins Blut ausgeschüttet, die die Glucoseneubildung und –abgabe aus der Leber erhöhen. Beim Ansteigen des Blutglucosespiegels wird Insulin sezerniert, das die hepatische Gluconeogenese unterdrückt. Insulin verringert die mRNA-Expression von PGC-1 α in Hepatocyten durch eine Akt-abhängige Unterdrückung der Transaktivierung durch drei FoxO-responsive DNA-Elemente im PGC-1 α -Promotor (Daitoku et al., 2003).

Eine direkte Inhibition der PGC-1 α -abhängigen Induktion der Gluconeogenese erfolgt wiederum durch die Proteinkinase Akt durch Phosphorylierung von PGC-1 α an Ser570. Während die ektopische Expression einer konstitutiv aktiven Akt in Mäusen eine durch PGC-1 α -Überexpression induzierte Transkription der gluconeogenetischen Enzyme und daraus

resultierende Hyperglykämie vollständig unterdrückt, wird dieser Effekt durch eine (nicht-phosphorylierbare) Alaninsubstitution an Position 570 teilweise verhindert. Die Rekrutierung von PGC-1 α an den Promotor der G6Pase wird durch Akt deutlich verringert, nicht jedoch die der S570A-Mutante. Demnach erfolgt die Inhibierung der hepatischen Gluconeogenese durch Insulin teilweise über die direkte Modifikation des Koaktivators PGC-1 α , der im Falle des G6Pase-Gens nach Insulinbehandlung nicht mehr an HNF-4 α binden kann (Li et al., 2007).

In enger Nachbarschaft zur HNF-4 α -Bindestelle des G6Pase-Promotors befinden sich mehrere FoxO-responsive Sequenzelemente über die der Promotor aktiviert wird (Schmoll et al., 2000). In HNF-4 α -defizienten Zelllinien bewirkt FoxO1a zusammen mit überexprimiertem HNF-4 α eine synergistische Aktivierung des G6Pase-Promotors (Hirota et al., 2008). Weiterhin interagiert FoxO1a bei Abwesenheit von Insulin mit PGC-1 α und die Aktivierung der G6Pase wie auch der Gluconeogenese durch PGC-1 α ist neben HNF-4 α auch auf die Anwesenheit von FoxO1a angewiesen (Puigserver et al., 2003; Matsumoto et al., 2007). Da sich beide Transkriptionsfaktoren in enger räumlicher Nähe auf dem G6Pase-Promotor befinden und beide über Bindedomänen zueinander (Hirota et al., 2003) und zu PGC-1 α verfügen (s. Abbildung 4), ist eine Komplexbildung der drei Faktoren wahrscheinlich, der bei Abwesenheit von Insulin zur Transaktivierung der G6Pase führt. Die Regulation hepatischer Zielgene von HNF-4 α und FoxO1a wird entscheidend von der Promotorstruktur dieser Gene mit beeinflusst. Als Beispiel dieses Einflusses wird hier die Regulation der G6Pase der gegenläufigen Regulation der Glucokinase gegenübergestellt.

Die Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-phosphat ist die erste Reaktion der Glycolyse sowie der Glycogensynthese und gleichzeitig die Umkehrung der von der G6Pase katalysierten Reaktion. In der Leber wird diese Phosphorylierung von der Glucokinase katalysiert, die in Anpassung an den Blutglucosespiegel vor allem durch Insulin und gegenläufig zur G6Pase reguliert wird. Interessanterweise erfolgt die Transkriptionskontrolle der Glucokinase wie im Falle der G6Pase durch HNF-4 α und FoxO1a. Während HNF-4 α beide Promotoren aktiviert, hat FoxO1a dagegen einen reprimierenden Effekt auf die HNF-4 α -induzierte Promotoraktivierung der Glucokinase. Diese reziproke Wirkung von FoxO1a erklärt sich durch die unterschiedlichen Promotorarchitekturen der beiden Gene; der Promotor der Glucokinase enthält keine Bindestelle für FoxO1a, das aber durch direkte Interaktion mit promotorgebundenem HNF-4 α dessen Transaktivierungspotential verringert. Insulinbehandlung führt zur Translokation von FoxO1a aus dem Zellkern in das Cytosol, ohne einen Einfluss auf die HNF-4 α -Lokalisation zu haben, woraus eine Dereprimierung der Glucokinase und eine Inhibierung der G6Pase resultieren. Diese Effekte der

insulinabhängigen FoxO-Wirkungen können experimentell durch Entfernen bzw. Einfügen von FoxO1a-Bindestellen durch genetische Manipulation der Promotoren von G6Pase und Glucokinase umgekehrt werden (Hirota et al., 2008).

2 Zielsetzung

Selenoprotein P (SeP), ein von der Leber sezerniertes Plasmaprotein, wird von extrahepatischen Organen und Geweben als Selenquelle für die Synthese essentieller Selenoproteine verwendet. Trotz seiner Bedeutung für die Selenhomöostase ist die Regulation der Biosynthese von SeP bisher nur in Ansätzen erforscht. Die Untersuchung eines Fragments des humanen SeP-Promotors zeigte eine Beeinflussung der Promotoraktivität durch verschiedene Cytokine und identifizierte potentielle Bindestellen allgemeiner und spezifischer Transkriptionsfaktoren (Dreher et al., 1997a). Kürzlich wurde die Beteiligung des Transkriptionsfaktors FoxO1a und des Hormons Insulin an der transkriptionellen Regulation der hepatischen Biosynthese von SeP nachgewiesen (Walter et al., 2008). Auf Grundlage dieser Arbeiten sollten weitere Faktoren identifiziert werden, die die Biosynthese von SeP kontrollieren. Auf der Ebene der transkriptionellen Regulation wurde die Erforschung weiterer in cis und trans agierender Faktoren beabsichtigt. Hierbei sollten insbesondere eine Beteiligung des Koaktivators PGC-1 α an der Regulation von SeP untersucht werden und diese mit der anderer insulinresponsiver, hepatischer Gene, wie z.B. der Glucose-6-phosphatase verglichen werden. SeP wird mit großen Unterschieden gewebespezifisch exprimiert; die Ursachen hierfür sind noch unbekannt und sollten ebenfalls aufgeklärt werden. Ergebnisse aktueller epidemiologischer Studien zeigen eine Korrelation der Serumselenkonzentration mit dem Blutglucosespiegel. Dies deutet auf einen Zusammenhang des Selenstoffwechsels mit dem Kohlenhydratstoffwechsel hin, der Konsequenzen für Stoffwechselkomplikationen wie den Typ 2 Diabetes hat. Die Grundlagen dieser Wechselwirkung sind gegenwärtig unbekannt. Da SeP den Großteil des Plasmaselens enthält, stellte sich die Frage nach einer möglichen Beeinflussung der SeP-Produktion durch Glucose und Hormone des Glucosestoffwechsels. Um diese Frage zu beantworten, sollte ein Modell der hormonellen und glucoseabhängigen Regulation der SeP-Expression in der Leber erstellt werden und zusätzlich die potentielle Einflussnahme eines die Gluconeogenese in der Leber inhibierenden Antidiabetikums (Metformin) auf diese Regulation überprüft werden.

3 Material und Methoden

Allgemeine Laborchemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von Roth oder Sigma-Aldrich bezogen. Geräte, die zur Grundausrüstung in molekular- und zellbiologischen Laboratorien gehören, entsprachen dem allgemeinen Standard und sind hier nicht einzeln aufgeführt.

3.1 Material

3.1.1 Puffer und Lösungen

Anodenpuffer I	300 mM Tris; 10 % (v/v) MeOH
Anodenpuffer II	25 mM Tris; 10 % (v/v) MeOH
Blockierlösung	5 % (w/v) Trockenmilchpulver in TBST
Gel-Ladepuffer (6x) für DNA	60 % (v/v) Glycerin; 1 % (w/v) SDS; 100 mM EDTA (pH 7.6); 0.03 % Bromphenolblau; 0.03 % Xylencyanol
Gel-Ladepuffer (4x) für Proteine	300 mM Tris-HCl pH 6.8; 8 % SDS; 40 % Glycerin; 400 mM β- Mercaptoethanol; 0.04 % (w/v) Bromphenolblau
Kathodenpuffer	25 mM Tris; 10 % (v/v) MeOH; 40 mM Glycin
Laufpuffer (für SDS-PAGE)	50 mM Tris; 500 mM Glycin; 0.1 % (w/v) SDS
PBS	137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 8 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1.47 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7.4)
Polyacrylamidgel (für SDS-PAGE)	
5 % Sammelgel	720 µl Rotiphorese Gel 40 (37,5:1); 650 µl Tris 1 M, pH 6,8; 3.5 ml Wasser; 50 µl SDS 10% (w/v); 50 µl APS 10% (w/v); 5 µl TEMED
10 % Trenngel	2.5 ml Rotiphorese Gel 40 (37,5:1); 2.5 ml 1,5 M Tris, pH 8,8; 4.8 ml Wasser; 100 µl SDS 10% (w/v); 100 µl APS 10% (w/v); 5 µl TEMED
TAE	40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA (pH 8.0)
TBE (0.5x)	45 mM Tris; 45 mM Borsäure; 1 mM EDTA (pH 8.3)
TBST	5 mM Tris-HCl (pH 7.5); 15 mM NaCl; 0.01 % (v/v) Tween-20

3.1.2 Zellkulturmaterialien

3.1.2.1 Zellen

HepG2

HepG2-Zellen stellen eine gut differenzierte humane Hepatomzelllinie dar, die aus einer Gewebeprobe eines Leberkarzinoms eines 15 Jahre alten Kaukasiers etabliert wurde. Die Zellen wachsen adherent und sind ein geeignetes *in-vitro* Modell, um die Biosynthese von der Leber sezernierter Plasmaproteine wie z.B. Selenoprotein P zu untersuchen (Knowles et al., 1980; Steinbrenner et al., 2006a). Die Zellen wurden von der Health Protection Agency bezogen (HPA, Salisbury, UK, No.: 85011430) und über maximal 40 Passagen in Kultur gehalten.

Primäre Rattenhepatocyten

Primäre Hepatocyten wurden aus erwachsenen, männlichen Wistar-Ratten mit Hilfe der Kollagenase-Perfusionstechnik isoliert und freundlicherweise von Herrn Dr. Roland Reinehr (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden nach der Isolierung für maximal vier Tage in Kultur gehalten.

SH-SY5Y

SH-SY5Y ist eine humane Neuroblastomzelllinie (HPA No.: 94030304), die aus einer Zelllinie (SK-N-SH) subkloniert wurde, die einer Knochenmarksbiopsie entstammt. Die Zellen wachsen adherent und wurden in Passagen 10 – 20 für Versuche verwendet.

MOG-G-CCM

MOG-G-CCM-Zellen entstammen einem humanen anaplastischen Astrozytom (HPA No.: 86022702). Die Zellen wachsen adherent und wurden in Passagen 9 – 14 für Versuche verwendet.

3.1.3 Kulturmedien

HepG2

Kulturmedium	RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, R7509)
	2 mM L-Alanyl-L-Glutamin („Glutamax“, Invitrogen)
	Pen/Strep 1x (100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin, PAA)

Versuchsmedium	10 % (v/v) fötales Rinderserum (PAA)
	RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, R7509)
	2 mM L-Alanyl-L-Glutamin („Glutamax“, Invitrogen)
	Pen/Strep 1x (100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin)
	200 nM Natriumselenit

Primäre Rattenhepatocyten

Kulturmedium	Williams' Medium E (Invitrogen, No.: 22551-022)
	2 mM L-Alanyl-L-Glutamin („Glutamax“, Invitrogen)
	Pen/Strep 1x (100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin)
	5 % (v/v) fötales Rinderserum
	100 nM Insulin; 100 nM Dexamethason
Versuchsmedium	Williams' Medium E (Invitrogen, No.: 22551-022)
	2 mM L-Alanyl-L-Glutamin („Glutamax“, Invitrogen)
	Pen/Strep 1x (100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin)
	200 nM Natriumselenit

SH-SY5Y und MOG-G-CCM

Kulturmedium	DMEM:Ham's F12 1:1 (Sigma-Aldrich, No.: 51445C)
	2 mM L-Alanyl-L-Glutamin („Glutamax“, Invitrogen)
	Pen/Strep 1x (100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin)
	10 % (v/v) fötales Rinderserum
Versuchsmedium	DMEM:Ham's F12 1:1 (Sigma-Aldrich, No.: 51445C)
	2 mM L-Alanyl-L-Glutamin („Glutamax“, Invitrogen)
	Pen/Strep 1x (100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin)
	200 nM Natriumselenit

3.1.3.1 Bakterienzellkultur

Plasmide wurden in *E.coli*, Stamm K-12 (*Fusion-blue competent cells*, Clontech) transformiert und vermehrt. Die Zellen wuchsen in LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7.5) in Gegenwart von Antibiotika (50 µg/ml Ampicillin, 20 µg/ml Chloramphenicol oder 50 µM Zeocin), die durch Resistenzgene der jeweiligen Plasmide inaktiviert wurden. Bei Selektion mit Zeocin wurde LB-Medium mit einer verringerten NaCl-Konzentration von 5 g/l verwendet.

3.1.4 Antikörper

3.1.4.1 Primäre Antikörper

human SeP	polyclonal rabbit anti-human SeP. Der polyklonale Antikörper wurde mittels Affinitätschromatographie aus dem Serum von Kaninchen gewonnen, die mit einem an KLH (keyhole limpet haemocyanin) gebundenen Epitop des humanen SeP-Proteins (aa 244-258) immunisiert worden waren (Mostert et al., 1998)
rat SeP	polyclonal rabbit anti-rat SeP. Der polyklonale Antikörper wurde als Auftragssynthese von Eurogentec (Seraing, Belgien) hergestellt und mittels Affinitätschromatographie aus dem Serum von Kaninchen gewonnen, die mit einem an KLH gebundenen Epitop des Ratten SeP-Proteins (aa 254-263) immunisiert worden waren.
PGC-1 α	polyclonal rabbit anti-human PGC-1 (H-300) (Santa Cruz, sc-13067)
HNF-4 α	polyclonal rabbit anti-human HNF-4 α (H-171) (Santa Cruz, sc-8987)
AMPK α	polyclonal rabbit anti-human AMPK α (23A3) (Cell Signaling)
phospho-AMPK α (Thr172)	polyclonal rabbit anti-human phospho-AMPK α (Thr172) (40H9) (Cell Signaling)

3.1.4.2 Sekundäre Antikörper

anti-rabbit IgG (für Western Blot)	polyclonal goat anti-rabbit IgG-HRP (horseradish peroxidase)-coupled (Dianova)
anti-rabbit IgG (für Immunstaining)	polyclonal goat anti-rabbit IgG-Alexa-Fluor 546-coupled (Invitrogen)

3.1.5 Enzyme

Superscript II RNase H ⁻ Reverse Transcriptase	Invitrogen
Restriktionsenzyme: NotI	Fermentas
PmeI	New England Biolabs
XbaI, HindIII	Roche
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
DNase I	Qiagen
Taq DNA Polymerase	Invitrogen

3.1.6 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pBud-PGC-1 α	PGC-1-Expressionsvektor	diese Arbeit
pBud-HNF-4 α	HNF-4 α -Expressionsvektor	diese Arbeit
pFoxO1a	FoxO1a-Expressionsvektor	Guo et al., 1999
pRL-SV40	Renilla Luziferase-Expressionsvektor	Promega
G6Pase-luc	G6Pase-Promotor-Luziferasekonstrukt	Schmoll et al., 1999
SeP-luc	SeP-Promotor-Luziferasekonstrukt	Mostert et al., 2001
SeP-Mut2-luc	inaktiviertes DBE2 ^a in SeP-luc	Walter et al., 2008
SeP-Mut3-luc	inaktiviertes HBE1 ^b in SeP-luc	diese Arbeit
SeP-Mut4-luc	inaktiviertes DBE2 und HBE1 in SeP-luc	diese Arbeit
pBudCE4.1 (pBud)	Leervektor, Edukt von pBud-PGC-1 α und pBud-HNF-4 α	Invitrogen
pCI-neo	Leervektor, Edukt von pFoxO1a	Promega
pGL3	Leervektor, Edukt von SeP-luc	Promega

^a DBE2: FoxO1a-Bindestelle im humanen SeP-Promotor (*daf 16 binding element 2*; daf 16 ist ein FoxO-homologer Transkriptionsfaktor in *C. elegans*)

^b HBE1: HNF-4 α -Bindestelle im humanen SeP-Promotor (*HNF-4 α binding element 1*)

3.1.7 Kits und Hilfsmaterialien

Expand High FidelityPlus PCR System	Roche
GeneJet Plasmid Miniprep Kit	Fermentas
High Fidelity PCR System	Invitrogen
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Reaction Mix	Roche
LightShift Chemiluminescent EMSA Kit	Pierce
NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	Pierce
PureYield Plasmid Midiprep System	Promega
Qiaquick PCR purification Kit	Qiagen
QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
RNeasy Mini Kit	Qiagen
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Allgemeine Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einem Sterilarbeitsplatz durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank (Heraeus) bei 37°C, 5% CO₂ und 99% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Vor Erreichen der Konfluenz wurden proliferierende Zellen in Abständen von drei bis vier Tagen passagiert. Dazu wurde das Medium entfernt, der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen und für 10-20 Minuten mit Trypsin-EDTA-Lösung im Brutschrank inkubiert. Die Ablösung der Zellen von der Kulturflasche wurde im Lichtmikroskop untersucht und ggf. durch leichtes Klopfen beschleunigt. Die Zellsuspension wurde dann in Kulturmedium aufgenommen und die Zellen durch Pipettieren vereinzelt. Für Versuche wurden die Zellen manuell (Neubauer-Zählkammer, Brand) oder automatisch (Countess Automated Cell Counter, Invitrogen) gezählt und in definierter Zellzahl ausgesät; zum Passagieren wurden sie in einem Verdünnungsverhältnis von 1:2 – 1:6 (je nach Zelllinie und Passagenzahl) ausgesät.

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen abgelöst, in Kulturmedium aufgenommen und zentrifugiert (1.200g, 5min). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in Medium mit 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) resuspendiert (1-2 Mio. Zellen/ml) und in Kryo-Röhrchen für 2h bei -20°C eingefroren. Dann wurden sie bei -80°C bzw. bei -196°C (Langzeitkonservierung) aufbewahrt. Zum Rekultivieren wurden die Zellen direkt nach dem Auftauen mit Kulturmedium im Verhältnis 1:3 verdünnt und zentrifugiert (1.200g, 5min). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden in 5ml Medium resuspendiert und in einer Kulturflasche im Brutschrank kultiviert. Nach 24h wurde das Medium ausgetauscht. Die Zellen wurden frühestens nach zwei Passagen für Versuche verwendet.

3.2.1.2 Bestimmung der Zellviabilität mittels MTT-Test

Die relative Zellviabilität eukaryotischer Zellen wurde mittels MTT-Assay untersucht. Dabei wird ein wasserlösliches Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) von lebenden, metabolisch aktiven Zellen aufgenommen und durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase zu einem violetten, unlöslichen Formazansalz reduziert. Im Vergleich unbehandelter mit kontrollbehandelten Zellen ist die Bildung des Formazansalzes ein Maß für die relative Zellviabilität.

Die Zellen wurden für 30 bis 90 min mit MTT (0.5 mg/ml MTT in Kulturmedium) im Brutschrank inkubiert, bis der violette Farbstoff in den Zellen zu erkennen war. Dann wurde das Medium entfernt, das Formazan durch Zugabe von DMSO gelöst und die relative Farbstoffkonzentration photometrisch bestimmt und auf den Wert unbehandelter bzw. kontrollbehandelter Zellen normiert.

3.2.1.3 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Transfektion von HepG2-Zellen mit FuGene6

HepG2-Zellen wurden in 6-Wellplatten ausgesät (400.000/Well). Am Folgetag wurde bei 50-80%iger Zellkonfluenz das Medium gegen antibiotikafreies Versuchsmedium ausgetauscht. Pro Well wurde ein Komplex aus 2 µg Plasmid-DNA und 6 µl FuGene 6 Transfektionsreagens (Roche) in 100 µl Optimem-Medium (Invitrogen) zu den Zellen gegeben.

Transfektion von SH-SY5Y-Zellen mit ExGen 500

SH-SY5Y-Zellen wurden in 6-Wellplatten oder 10 cm Ø-Schalen ausgesät (25.000 Zellen/cm²). Vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel auf antibiotikafreies Versuchsmedium. Pro Well wurde ein Komplex aus 3 µg Plasmid-DNA und 9.9 µl ExGen 500 Transfektionsreagens (Fermentas) in 200 µl 150 mM NaCl zu den Zellen gegeben.

3.2.1.4 Luziferaseassay

HepG2-Zellen wurden analog zu 3.2.1.3 mit 0.6 µg Firefly Luziferase-Promotorkonstrukt, 0.1 µg Renilla Luziferasekontrollvektor pRL-SV40 und gleichen Mengen von pBud-PGC-1α und / oder pFoxO1a oder den jeweiligen Leervektoren pBud bzw. pCI-neo, resultierend in einer DNA-Menge von 2 µg/Well, kotransfiziert. 24h nach der Transfektion wurde das Medium durch Versuchsmedium erneuert, und nach weiteren 18h wurden die Zellen in 1x PLB-Puffer lysiert. Die Aktivitäten der beiden Luziferasen wurden in den Zelllysaten in einer Chemilumineszenzreaktion mit Komponenten des Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) nach Angaben des Herstellers gemessen. Die Aktivität der Firefly Luziferase wurde auf die Aktivität der Renilla Luziferase normiert und dieser Wert der relativen Promotoraktivität auf die Aktivität des promotorlosen Firefly Luziferasekonstrukts pGL3 bezogen.

SH-SY5Y-Zellen wurden analog zu 3.2.1.3 mit 0.8 µg Firefly Luziferase-Promotorkonstrukt, 0.6 µg Renilla Luziferasekontrollvektor pRL-SV40 und gleichen Mengen von pBud-PGC-1α und / oder pBud-HNF-4α und / oder pFoxO1a oder den jeweiligen Leervektoren pBud bzw. pCI-neo, resultierend in einer DNA-Menge von 3 µg/Well, kotransfiziert. 24h nach der

Transfektion wurden die Luziferaseaktivitäten analog zur Durchführung mit HepG2-Lysaten gemessen.

3.2.2 Immunologische Methoden

Spezifische Proteine oder Proteinmodifikationen wurden in komplexen Proteingemischen oder in fixierten Zellen mittels Western Blot bzw. *in-situ* Immunfluoreszenz nachgewiesen.

3.2.2.1 Western Blot

Gesamtzelllysate oder Zellfraktionen wurden durch Zentrifugation (10.000 xg, 5 min) und Ultraschallbehandlung (8 microns, 5 sec) von unlöslichen Bestandteilen separiert und homogenisiert. Die Proteinkonzentrationen der Lösungen wurden photometrisch nach der Lowry-Methode (DC-Assay, BioRad) bestimmt. Dabei wurde die Absorption eines blauen Farbkomplexes bei 750 nm gemessen und die Proteinkonzentration der Lösung aus einer mit Rinderserumalbumin erstellten Kalibriergeraden berechnet. 10-50 µg Protein wurden mit Gel-Ladepuffer vermischt und nach Denaturierung (5 min bei 95°C) auf einem 10%igen, denaturierenden Polyacrylamidgel nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Proteine wurden dann aus dem Gel in einer *semi-dry* Blotapparatur auf eine Nitrocellulosemembran (HyBond-C Extra, GE Healthcare) unter Anlegung eines elektrischen Feldes (ca. 1.5 mA/cm² Gel für 1.5h) übertragen. Nach dem Proteintransfer wurden freie Bindestellen auf der Membran durch 1h Schütteln in Blockierlösung gesättigt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte in Blockierlösung (Verdünnung 1:500 oder 1:1.000) über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Membran 4x für 5 min mit TBST gewaschen. Es folgte eine 1- bis 3-stündige Inkubation mit dem an das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelten Sekundärantikörper (1:2.000 bis 1:10.000 in Blockierlösung) bei Raumtemperatur und erneutes Waschen der Membran mit TBST. Die mit dem Sekundärantikörper markierten Proteine wurden durch Chemilumineszenz nachgewiesen. Dazu wurde die Membran für fünf Minuten mit einer Lösung aus Luminol und Wasserstoffperoxid (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce) behandelt und das durch die Peroxidasereaktion emittierte Licht auf einem photographischen Film (Bio-Max-Film, Kodak) detektiert.

3.2.2.2 *In-situ* Immunfluoreszenz

Mit Hilfe dieser Methode wurde die Lokalisation von PGC-1α in fixierten HepG2-Zellen untersucht. Auf Glasplättchen gewachsene Zellen wurden nach Waschen mit PBS durch 10-minütige Behandlung mit Methanol bei -20°C fixiert. Methanol wurde dreimaliges

Waschen mit PBS für je 10 min entfernt. Die Zellen wurden unter langsamem Schütteln mit einer Lösung aus 0.3% Triton-X 100 und 3% Ziegennormalserum (ZNS) in PBS für 1h bei Raumtemperatur permeabilisiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (1:400 in PBS mit 1% ZNS) erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für je 15 min wurde eine Lösung des an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörpers (anti-rabbit Alexa-Fluor 546 1:800 in PBS) zu den Zellen gegeben und diese für 1h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Darauf wurde wiederum dreimal mit PBS für je 15 min gewaschen. Die Glasplättchen wurden mit einer DAPI-enthaltenden Fixierlösung (ProLong Gold Antifade reagent with DAPI, Invitrogen) auf Objektträgern aufgetragen und die Zellen in einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 100 TV, Zeiss) betrachtet. Mit DAPI gefärbte Zellkerne wurden bei einer Emissionswellenlänge von 488 nm detektiert; die Emission des an den Zweitantikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoffs (Alexa-Fluor 546) wurde im Wellenlängenbereich von 515-565 nm detektiert.

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 RNA-Isolierung und reverse Transkription

Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des RNeasy-Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert. Dabei binden Nukleinsäuren in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen an eine Silicamembran, von der DNA, Proteinverunreinigungen und Salze in zwei Waschschritten entfernt werden, und anschließend wird RNA mit Wasser von der Matrix eluiert. Bei der RNA-Isolierung aus transient transfizierten Zellen wurde das RNA-Lysat mit DNase I (Qiagen, Hilden) behandelt, um Plasmid-DNA vor der reversen Transkription zu entfernen. Die Konzentration und die Reinheit der isolierten RNA wurden photometrisch durch Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt. Die RNA wurde unter Verwendung des Enzyms *Superscript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Karlsruhe) für die Synthese komplementärer DNA (cDNA, *complementary DNA*) eingesetzt. Dazu wurde 1 µg Gesamt-RNA in einem Volumen von 10 µl zusammen mit 1 µM Oligo(dT)₁₅-Primer für 5 min bei 65 °C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Dann wurden 10 µl des folgenden Reaktionsansatzes hinzugefügt:

- 4 µl 5-fach Reaktionspuffer (Invitrogen)
- 2 µl DTT (100 mM)
- 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM)
- 2.5 µl Wasser
- 0.5 µl Reverse Transkriptase (200 U/µl, Invitrogen)

Die reverse Transkription erfolgte in einem Thermocycler für 1 h bei 42°C und wurde darauf durch Denaturieren des Enzyms (5 min, 65°C) beendet. Die so erhaltene cDNA wurde direkt für die konventionelle PCR und, nach Verdünnung mit Wasser im Verhältnis 1:5, für die Real-Time PCR verwendet.

3.2.3.2 Polymerase chain reaction

3.2.3.2.1 Konventionelle PCR

Diese PCR wurde mit der Taq DNA Polymerase von Invitrogen durchgeführt. Unter Eiskühlung wurden die folgenden Reaktionskomponenten in ein dünnwandiges PCR-Reaktionsgefäß pipettiert:

- 2 µl 10-fach Reaktionspuffer
- 0.4 µl dNTP-Mix (je 10 mM)
- 0.6 µl MgCl₂ (50 mM)
- 0.2 µl *forward* Primer (50 µM)
- 0.2 µl *reverse* Primer (50 µM)
- 14.5 µl Wasser
- 0.1 µl Taq DNA Polymerase (5 U/µl)

Zu diesem Reaktionsansatz wurden 2 µl cDNA zugegeben (dies entspricht 100 ng revers-transkribierter RNA) und die PCR in einem Thermocycler mit folgendem Temperatur- und Zeitprofil durchgeführt: initiale Denaturierung der DNA für 3 min bei 95°C, zyklische Wiederholung der Schritte Denaturierung (20 sec bei 95°C), Primer-Anlagerung (30 sec bei 55°C bzw. 57°C für HPRT1- und PGC-1 α -Primer) und Elongation (30 sec bei 72°C). Die Sequenzen der beiden Primerpaare sind in Tabelle 2 angegeben. Der Zyklus wurde zur Amplifikation des HPRT1- und des PGC-1 α -Fragments je 30 Mal wiederholt. Abschließend erfolgte eine finale Elongation für 5 min bei 72°C. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1%igen Agarosegel mit 1µg/ml Ethidiumbromid in 1x TAE-Puffer bei konstanter Spannung (5 V/cm Elektrodenabstand) elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend in einem

Geldokumentationssystem unter UV-Licht detektiert und photographisch dokumentiert. Die Spezifität der PCR unter Verwendung des jeweiligen Primerpaars wurde durch Analyse des Molekulargewichts des Amplifikats und durch die Abwesenheit anderer, unspezifisch amplifizierter DNA-Fragmente überprüft und bestätigt.

Gen	Primersequenz 5'-3' (F, <i>forward</i> ; R, <i>reverse</i>)
HPRT1	F: ATTCTTTGCTGACCTGCTGGATT
	R: CTTAGGCTTTGTATTTTGCTTTTC
PGC-1 α	F: CACCCACCACTCCTCCTCATAAAG
	R: ACAAATCTGCCCCTGCCAATC

Tabelle 2: Primersequenzen für die konventionelle PCR von humanem HPRT1 und humanem PGC-1 α .

3.2.3.2.2 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR wurde in einem *LightCycler 2.0* (Roche) unter Verwendung des *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Reaction Mix* (Roche) durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt 3 mM MgCl₂, *forward* und *reverse* Primer (je 0.5 μ M), 2 μ l 10-fach Reaktionspuffer (*LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I*) und 4 μ l im Verhältnis 1:5 verdünnter cDNA (dies entspricht 40 ng revers transkribierter RNA) in einem Gesamtvolumen von 20 μ l. Die PCR wurde in Glaskapillaren im *LightCycler 2.0* mit folgendem Temperatur- und Zeitprofil durchgeführt: initiale Denaturierung der DNA und Hitzeaktivierung der Taq DNA Polymerase für 10 min bei 95°C, zyklische Wiederholung der Schritte Denaturierung (10 sec bei 95°C), Primer-Anlagerung (10 sec bei einer primerspezifischen Temperatur) und Elongation (primerspezifische Elongationszeit bei 72°C). Die Sequenzen der für die Real-Time PCR verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 angegeben. Der Zyklus aus Denaturierung, Primer-Anlagerung und Elongation wurde 50 Mal wiederholt. Um die Spezifität des Amplifikats zu überprüfen, wurde im Anschluss an jede PCR eine Schmelzkurve (60-95°C) aufgenommen. Zusätzlich wurden analog zu 3.2.3.2.1 die PCR-Produkte auf einem Agarosegel untersucht.

Gen (Mensch)	Primersequenz 5'-3' (F, <i>forward</i>; R, <i>reverse</i>)
HPRT1	F: GACCAGTCAACAGGGGACAT R: GTGTCAATTATATCTTCCACAATCAAG
SeP	F: GGAGCTGCCAGAGTAAAGCA R: ACATTGCTGGGGTTGTCAC
PGC-1 α	F: CACCCACCACTCCTCCTCATAAAG R: ACAAATCTGCCCCTGCCAATC
G6Pase	F: TGCCAGCCTCCTCAAGAACC R: GAGGGCAGGCTGGAGTCACA
FoxO1a	F: GCCGAGCTGCCAAGAAGAAA R: TATGGGGAGGAGAGTCAGAAGTCA
HNF-4 α	F: ACGTCCCCATCAGAAGGCACCAAC R: CCAGGGGGAGCTCGCAGAAA

Tabelle 3: Primersequenzen für die Real-Time PCR humaner Gene

Gen (Ratte)	Primersequenz 5'-3' (F, <i>forward</i>; R, <i>reverse</i>)
HPRT1	F: GACCGGTTCTGTCTATGTCG R: ACCTGGTTCATCATCACTAATCAC
SeP	F: GACAGTGGTTGCTCTTCTTCAA R: TCGCAGGTCTTCCAATCTG
PGC-1 α	F: GCAGTCGCAACATGCTCA R: GGGTCATTTGGTGACTCTGG
G6Pase	F: CTCACCTTCCCCATCAGGTC R: GAAAGTTTCAGCCACAGCAA
β -Aktin	F: CCCGCGAGTACAACCTTCT R: CGTCATCCATGGCGAACT
SPS-2	F: CTTCCGATCGGTTTCTCTTG R: ATTGCCACGGTGGGTAAAG
SecS	F: AGACCTGAAAGCCGTGGAG R: AGGCACAGGATATGCTCAGG
Pstk1	F: GCCTCGTAATTCAGAGTTCAGC R: TGGGATTTTCCAAAGCAGTAA

Tabelle 4: Primersequenzen für die Real-Time PCR von Genen der Ratte

Die während der PCR entstehende DNA wird in Echtzeit durch Messung der Fluoreszenzintensität des sich in den DNA-Doppelstrang einlagernden Fluoreszenzfarbstoffs *SYBR Green* detektiert. Aus der zum Erreichen eines bestimmten Fluoreszenzschwellenwertes benötigten Zyklenzahl wird die relative Menge der in der Probe ursprünglich vorhandenen cDNA des Zielgens berechnet. Die Quantifizierung der mRNA-Expression der untersuchten Gene erfolgte dabei relativ unter Verwendung der Expression eines Referenzgens (HPRT1 oder β -Aktin) oder absolut unter Verwendung einer Kalibriergeraden, die aus der Amplifikation serieller Verdünnungen der zu amplifizierenden DNA-Sequenz erstellt wurde.

3.2.3.3 Klonierung von DNA

In dieser Arbeit wurden die proteincodierenden Sequenzen (CDS) zweier humaner Gene (PGC-1 α und HNF-4 α) in den eukaryotischen Expressionsvektor pBudCE4.1 kloniert und dadurch die Vektoren pBud-PGC-1 α und pBud-HNF-4 α generiert. Die dazu durchgeführten Einzelschritte umfassen die Amplifikation der CDS unter Einfügen von Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen an den DNA-Enden mittels PCR, die Restriktion und Ligation des gewonnenen PCR-Fragments mit dem restringierten Vektor, die Selektion und Vermehrung des Ligationsprodukts in Bakterien sowie die anschließende Identitätskontrolle mittels Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung.

3.2.3.3.1 Gewinnung der codierenden Sequenzen von PGC-1 α und HNF-4 α

Um eine möglichst fehlerfreie Amplifikation der proteincodierenden Sequenzen von humanem PGC-1 α und HNF-4 α zu gewährleisten, wurden für die folgenden PCR-Ansätze DNA-Polymerasen mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität eingesetzt, die somit eine Korrekturlesefunktion besitzen und dadurch DNA mit hoher Genauigkeit replizieren. Die CDS von PGC-1 α wurde unter Verwendung des *Expand High Fidelity^{Plus}* PCR Systems (Roche) aus einem PGC-1 α -Plasmid gewonnen, das uns von Dr. Bruce Spiegelman (Dana-Farber Cancer Institute and Department of Cell Biology, Harvard Medical School, Boston, USA) zur Verfügung gestellt worden war. Über die dabei verwendeten Primer (PGC1a-Not-F und PGC1a-PmeI-R) wurden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme NotI und PmeI eingefügt. Die CDS von HNF-4 α wurde in einer zweistufigen PCR aus revers transkribierter Gesamt-RNA von HepG2-Zellen gewonnen. Die 1. PCR wurde mit einem äußeren Primerpaar (HNF4a-cds-F und HNF4a-cds-R) unter Verwendung des *High Fidelity PCR* Systems von Invitrogen durchgeführt. Das entstandene PCR-Produkt wurde im Verhältnis 1:100 mit Wasser verdünnt und ohne weitere Aufreinigung als *Template* für die 2. PCR

verwendet. Dabei wurden über die Primer HNF4a-pBud-F und HNF4a-pBud-R Schnittstellen für die Restriktionsenzyme XbaI und HindIII eingeführt.

Primer für die	
Klonierung von PGC-1α	Primersequenz 5'-3' (F, <i>forward</i>; R, <i>reverse</i>)
PGC1a-Not-F	TACAGGCGGCGCCATGGCGTGGGACATGTGC
PGC1a-PmeI-R	ATGGTGTTTAACTTACCTGCGCAAGCTTCTCTG
Primer für die	
Klonierung von HNF-4α	
HNF4a-cds-F	CGGCGTGGAGGCAGGGAGAA
HNF4a-cds-R	GTCAAGGGTGGCAGTGGGATGTGG
HNF4a-pBud-F	TACAGAAGCTTGCCATGCGACTCTCCAAAACC
HNF4a-pBud-R	ATGGTTCTAGACTAGATAACTTCCTGCTTG

Tabelle 5: Primersequenzen für die Klonierung von humanem PGC-1 α und humanem HNF-4 α .

3.2.3.3.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die durch PCR synthetisierten DNA-Fragmente wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und deren Größe aus dem Vergleich mit Markerbanden bekannter Basenpaarlängen bestimmt. Das PCR-Fragment mit korrekter Größe wurde daraufhin mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA aus dem Agarosegel mit Hilfe des *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit* (Zymo Research) isoliert. Die DNA bindet dabei in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen an eine Silicamembran und wird nach zwei Waschschritten mit Wasser oder verdünntem Tris-HCl Puffer (5 mM, pH 8.0) eluiert.

3.2.3.3.3 Restriktion und Ligation von DNA

Die isolierten PCR-Fragmente und der Expressionsvektor pBudCE4.1 (pBud) wurden mit jeweils gleichen Kombinationen zweier Restriktionsendonukleasen behandelt, wodurch eine gerichtete Klonierung erreicht wurde. Im Falle der Klonierung von PGC-1 α wurden das mit den Primern PGC1a-Not-F und PGC1a-PmeI-R gewonnene PCR-Fragment und pBud im folgenden Ansatz restringiert:

- 10 μ l DNA (1-2 μ g)
- 4 μ l 10x Reaktionspuffer NEBuffer 4 (New England Biolabs)
- 4 μ l 10x BSA (New England Biolabs)
- 1 μ l NotI (10 U/ μ l, Fermentas)
- 1 μ l PmeI (10 U/ μ l, New England Biolabs)

Der Verdau erfolgte bei 37°C über Nacht. Für die Klonierung von HNF-4 α wurden das HNF-4 α -Fragment und der Vektor pBud analog restringiert, unter Verwendung der Restriktionsenzyme XbaI (10 U/ μ l, Roche) und HindIII (10 U/ μ l, Roche) in 1x Puffer B (Roche). Die restringierte DNA wurde anschließend mit dem *Qiaquick PCR purification Kit* (Qiagen) gereinigt und mit 5 mM Tris-HCl pH7.5 eluiert. Paare aus cDNA-Fragment und linearisiertem Vektor mit kohäsiven Enden wurden im Mengenverhältnis von etwa 3:1 mit 1 Unit T4 DNA Ligase (New England Biolabs) in 1x T4 DNA Ligasepuffer (New England Biolabs) in einem Volumen von 10 μ l bei 16°C über Nacht ligiert.

3.2.3.3.4 Transformation von E.coli-Zellen

Für die Transformation wurden 2 μ l des Ligationsansatzes zu 25 μ l kompetenten E.coli-Bakterien (Stamm K-12, *Fusion-blue competent cells*, Clontech) gegeben. Die Mischung wurde für 5 min auf Eis inkubiert, worauf die Hitzeschockbehandlung für 30 sec bei 42°C erfolgte, an die sich eine 5minütige Inkubation auf Eis anschloss. Der Transformationsansatz wurde darauf mit 120 μ l SOC-Medium versetzt und unter Schütteln für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das gesamte Volumen wurde auf Antibiotikum enthaltenden LB-Agarplatten ausgestrichen und die Bakterien über Nacht im Brutschrank bebrütet. Antibiotikaresistente und somit transformierte Bakterien wuchsen in vereinzelter Kolonien heran und wurden darauf in 5 ml LB-Flüssigmedium mit Antibiotikum über Nacht im Brutschrank vermehrt.

3.2.3.3.5 Präparation von Plasmid-DNA aus E.coli und DNA-Sequenzierung

Die Bakterien in 5ml Flüssigkulturen wurden durch Zentrifugation (5 min, 3000 x g) isoliert. Die darin enthaltene Plasmid-DNA wurde durch die Methode der alkalischen Lyse unter Verwendung des *GeneJet Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) isoliert. Die DNA wurde einem Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen unterzogen, welche die für die Klonierung verwendeten Schnittstellen erkennen. Die Sequenz der einklonierten cDNA wurde durch DNA-Sequenzierung nach der Sangermethode mit der *Cycle sequencing*-Technologie durch das Biologisch-Medizinische Forschungszentrum (BMFZ) der Universität Düsseldorf überprüft. Positive Klone mit korrekter Sequenz des Plasmid-*inserts* wurden in 200 ml Flüssigkulturen gezüchtet, woraus unter Verwendung des *PureYield Plasmid Midiprep System* (Promega) Kit ca. 200 μ g endotoxinfreie Plasmid-DNA isoliert wurde, die für die Transfektion von Zelllinien verwendet wurde.

3.2.3.4 Ortsspezifische *in-vitro* Mutagenese von DNA

In dem im Reportergenkonstrukt SeP-luc enthaltenen Fragment des humanen SeP-Promotors wurden an definierten Positionen Einzelnukleotidaustausche eingeführt. Dies wurde durch eine auf PCR basierende Methode erreicht, bei der die einzuführende Mutation in einem komplementären Paar von Primern enthalten ist. Die *mismatch*-Primer binden –unter Tolerierung einer oder weniger Fehlpaarung(en)- an die Zielsequenz in der Plasmid-DNA, die daraufhin durch eine DNA Polymerase mit Korrekturlesefunktion über die gesamte Länge des Plasmid repliziert wird. Durch mehrere Replikationszyklen wurde das mutierte Plasmid angereichert, und durch einen anschließenden enzymatischen Verdau wurde das Wildtypplasmid aus der Lösung entfernt. Schließlich wurde nach Transformation und Präparation der DNA der Erfolg der Mutagenese durch Sequenzierung überprüft (analog zu 3.2.3.3.5). Die für die Einführung der Nukleotidaustausche im Plasmid SeP-luc verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 6 angegeben.

Mutagenese-Primer	Primersequenz 5'-3' (F, <i>forward</i>; R, <i>reverse</i>)
SeP-HNF4-mut-F	GCAAGAATGAACAT <u>G</u> TAA <u>A</u> G <u>T</u> GTAAT <u>A</u> TACCTGAGGGG
SeP-HNF4-mut-R	CCCCTCAGGTAT <u>T</u> ATTC <u>A</u> C <u>A</u> CTTT <u>A</u> CATGTTCATTCTTGC
SeP-HNF4-mut-F2	GCAAGAATGAACATTGAA <u>A</u> GTTGGACTATACCTGAGGGG
SeP-HNF4-mut-R2	CCCCTCAGGTATAGTCCA <u>A</u> CTTTCAATGTTCATTCTTGC

Tabelle 6: Sequenzen der für die ortsspezifische *in-vitro* Mutagenese von SeP-luc verwendeten Primer. Nukleotide, die von der Wildtypsequenz des humanen SeP-Promotors abweichen, sind durch Fettdruck und Unterstreichen hervorgehoben.

Die Mutagenese wurde mit Komponenten des QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) in folgendem Ansatz durchgeführt:

1µl	SeP-luc Plasmid 10ng/µl (aus einem dam ⁺ -Stamm isoliert)
5µl	10x Pfu Reaktionspuffer (Stratagene)
1µl	Mutagenese-Primer F 10 µM (~125ng)
1µl	Mutagenese-Primer R 10µM (~125ng)
1µl	dNTP-Mix (je 10 mM)
40µl	Wasser
1µl	Pfu DNA-Polymerase (Stratagene)

Die Mutagenese-PCR erfolgte in einem Thermocycler mit folgendem Temperatur- und Zeitprofil: initiale Denaturierung der DNA für 30 sec bei 95°C, zyklische Wiederholung

(18 Zyklen) der Schritte Denaturierung (30 sec bei 95°C), Primer-Anlagerung (1 min bei 55°C) und Elongation (7 min bei 68°C). Anschließend wurde zum Mutageneseansatz 1 µl des Enzyms Dpn I (10 U/µl, Stratagene) gegeben und diese Mischung für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dpn I ist eine Restriktionsendonuklease, die methylierte DNA (6-Methyladenosin) der Sequenz 5'-Gm6ÄTC-3' spaltet. Da SeP-luc in methylierungskompetenten (*dam*⁺) *E.coli* Bakterien synthetisiert wurde und die durch die Pfu DNA-Polymerase in einem Thermocycler synthetisierte DNA nicht methyliert ist, wurde ein ausschließlicher Abbau des Wildtyp-Plasmids SeP-luc erreicht. Die Plasmide SeP-Mut3-luc und SeP-Mut4-luc wurden in sequentiellen Reaktionen gewonnen: SeP-luc wurde zunächst durch das Primerpaar SeP-HNF4-mut-F2/R2 mutiert und amplifiziert, woraus durch Mutagenese mit dem Primerpaar SeP-HNF4-mut-F/R das Konstrukt SeP-Mut3-luc entstand. Analog wurde das Konstrukt SeP-Mut2-luc in das Konstrukt SeP-Mut4-luc überführt.

3.2.3.5 Isolierung nukleärer Proteine und Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Die Bindung nukleärer Proteine an eine DNA-Sequenz wurde mittels *electrophoretic mobility shift assay* unter Verwendung von Komponenten des *LightShift Chemiluminescent EMSA Kit* (Pierce) untersucht. Diese Methode basiert auf der Verringerung der elektrophoretischen Mobilität eines markierten DNA-Doppelstrangs in einem Polyacrylamidgel nach Bindung von Proteinen. Nukleäre Proteine von HepG2- und SH-SY5Y-Zellen wurden durch sequentielle Membranalyse mit unterschiedlichen Detergentien (*NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents*, Pierce) gewonnen. Für die Analyse der in dieser Arbeit identifizierten HNF-4α-Bindestelle im humanen SeP-Promotor wurden Paare komplementärer, unmarkierter und 5'-biotinmarkierter Primer der Sequenz 5'-GAACATTGAACTTTGGACTATACCT-3' und der entsprechenden reversen Sequenz (Sigma-Aldrich) durch langsames Abkühlen von 95°C auf 8°C in einer Pufferlösung (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl) hybridisiert. Bindungsreaktionen von DNA und nukleären Proteinen erfolgten in einem Volumen von 20 µl, mit 2 µl 10x Bindepuffer (100 mM Tris pH 7.5, 500 mM KCl, 10 mM DTT), 1 µl Poly(dI:dC) (1 µg/µl), 20 fmol 5'-biotinmarkierter DNA und 5 µg nukleärem Proteinextrakt. In Kompetitionsreaktionen wurden 20 min vor der Zugabe der 5'-biotinmarkierten DNA 4 pmol unmarkierte DNA identischer Nukleotidsequenz oder 200 ng eines gegen HNF-4α gerichteten primären Antikörpers (Santa Cruz) zu den Reaktionsansätzen gegeben. Die Ansätze wurden für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit detergensfreiem Ladepuffer vermischt auf ein 6%iges Polyacrylamid-TBE-Gel aufgetragen und unter Eiskühlung bei konstanter Spannung von 100 V für ca. 45 min in 0.5x TBE

elektrophoretisiert. Die DNA bzw. die DNA/Proteinkomplexe wurden anschließend unter Eiskühlung in einer *Wet Blot*-Apparatur (*X Cell II*, Invitrogen) bei konstanter Stromstärke von 380 mA für 30 min in gekühltem 0.5x TBE-Puffer auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech) übertragen. Die DNA wurde durch fünfminütige Bestrahlung mit UV-Licht mit der Membran quervernetzt. Die Detektion der DNA erfolgte durch Chemilumineszenz nach Inkubation der Membran mit Streptavidin-gekoppelter Meerrettichperoxidase und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Pierce, *LightShift Chemiluminescent EMSA Kit*).

4 Ergebnisse

4.1 Transkriptionelle Regulation von Selenoprotein P durch HNF-4 α , FoxO1 α und PGC-1 α

Die Initiation der Transkription ist ein komplexer Prozess, an dem meist eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren und akzessorischen Proteinen wie z.B. Koaktivatoren und -repressoren beteiligt sind. Die Promotoren von humanem und murinem Selenoprotein P wurden kloniert, bisher sind aber nur wenige cis-regulatorische Elemente ermittelt und charakterisiert worden. Dazu zählen eine Interferon- γ - und eine TGF- β -responsive Sequenz (Dreher et al., 1997a; Mostert et al., 2001) sowie eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor FoxO1 α (Walter et al., 2008). Um ein detaillierteres Verständnis der transkriptionellen Regulation von SeP zu erhalten, sollten weitere Faktoren identifiziert werden, die neben FoxO1 α an dieser Regulation beteiligt sind. Eine Interaktion von FoxO1 α mit dem Koaktivator PGC-1 α wurde bei der hormonellen Regulation von zwei Schlüsselenzymen der Gluconeogenese beschrieben, der Glucose-6-phosphatase und der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (Puigserver et al., 2003). Daher sollte zunächst die Rolle dieses Koaktivators bei der SeP-Expression untersucht werden.

4.1.1 Stimulierung der SeP-Promotoraktivität durch PGC-1 α und FoxO1 α in HepG2-Zellen

4.1.1.1 Etablierung der transienten PGC-1 α -Überexpression

Der Einfluss von PGC-1 α auf die Promotoraktivität von SeP wurde in der humanen Hepatomzelllinie HepG2 untersucht. In HepG2-Zellen und anderen Hepatomzellen wird im Vergleich zu primären humanen Hepatocyten nur eine geringe Expression des Koaktivators PGC-1 α gefunden, wodurch die Expression zahlreicher leberspezifischer Gene beeinträchtigt ist (Oberkofler et al., 2004; Martínez-Jiménez et al., 2006). Um humanes PGC-1 α ektopisch zu exprimieren, musste zunächst dessen codierende Sequenz (CDS) in einen Expressionsvektor kloniert werden. Die PGC-1 α -cDNA wurde durch PCR aus einem Klonierungsvektor amplifiziert und in den humanen Expressionsvektor pBudCE4.1 (pBud) umklont. Die Struktur des klonierten Plasmidkonstrukts pBud-PGC-1 α ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt. In diesem Konstrukt kann PGC-1 α unter der Kontrolle des Promotors

des humanen Elongationsfaktors-1 α konstitutiv exprimiert werden. Die Identität von pBud-PGC-1 α wurde durch Restriktionsanalyse und durch Sequenzierung verifiziert.

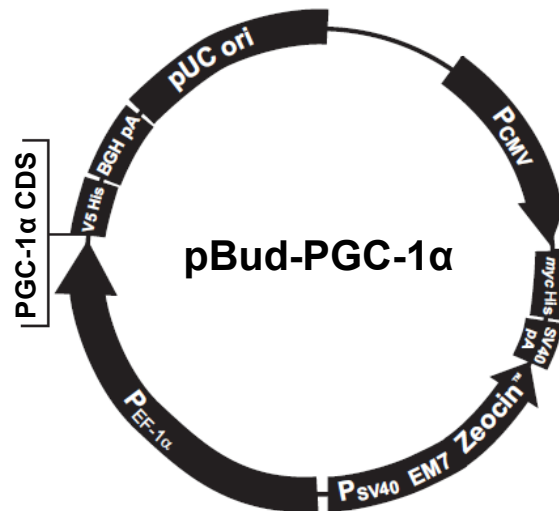


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pBud-PGC-1 α . Die codierende Sequenz des humanen PGC-1 α Gens wurde unter Verwendung der Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Not I und Pme I in die EF-1 α *multiple cloning site* des Vektors pBudCE4.1 (Invitrogen) kloniert. Modifiziert nach: Invitrogen, pBudCE4.1 (Catalog-Nr. V532-20).

Die transiente Transfektion von HepG2-Zellen mit pBud-PGC-1 α resultierte in der Überexpression von PGC-1 α . Abbildung 6 zeigt den Nachweis der Überexpression von PGC-1 α mRNA nach Transfektion von pBud-PGC-1 α mittels konventioneller RT-PCR. Das Haushaltsgen HPRT1 wurde zur Verifizierung gleicher cDNA-Mengen verwendet und ist in transfizierten und kontrolltransfizierten Zellen in gleicher Menge exprimiert. Kontrolltransfektionen mit dem Leervektor pBudCE4.1 wurden unter identischen Bedingungen und mit gleichen DNA-Mengen wie Transfektionen mit pBud-PGC-1 α durchgeführt. RNA-Präparationen plasmidtransfizierter Zellen sind oft mit Resten von Plasmid-DNA belastet. Zur Entfernung von Plasmid-DNA aus der isolierten Gesamt-RNA wurde diese vor Durchführung der RT-PCR mit DNaseI behandelt. Ohne die vorherige Umschreibung der mRNA in cDNA durch die reverse Transkriptase wurde kein PCR-Produkt generiert, demnach erfolgte die Amplifikation der Zielgene ausschließlich von cDNA und nicht von genomischer oder Plasmid-DNA. In Arbeiten von Walter et al. wurden HepG2-Zellen mit dem Reagens Polyfect transfiziert (Walter et al., 2008); hier wurde die Effizienz weiterer Transfektionsreagenzien mit der von Polyfect verglichen, wobei die Transfektionseffizienz durch Verwendung von FuGene 6 gesteigert werden konnte (s.

Abbildung 7). Alle Transfektionen von HepG2-Zellen wurden daher in dieser Arbeit mit FuGene 6 durchgeführt.

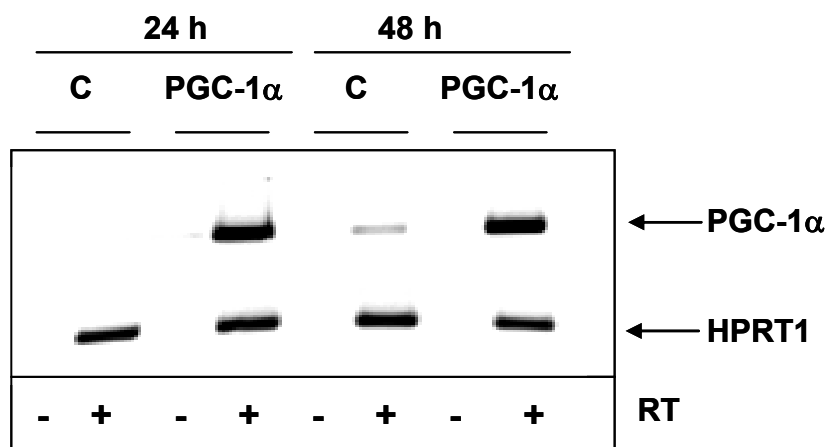


Abbildung 6: Überexpression der PGC-1 α -mRNA in pBud-PGC-1 α -transfizierten HepG2-Zellen. HepG2-Zellen wurden in serumfreiem Medium mit pBud-PGC-1 α (PGC-1 α) oder dem Kontrollvektor pBud (C, control) unter Verwendung von FuGene 6 transfiziert. 24h bzw. 48h nach der Transfektion wurde die Gesamt-RNA isoliert, mit DNaseI behandelt und die mRNA-Expressionen von PGC-1 α und dem Haushaltsgen HPRT1 mittels RT-PCR untersucht. Die PCR wurde mit (+) und ohne (-) vorherige reverse Transkription (RT) der isolierten RNA durchgeführt.

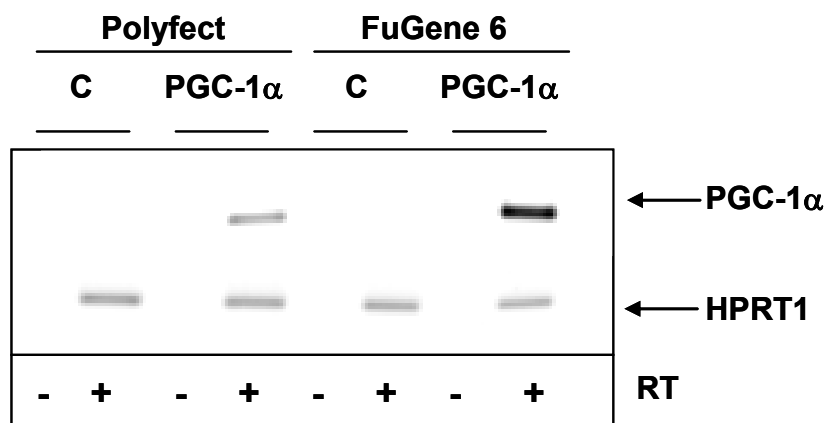


Abbildung 7: Vergleich der Transfektionseffizienz von HepG2-Zellen mit FuGene 6 und Polyfect. HepG2-Zellen wurden in 35 mm-Kulturschalen unter Verwendung von FuGene 6 oder Polyfect in serumfreiem Medium mit 2 μ g pBud-PGC-1 α oder pBud transfiziert. Die Detektion der PGC-1 α - und HPRT1-mRNA 24 h nach der Transfektion erfolgte wie in Abbildung 6.

Im Folgenden wurde untersucht, ob aus der Überexpression der PGC-1 α -mRNA eine Zunahme der Proteinmenge von PGC-1 α resultierte.

Die in-situ Immunlokalisation mit einem Antikörper gegen PGC-1 α weist dessen Expression in transfizierten HepG2-Zellen nach (s. Abbildung 8). PGC-1 α ist überwiegend im Zellkern vorhanden, da sich die Bereiche intensivster PGC-1 α -Färbung mit der Lokalisation des DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs DAPI decken. Gleichzeitig erkennt man nicht-transfizierten Zellen, in denen keine PGC-1 α -Expression sichtbar ist. Dies stimmt mit Literaturergebnissen überein, nach denen die Expression dieses Koaktivators in HepG2-Zellen im Vergleich zu humanem Lebergewebe und primären Hepatocyten um etwa 90 % verringert ist (Martinez-Jiménez et al., 2006).

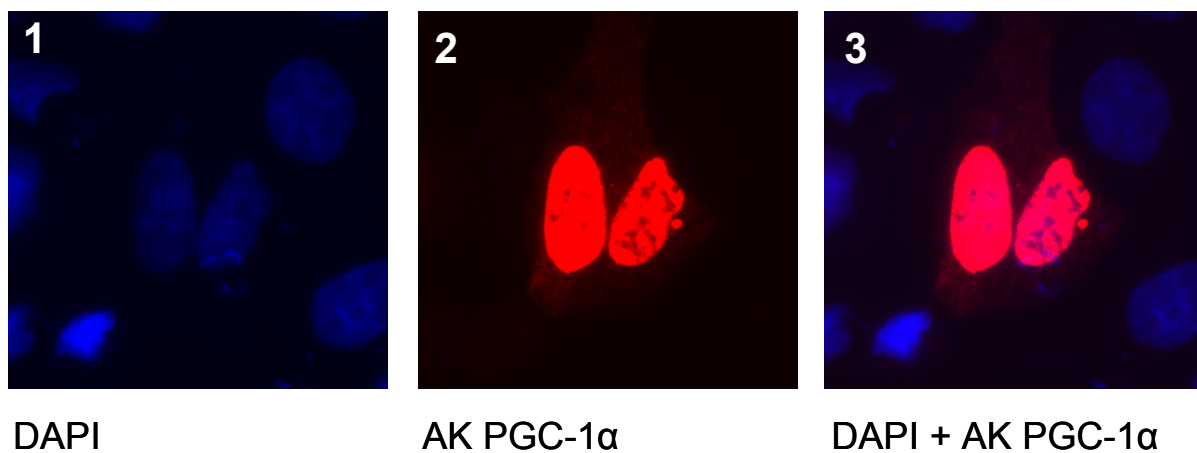


Abbildung 8: Kernlokalisierung von PGC-1 α in pBud-PGC-1 α -transfizierten HepG2-Zellen. PGC-1 α -transfizierte Zellen wurden 24h nach der Transfektion mit Methanol fixiert und mit DAPI sowie einem Antikörper gegen PGC-1 α inkubiert. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen (1) DAPI-gefärbte Zellkerne, (2) Immunfärbung von PGC-1 α und (3) Überlagerung von (1) und (2).

Die Kernlokalisierung von PGC-1 α ist Voraussetzung für dessen Funktion als Koaktivator von Transkriptionsfaktoren. Um diese Lokalisation und die Überexpression zu verifizieren, wurden nukleäre und cytosolische Proteine von HepG2-Zellen nach transients Transfektion fraktioniert und mittels Western-Blot auf die Expression von PGC-1 α untersucht. In Übereinstimmung mit den immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen bestätigte sich die ausschließliche Lokalisation von PGC-1 α im Zellkern transfizierter HepG2-Zellen (s. Abbildung 9). Das Molekulargewicht von humanem PGC-1 α beträgt 91 kDa. Eine zusätzliche Bande bei etwa 70 kDa tritt in allen Proben auf und resultiert vermutlich aus einer unspezifischen Bindung des polyklonalen Antikörpers an ein anderes, unidentifiziertes Protein.

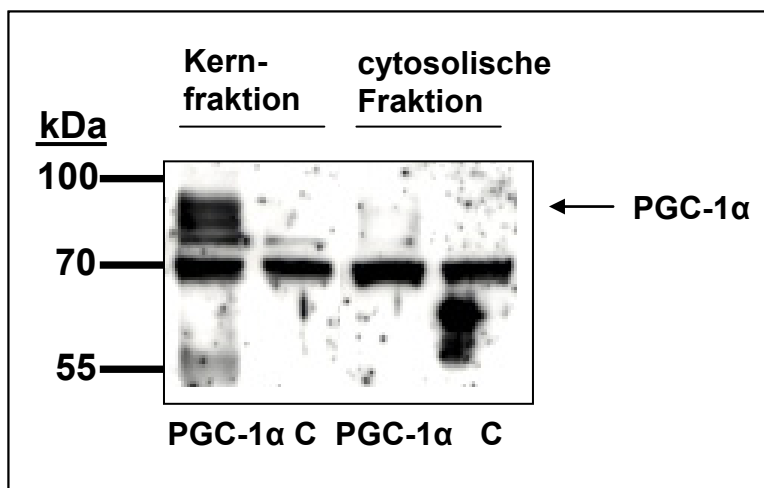


Abbildung 9: Kernlokalisierung von PGC-1 α in pBud-PGC-1 α -transfizierten HepG2-Zellen. Die Transfektion erfolgte wie in Abbildung 6. Nach 24h wurden Kern und Cytosol fraktioniert. Gleiche Proteinmengen der Fraktionen wurden mittels PAGE aufgetrennt und PGC-1 α mit einem spezifischen Antikörper (PGC-1 α H300, Santa Cruz Biotechnology) detektiert. PGC-1 α : pBud-PGC-1 α ; C (Control): pBudCE4.1.

4.1.1.2 Stimulierung der SeP-Promotoraktivität durch PGC-1 α und FoxO1a

Im Folgenden wurde untersucht, ob die transiente Überexpression von PGC-1 α die Promotoraktivität von SeP in HepG2-Zellen beeinflusst. Dazu wurde ein Reportergenkonstrukt verwendet (SeP-luc, Mostert et al., 2001), das ein etwa 1800 Basenpaare umfassendes Fragment des humanen SeP-Promotors *upstream* des Reportergens *Firefly luciferase* enthält.

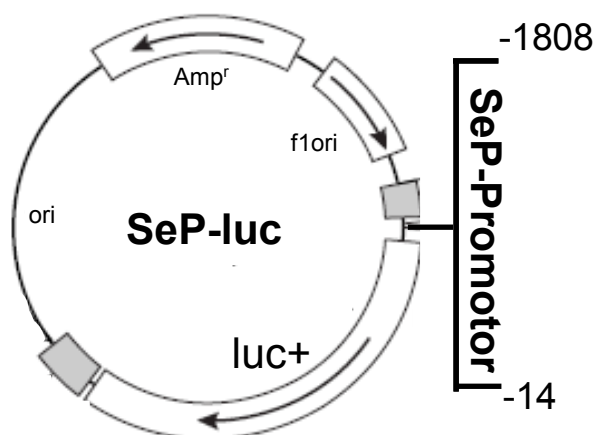


Abbildung 10: Schematische Darstellung des SeP-Promotorkonstrukts SeP-luc. Ein etwa 1800 bp Fragment des humanen SeP-Promotors wurde in den Luziferasevektor pGL3-Basic kloniert (Mostert et al., 2001). Die Nummerierung bezieht sich auf den hauptsächlichen Transkriptionsstartpunkt des humanen SeP-Gens. Modifiziert nach: Promega, pGL3-Basic Vector (Catalog-Nr.: E1751).

Die durch eine Lumineszenzreaktion leicht zu bestimmende Aktivität des Reportergens korreliert mit dessen Expressionsrate und ist damit ein direktes Maß der Aktivität des einklonierten Promotorfragments. Zur Normalisierung variierender Transfektionseffizienzen und Zellzahlen wurde ein zweites Plasmidkonstrukt kotransfiziert (pRL-SV40), das unter der Kontrolle des SV40-Promotors konstitutiv eine weitere Luziferase (*Renilla luciferase*) mit anderer Substratspezifität exprimiert. In den folgenden Versuchen wurde die Aktivität von SeP-luc auf die Aktivität von pRL-SV40 normiert.

Die Überexpression von PGC-1 α bewirkte eine signifikante Aktivierung des SeP-Promotors in HepG2-Zellen (Abbildung 11). Die Aktivierung des SeP-Promotors durch den Transkriptionsfaktor FoxO1a wurde bereits beschrieben (Walter et al., 2008) und dieser Effekt bestätigte sich hier, da die Überexpression von FoxO1a zu einer etwa zweifachen Verstärkung der basalen SeP-Promotoraktivität führte. Der FoxO1a-Expressionsvektor enthält die CDS von humanem FoxO1a unter der Kontrolle des CMV-Promotors im Vektor pAlter-MAX (Promega) (Guo et al., 1999). Im Vergleich zu FoxO1a war der Effekt von PGC-1 α jedoch deutlich stärker: PGC-1 α verursachte eine Steigerung der basalen Promotoraktivität um das siebenfache des Werts kontrolltransfizierter Zellen.

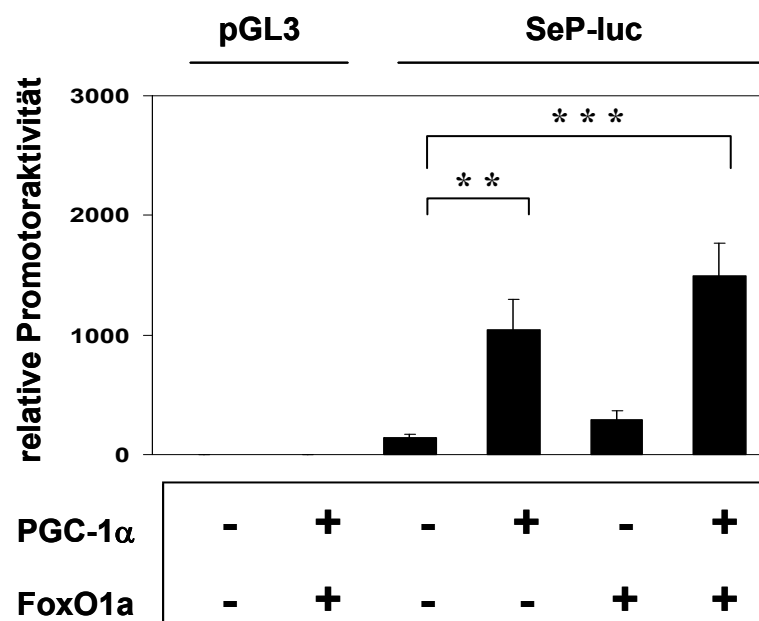


Abbildung 11: Aktivierung des SeP-Promotors durch PGC-1 α . HepG2-Zellen wurden mit dem Reportergenkonstrukt SeP-luc und Expressionsvektoren für PGC-1 α und / oder FoxO1a kotransfiziert. Transfektionen mit den insertfreien Expressionsvektoren pBudCE4.1 und / oder pCI-neo dienten als Negativkontrolle. 42h nach der Transfektion wurden die Luziferaseaktivitäten in den Zellysaten gemessen. Die Werte der SeP-Promotoraktivität wurden auf die Aktivität des promotorfreien Luziferasevektors pGL3 normiert. Die Werte stellen Mittelwerte $\pm$ SEM von drei bis fünf unabhängigen Versuchen dar.

Die Kotransfektion von FoxO1a und PGC-1 α führte zu einer weiteren Steigerung der Promotoraktivität um etwa das zehnfache der basalen Aktivität. Basale wie induzierbare Promotoraktivität resultierten aus der Anwesenheit des SeP-Promotorfragments bzw. der Transkriptionsfaktoren, da in Kontrollversuchen mit dem promotorlosen Reportergenkonstrukt pGL3 und den Leervektoren pCI-neo sowie pBud nur marginale Promotoraktivitäten messbar waren (s. Abbildung 11).

Die Genexpression der Glucose-6-phosphatase (G6Pase), eines Schlüsselenzyms der Gluconeogenese, wird in der Leber durch PGC-1 α und FoxO1a induziert (Puigserver et al., 2003). Die Untersuchung der Regulation der Promotoraktivität der G6Pase diente im Folgenden als Positivkontrolle, die mit der Regulation des SeP-Promotors verglichen wurde. Das Konstrukt G6Pase-luc wurde durch Einfügen eines etwa 1300 Basenpaare großen Fragments des humanen G6Pase-Promotors in den Vektor pGL3 generiert (Schmoll et al., 1999). Wie in Abbildung 12 dargestellt, bewirkten beide Faktoren eine Aktivierung des G6Pase-Promotors, wobei im Unterschied zum SeP-Promotor der aktivierende Effekt von FoxO1a gegenüber dem von PGC-1 α dominierte. Kotransfektion beider Faktoren führte zu einer synergistischen Induktion des G6Pase-Promotors, während bei Abwesenheit des G6Pase-Promotorfragments im Konstrukt pGL3 wiederum nur eine kaum messbare Hintergrundaktivität des Reportergens vorhanden war. Die Untersuchung eines Promotorfragments der G6Pase durch Schilling et al. ergab ähnliche Effekte durch die Überexpression von PGC-1 α und FoxO1a auf die G6Pase-Promotoraktivität (Schilling et al., 2006).

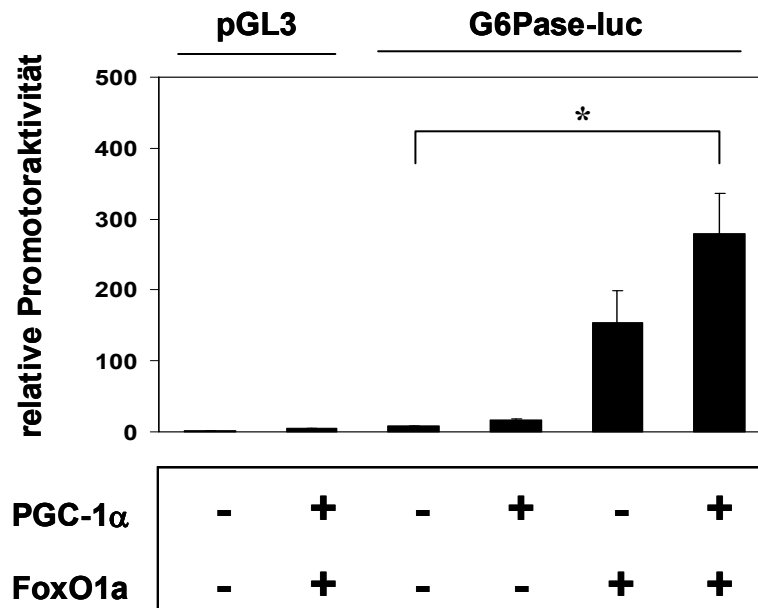


Abbildung 12: Aktivierung des G6Pase-Promotors durch PGC-1 α und FoxO1a. HepG2-Zellen wurden mit dem Reportergenkonstrukt G6Pase-luc und Expressionsvektoren für PGC-1 α und / oder FoxO1a kotransiziert. Durchführung und Auswertung erfolgten analog zu Abbildung 11.

Neben FoxO1a sind zahlreiche weitere Interaktionspartner von PGC-1 α bekannt (zusammengefasst in: Finck und Kelly 2006). Um zu überprüfen, ob PGC-1 α bei der Aktivierung des SeP-Promotors auf FoxO1a angewiesen ist, wurde ein von Walter et al (2008) generiertes SeP-Promotorkonstrukt mit der mutierten FoxO1a-Bindestelle DBE2 verwendet (SeP-Mut2-luc). Diese Mutation bewirkte einen Verlust der Induzierbarkeit des Promotors durch FoxO1a-Überexpression und eine Verringerung der basalen Promotoraktivität um etwa 50 % im Vergleich zum Wildtyp-Promotor, womit Ergebnisse von Walter et al. (2008) zur Relevanz der FoxO1a-Bindestelle bestätigt werden konnten. Die PGC-1 α -abhängige Induzierbarkeit des SeP-Promotors war durch Inaktivierung der FoxO1a-Bindestelle jedoch nicht beeinträchtigt. Trotz Inaktivierung der FoxO1a-Bindestelle führte die Überexpression von PGC-1 α sogar zu einer fast 20-fachen Steigerung der basalen Promotoraktivität von SeP-Mut-2-luc, die damit die Stimulation des Wildtyppromotorkonstrukts SeP-luc übertraf. Die Koexpression von FoxO1a führte zu nur einer geringen Steigerung der durch PGC-1 α induzierten Aktivierung des SeP-Promotors (Abbildung 13).

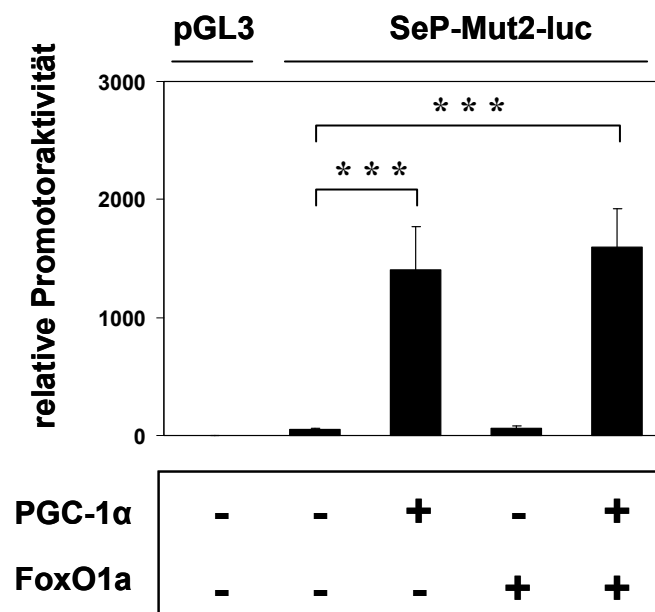


Abbildung 13: FoxO1a-unabhängige Aktivierung des SeP-Promotors durch PGC-1 α in HepG2-Zellen. HepG2-Zellen wurden mit dem Reportergenkonstrukt SeP-Mut2-luc und Expressionsvektoren für PGC-1 α und / oder FoxO1a kotransfiziert. Durchführung und Auswertung analog zu Abbildung 11.

4.1.2 Identifizierung und Charakterisierung einer Bindestelle für HNF-4 α im humanen SeP-Promotor

Da PGC-1 α selbst nicht an DNA binden kann, lässt sich aus den in Abbildung 11 und Abbildung 13 dargestellten Ergebnissen schlussfolgern, dass ein anderer Transkriptionsfaktor zusätzlich zu FoxO1a die Stimulation der Promotoraktivität von SeP durch den Koaktivator PGC-1 α vermittelt. Die Sequenz des verwendeten Promotorfragments wurde daraufhin mit dem Programm MatInspector (Genomatix) auf mögliche andere Bindestellen von Transkriptionsfaktoren untersucht. Diese Suche identifizierte eine potentielle Bindestelle für den gewebespezifisch exprimierten Transkriptionsfaktor HNF-4 α . Aufgrund der unmittelbaren Nähe dieser potentiellen Bindestelle zur FoxO1a-Bindestelle DBE2 des SeP-Promotors und der Bedeutung der HNF-4 α -Bindestelle bei der PGC-1 α -abhängigen Induktion des G6Pase-Promotors (Schilling et al., 2006) und zahlreicher anderer Promotoren, wurde sie im Folgenden näher untersucht. Die direkteste Methode, die Relevanz einer DNA-Sequenz für die transkriptionelle Regulation eines (Reporter-) Gens zu überprüfen, besteht in der Deletion oder Mutation dieser Sequenz. DNA-Bindestellen von HNF-4 α wurden an Promotoren zahlreicher HNF-4 α -regulierter Gene identifiziert und sind in Datenbanken wie z.B. TRANSFAC (Biobase GmbH) eingetragen. Aus der Analyse dieser Sequenzen konnten die für die Bindung von HNF-4 α kritischen Positionen der putativen HNF-4 α -Bindestelle

identifiziert werden, und deren Ausschaltung durch Generierung von Punktmutationen war das Mittel der Wahl. Eine Deletion der HNF-4 α -Bindestelle kam auch aufgrund von deren Lage direkt neben der FoxO1a-Bindestelle DBE2 nicht in Frage. Im Gegensatz zu FoxO1a, das an eine hochkonservierte Konsensussequenz bindet, ist HNF-4 α diesbezüglich variabler, so dass die Mutation mehrerer Nukleotidpositionen nötig war, um eine Bindung von HNF-4 α mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließen zu können.

Ausgehend vom Wildtyppromotor SeP-luc bzw. der Mutante SeP-Mut2-luc wurden durch ortsspezifische in-vitro Mutagenese die Mutanten SeP-Mut3-luc und SeP-Mut4-luc generiert. Die potentielle HNF-4 α -Bindestelle wurde dabei mit HBE1 benannt (*HNF-4 α binding element 1*). Die generierten Konstrukte enthalten Punktmutationen in der HBE1 alleine oder in Kombination mit der mutierten FoxO1a-Bindestelle DBE2. Aufgrund der hohen Anzahl von sieben Einzelnukleotidaustauschen im HBE1 war die sequentielle Durchführung von zwei Mutagenesereaktionen mit zunächst zwei, gefolgt von fünf weiteren Einzelnukleotidaustauschen nötig. Der Nachweis der erfolgreichen *in-vitro* Mutagenese erfolgte durch Sequenzierung der Konstrukte. Die Lokalisation der HNF-4 α -Bindestelle HBE1 und der FoxO1a-Bindestelle DBE2 im humanen SeP-Promotor sowie die vier im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten SeP-Promotorkonstrukte sind in Abbildung 14 schematisch dargestellt.

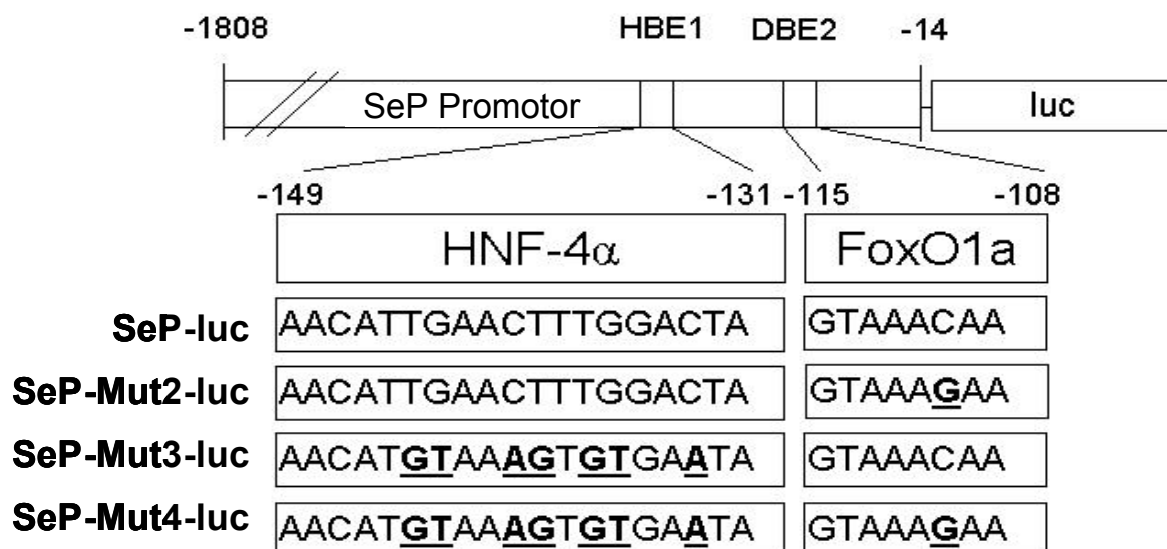


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Lage der Bindestellen der Transkriptionsfaktoren HNF-4 α (HBE1) und FoxO1a (DBE2) im humanen SeP-Promotor. Die durch ortsspezifische in-vitro Mutagenese erzeugten Nukleotidaustausche der SeP-Reporterkonstrukte sind hervorgehoben.

Die Relevanz der putativen HNF-4 α -Bindestelle für die Aktivität des SeP-Promotors zeigte sich bereits im Vergleich der basalen Aktivitäten der vier Reportergenkonstrukte. Die Inaktivierung der HBE1 in den Konstrukten SeP-Mut3-luc und SeP-Mut4-luc resultierte in einer drastischen Abnahme der Promotoraktivitäten in HepG2-Zellen auf weniger als 10 % des Werts des Wildtyppromotorkonstrukts SeP-luc. Die Inaktivierung der FoxO1a-Bindestelle verursachte ebenfalls eine signifikante, im Vergleich zur HBE1 aber deutlich schwächere, Verringerung der basalen Promotoraktivität um etwa 50 %.

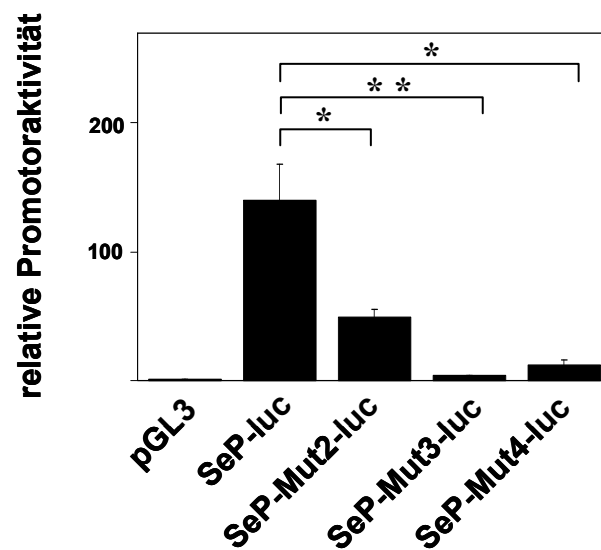


Abbildung 15: Auswirkung von Punktmutationen in den Bindestellen für HNF-4 α und FoxO1a auf die basale Aktivität des SeP-Promotors. HepG2-Zellen wurden mit den jeweiligen Reportergenkonstrukten transfiziert. Durchführung und Auswertung erfolgten analog zu Abbildung 11.

Die Induzierbarkeit des SeP-Promotors durch Überexpression von FoxO1a und PGC-1 α war nach Inaktivierung der HBE1 in den Konstrukten SeP-Mut3-luc und SeP-Mut4-luc fast vollständig aufgehoben. Die Kotransfektion der beiden Faktoren führte zwar zu einer Stimulierung der HBE1-mutierten Konstrukte, doch auch die dadurch erreichten Promotoraktivitäten betrugen nur maximal 30 % der basalen Aktivität des Wildtyppromotorkonstrukts SeP-luc bzw. 3 % der durch FoxO1a/PGC-1 α -stimulierten Aktivität von SeP-luc (Abbildung 16).

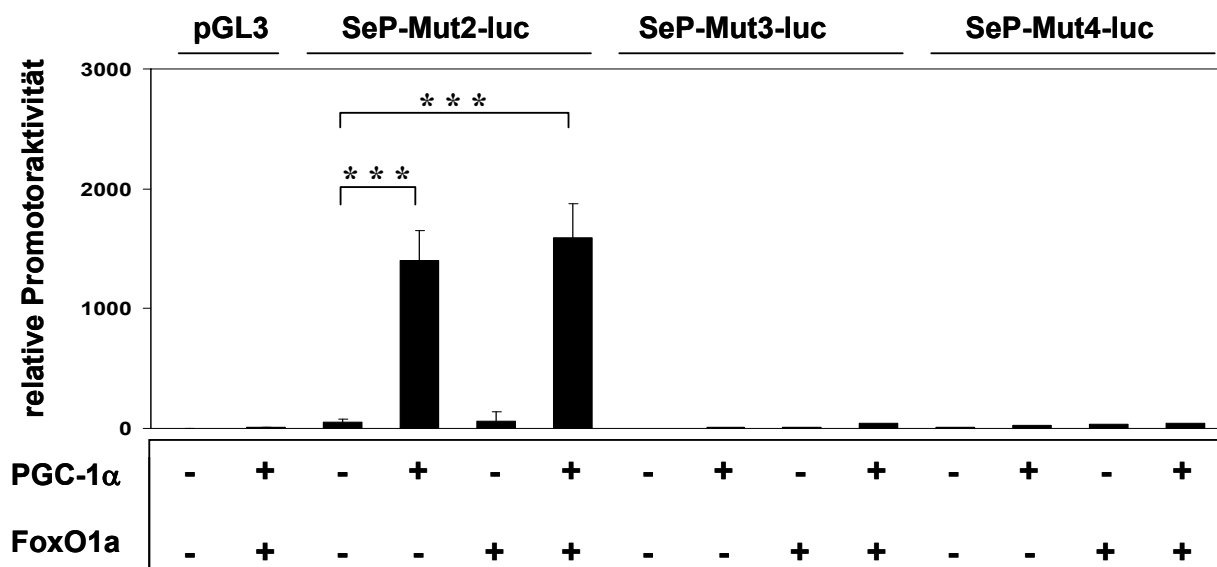


Abbildung 16: Auswirkung von Punktmutationen in den Bindestellen für HNF-4α und FoxO1a auf die Induzierbarkeit des SeP-Promotors. HepG2-Zellen wurden mit den Reporter-genkonstrukten SeP-Mut2/3/4-luc und Expressionsvektoren für PGC-1α und / oder FoxO1a kotransfiziert. Durchführung und Auswertung erfolgten analog zu Abbildung 11 (n=3-5).

4.1.2.1 Nachweis der Bindung von HNF-4α an den humanen SeP-Promotor

Zur weiteren Charakterisierung des im SeP-Promotor identifizierten HNF-4α *binding element 1* sollte nun untersucht werden, ob eine direkte Bindung des Transkriptionsfaktors an das HBE1 stattfindet. Dazu wurde die Methode der Gelretardierung (*electrophoretic mobility shift analysis*; EMSA) angewandt. Dabei wird das Laufverhalten eines die potentielle Bindestelle enthaltenden, markierten DNA-Doppelstrangs während einer Gelelektrophorese untersucht. Die Interaktion mit einem Protein resultiert dabei in einer Verringerung der elektrophoretischen Mobilität, wobei Spezifität und Identität des interagierenden Proteins durch Kompetition und mittels spezifischer Antikörper untersucht werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein nicht-radioaktiver EMSA etabliert, bei dem die zu untersuchende DNA mit Biotin markiert war. Die einzelnen Schritte des EMSA -Bildung des DNA-Protein-Addukts, Elektrophorese und Detektion der biotin-markierten DNA mittels eines Streptavidin-Meerrettichperoxidasekonjugats- wurden zunächst in Kontrollreaktionen mit validierten DNA- und Proteinkomponenten etabliert. Dazu wurde das EBNA-System eingesetzt, bei dem der EMSA mit einer Kombination des Transkriptionsfaktors *Epstein-Barr Nuclear Antigen* (EBNA) und einer Ziel-DNA-Sequenz durchgeführt wird.

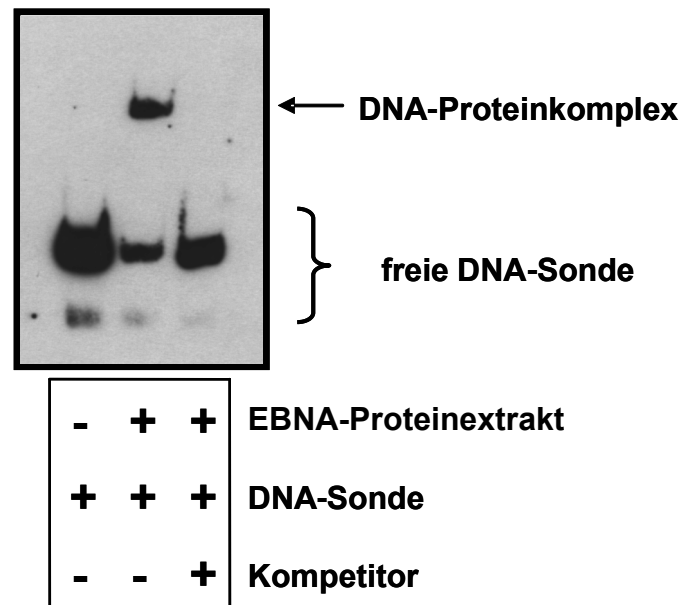


Abbildung 17: EMSA-Etablierung mit Hilfe des EBNA-Systems. EBNA-Proteinextrakt wurde mit biotinmarkierter EBNA-DNA (DNA-Sonde) und / oder einem 200-fachen Überschuss nicht-markierter EBNA-DNA (Kompetitor) inkubiert. Details bzgl. der Bindungsreaktion, Elektrophorese und Detektion s. Material und Methoden.

Das Ergebnis der EMSA-Etablierung ist in Abbildung 17 dargestellt. Bei Abwesenheit des Proteinextrakts erkennt man eine dominierende Bande, die die Laufstrecke ungebundener DNA markiert. Die Zugabe des Proteinextrakts führt unter Abnahme der Menge an freier DNA-Sonde zum Erscheinen einer zweiten Bande mit verringerter elektrophoretischer Mobilität („*shift*“), die aus der Bindung des EBNA-Proteins an die markierte DNA-Sonde resultiert. Die Kompetition mit einem Überschuss nicht-markierter DNA führt zur vollständigen Unterdrückung des *shifts*, der demnach durch eine spezifische Interaktion der EBNA mit der DNA-Sonde entstand.

Die mit Hilfe des EBNA-Systems etablierten Reaktionsbedingungen wurden im Folgenden zur Untersuchung der Bindung von HNF-4 α an die potentielle HNF-4 α -Bindestelle des humanen SeP-Promotors übernommen. Die Inkubation der HBE1-enthaltenden DNA-Sonde (5'-GAACATTGAACTTTGGACTATACCT-3') mit einem Kernextrakt von Proteinen aus unbehandelten HepG2-Zellen führte zur Ausbildung eines Protein-DNA-Komplexes mit verringerter elektrophoretischer Mobilität im Vergleich zur freien DNA-Sonde (s. Abbildung 18). Die Sequenzspezifität der Komplexbildung zeigte sich wiederum durch die Kompetition mit der nicht-markierten DNA-Sonde, die zur vollständigen Unterdrückung des sichtbaren

shifts führte. Durch Zugabe eines gegen HNF-4 α gerichteten Antikörpers zum HepG2-Kernextrakt vor der Inkubation mit der DNA-Sonde wurde die Ausbildung des spezifischen *shifts* fast vollständig verhindert. Dies zeigt, dass *in vitro* hauptsächlich HNF-4 α an das HBE1 des humanen SeP-Promotors bindet.

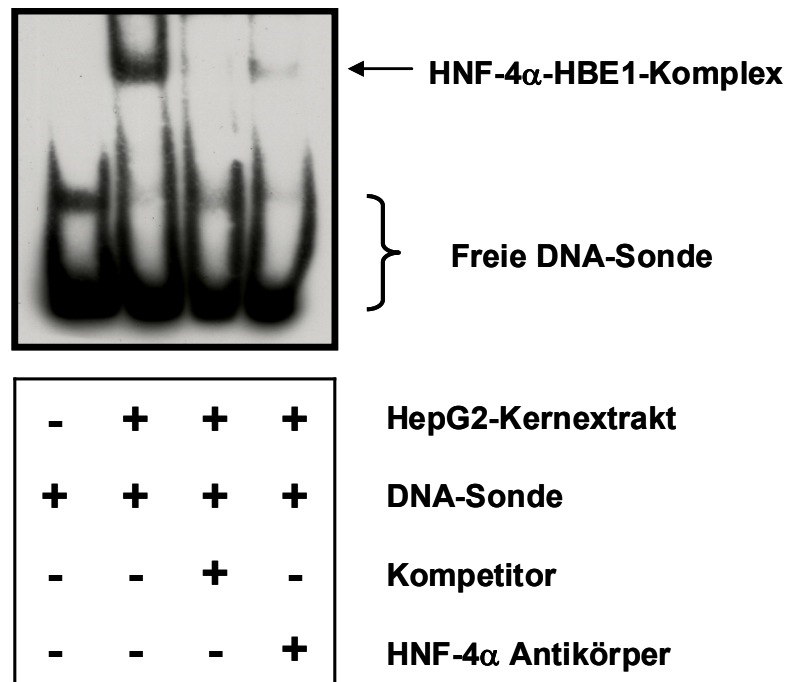


Abbildung 18: HNF-4 α bindet an das HBE1 des humanen SeP-Promotors. Kernproteine wurden nach 24-stündiger Kultivierung von HepG2-Zellen in serumfreiem Medium isoliert und mit einem biotinmarkierten DNA-Doppelstrang inkubiert, dessen Sequenz das HBE1 des SeP-Promotors enthält. Den gekennzeichneten Ansätzen wurde in der Bindungsreaktion ein 200-facher Überschuss des unmarkierten DNA-Doppelstrangs gleicher Sequenz oder ein gegen HNF-4 α gerichteter Antikörper zugegeben. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche mit ähnlichen Ergebnissen.

4.1.3 HNF-4 α -vermittelte gewebespezifische Expression von Selenoprotein P

Hinsichtlich der Bedeutung der HNF-4 α -Bindestelle für die basale Aktivität des SeP-Promotors (s. Abbildung 15) und der gewebespezifischen Expression dieses Transkriptionsfaktors (Drewes et al., 1996), postulierten wir für HNF-4 α eine Rolle bei der gewebespezifischen Expression von SeP. Im Menschen wurden mittels Northernhybridisierungen und Real-Time RT-PCR eine starke mRNA-Expression von SeP in der Leber und eine deutlich schwächere Expression im Gehirn detektiert (Dreher et al., 1997b; Hoffmann et al., 2007). Im Folgenden wurden die Transkriptmengen von SeP und der drei Faktoren der transkriptionellen Regulation von SeP in einer Hepatomzelllinie (HepG2) mit denen zweier aus Hirnzellen hervorgegangenen Zelllinien (SH-SY5Y humane

Neuroblastomzellen und MOG-G-CCM humane Astrocytomzellen) verglichen. Die Beteiligung von HNF-4 α an der gewebespezifischen Expression von SeP sollte weiterhin durch dessen Überexpression in einer nichtheptatischen Zelllinie mit niedriger endogener HNF-4 α Expression überprüft werden. Dazu wurde das cDNA-Fragment für die codierende Sequenz des Transkriptionsfaktors HNF-4 α aus revers-transkribierter RNA von HepG2-Zellen in einer *nested*-PCR amplifiziert und in den humanen Expressionsvektor pBudCE4.1 einkloniert. Die Transkription der HNF-4 α -cDNA steht in diesem Konstrukt (pBud-HNF-4 α) unter der Kontrolle des viralen CMV-Promotors (*Cytomegalovirus*) (Abbildung 19), der in humanen Zellen konstitutiv aktiv ist. Die Identität des Konstrukts wurde durch Restriktionsverdaus und mittels DNA-Sequenzierung bestätigt.

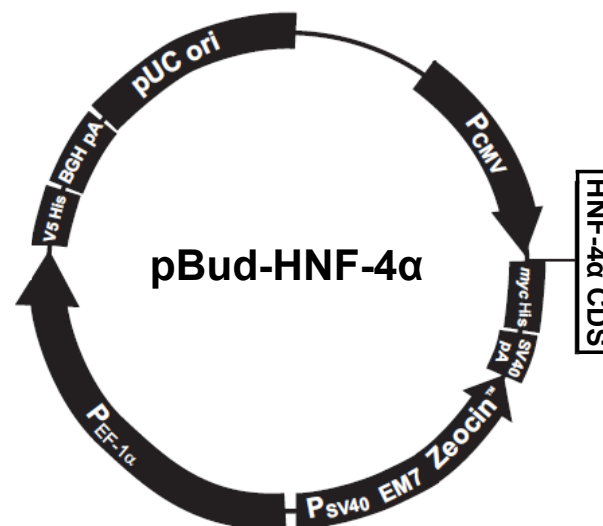


Abbildung 19: Schematische Darstellung des generierten Expressionsvektors pBud-HNF-4 α . Die codierende Sequenz des humanen HNF-4 α Isoform B-Transkripts (Genbank ID: NM_000457.3) wurde unter Verwendung der Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Xba I und Hind III in die CMV *multiple cloning site* des Vektors pBudCE4.1 (Invitrogen) kloniert. Modifiziert nach: Invitrogen, pBudCE4.1 (Catalog-Nr. V532-20).

4.1.3.1 Vergleich der mRNA-Expression von Selenoprotein P sowie der drei Faktoren HNF-4 α , FoxO1a und PGC-1 α in Leber- und Hirnzellen

Die absoluten Transkriptmengen der einzelnen mRNAs in HepG2-, SH-SY5Y- und MOG-G-CCM-Zellen wurden mittels Real-Time RT-PCR bestimmt. Dazu wurden zunächst durch die Amplifikation serieller Verdünnungen der PCR-Fragmente bzw. der klonierten cDNA jedes Zielgens Kalibriergeraden erstellt. Anhand dieser Geraden wurden dann die mRNA-Kopienzahlen von SeP, HNF-4 α , FoxO1a und PGC-1 α bestimmt und diese auf die Kopienzahl des Haushaltsgens HPRT1 normiert. Aus Abbildung 20 ist ersichtlich, dass im

Vergleich zu HepG2-Zellen die SeP-mRNA in den beiden aus Hirnzellen hervorgegangenen Zelllinien nur minimal exprimiert wird (etwa 1/1000); in SH-SY5Y und MOG-G-CCM sind etwa gleiche Mengen der SeP-mRNA vorhanden. Bei einem Vergleich der Transkriptmengen von Selenoproteinen in verschiedenen Organen der Maus zeigte sich ebenfalls eine deutlich niedrigere Expression von SeP im Gehirn im Vergleich zur Leber (Hoffmann et al., 2007).

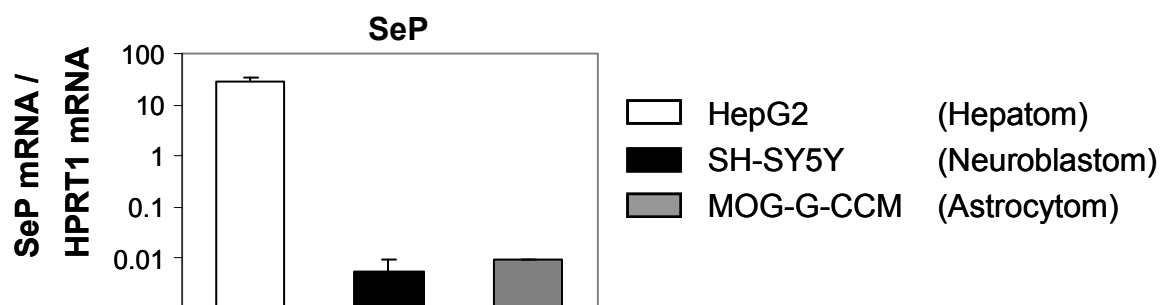


Abbildung 20: Vergleich der SeP-Transkriptmengen in humanen Hepatomzellen (HepG2), Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) und Astrocytomzellen (MOG-G-CCM). Nach 24-stündiger Inkubation in serumfreien Medium wurde die RNA isoliert und die Kopienzahl der SeP-mRNA mittels quantitativer Real-Time RT-PCR bestimmt. Kalibriergeraden wurden aus der Amplifikation serieller Verdünnungen der klonierten PCR-Fragmente von SeP und HPRT1 erstellt. Die Kopienzahl der SeP-mRNA wurde auf die der HPRT1 normiert. Die Werte entsprechen Mittelwerten $\pm$ SEM von drei RNA-Präparationen jeder Zelllinie.

Bezüglich der Expression der drei Faktoren zeigen SH-SY5Y-Zellen im Vergleich zu HepG2-Zellen eine deutlich geringere Expression von HNF-4 α . Die unterschiedliche mRNA-Expression von HNF-4 α in HepG2-Zellen und SH-SY5Y-Zellen resultierte auch in einem drastischen Unterschied der Proteinexpression von HNF-4 α in den beiden Zelllinien (s. Abbildung 22). FoxO1 α und PGC-1 α sind ebenfalls schwächer exprimiert, der Unterschied zur Expression in HepG2-Zellen ist im Vergleich zur HNF-4 α -Expression jedoch nur gering (s. Abbildung 21). Das Expressionsmuster in MOG-G-CCM-Zellen ähnelt demjenigen von SH-SY5Y-Zellen und ist hier nicht gezeigt.

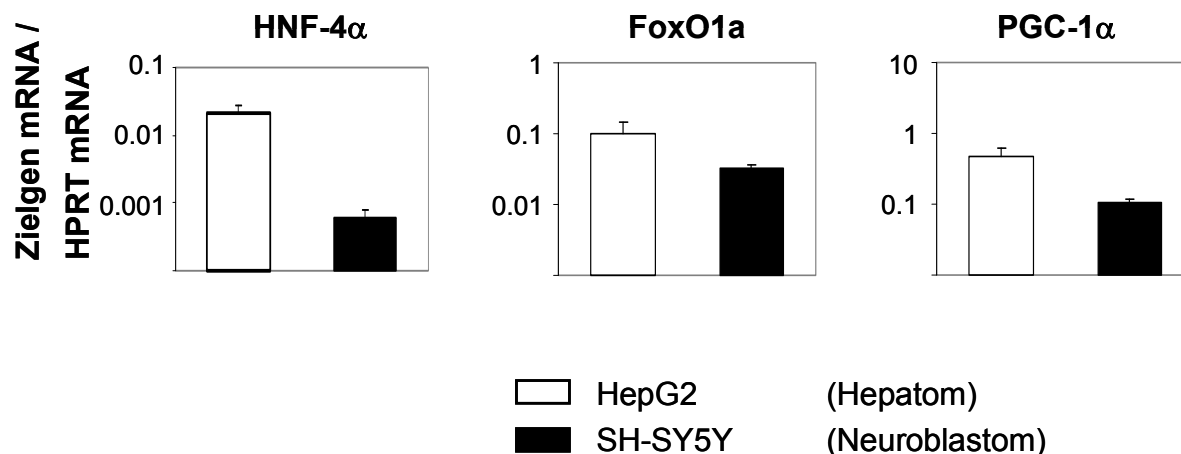


Abbildung 21: Quantifizierung der mRNA von HNF-4 α , FoxO1 α und PGC-1 α in HepG2- und SH-SY5Y-Zellen. Die Quantifizierungen erfolgten analog zu Abbildung 20.

Aus dem Vergleich der Transkriptmengen der drei Faktoren HNF-4 α , FoxO1 α und PGC-1 α in der Hepatomzelllinie und in der Neuroblastomzelllinie wurde gefolgert, dass die minimale Expression von SeP in Neuroblastoma-Zellen vor allem aus der geringen Expression von HNF-4 α resultieren könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der Effekt einer Überexpression von HNF-4 α in SH-SY5Y-Zellen auf die Promotoraktivität von SeP überprüft.

4.1.3.2 Transiente Überexpression von HNF-4 α in SH-SY5Y-Zellen

Zur Optimierung der transienten Transfektion von SH-SY5Y-Zellen wurden diese mit einem Reportergenkonstrukt unter Verwendung verschiedener Transfektionsreagenzien transfiziert. Die enzymatische Aktivität des Reportergenprodukts *Renilla luciferase* diente als Maß der relativen Transfektionseffizienz. Die höchste Transfektionseffizienz wurde unter Verwendung von ExGene 500 (Fermentas) erzielt, das im folgenden für alle transienten Transfektionen von SH-SY5Y-Zellen eingesetzt wurde. Die erfolgreiche Transfektion der Neuroblastomzellen mit ExGene 500 ist in Abbildung 22 gezeigt, wo die transiente Transfektion von pBud-HNF-4 α in einer Überexpression des HNF-4 α -Proteins in SH-SY5Y-Zellen resultierte. In transfizierten und nicht-transfizierten SH-SY5Y-Zellen wurden zwei unspezifische Banden detektiert; eine dem Molekulargewicht von HNF-4 α entsprechende Bande zeigte sich dagegen nur nach Transfektion von pBud-HNF-4 α . In den transfizierten Zellen ist HNF-4 α überwiegend im Kern lokalisiert. Als Positivkontrolle wurden Proteinextrakte aus

unbehandelten HepG2-Zellen untersucht, in denen eine sehr starke, überwiegend kernlokalisierte Expression des Transkriptionsfaktors beobachtet wurde (Abbildung 22).

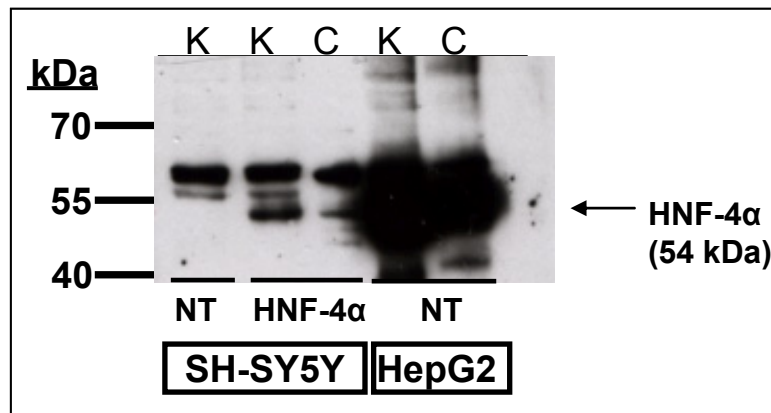


Abbildung 22: Nachweis der Expression von HNF-4 α in HepG2-Zellen und SH-SY5Y-Zellen. SH-SY5Y-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor pBud-HNF-4 α (HNF-4 α) in serumfreiem Medium transfiziert. Nach 24-stündiger Kultivierung in serumfreiem Medium wurden Kern- und cytosolische Fraktionen (K= Kern; C= Cytosol) von transfizierten und nichttransfizierten (NT) SH-SY5Y-Zellen sowie HepG2-Zellen gewonnen. Der Nachweis von HNF-4 α (54 kDa) in den Fraktionen erfolgte mittels Western Blot.

Die Funktionalität des durch Transfektion von pBud-HNF-4 α überexprimierten HNF-4 α -Proteins in den Neuroblastomzellen wurde mittels EMSA unter Verwendung der die HBE1 des humanen SeP-Promotors enthaltenden DNA-Sonde überprüft. Die Inkubation von Kernproteinen aus SH-SY5Y-Zellen mit der HBE1-Sonde führte zur Bildung zweier DNA-Proteinkomplexe mit verringerter elektrophoretischer Mobilität im Vergleich zur freien Sonde. Ein Komplex resultierte aus einer sequenzspezifischen Interaktion von Kernproteinen mit der DNA-Sonde, da die Ausbildung der entsprechenden Bande durch einen Überschuss nicht-markierter Kompetitor-DNA gleicher Sequenz vollständig unterbunden wurde. Diese spezifische Bande wurde bei Verwendung von Kernextrakten pBud-HNF-4 α -transfizierter SH-SY5Y-Zellen deutlich verstärkt. Die Verstärkung korrelierte mit der Menge des transfizierten Plasmids. Bei Präinkubation der Kernextrakte transfizierter Zellen mit einem gegen HNF-4 α gerichteten Antikörper wurde die Ausbildung des spezifischen DNA-Protein-Komplexes nahezu vollständig verhindert, woraus gefolgert werden kann, dass der Komplex durch Bindung von –überexprimiertem- HNF-4 α an das HBE1-Element entstand. Dies zeigt die Funktionalität des HNF-4 α -Expressionsplasmids und bestätigt die bereits mit HepG2-Kernextrakten gezeigte Bindung von HNF-4 α an die HNF-4 α -Bindestelle HBE1 des humanen SeP-Promotors (s. Abbildung 18).

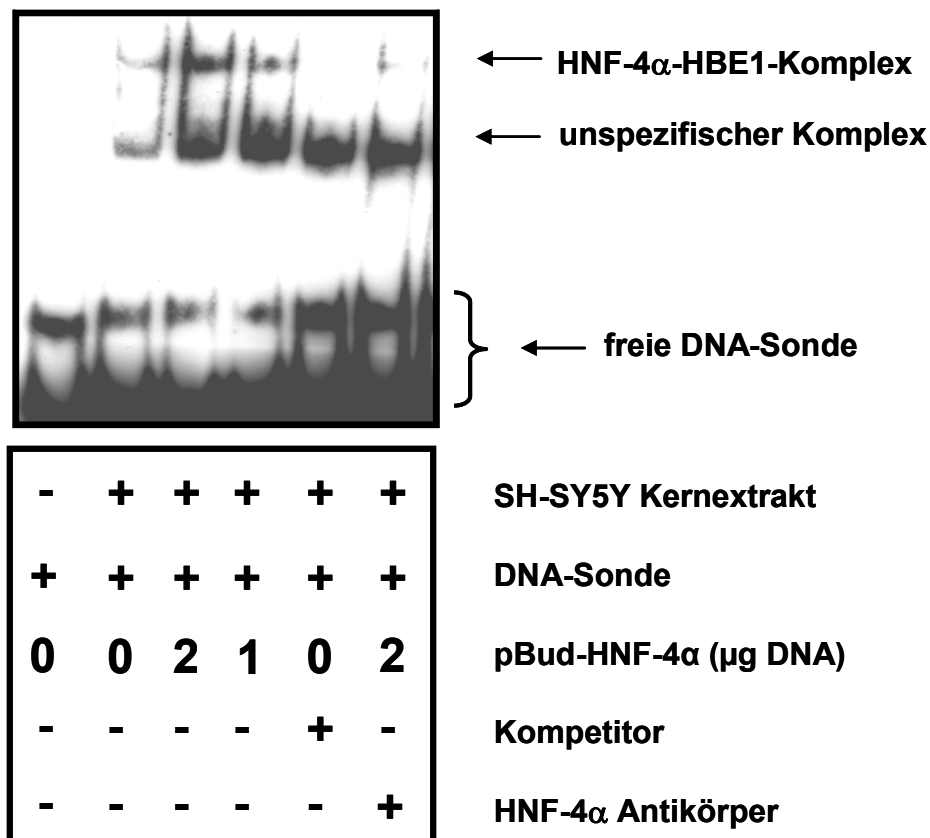


Abbildung 23: Bindung von ektopisch exprimiertem HNF-4 α an das HNF-4 α -Bindeelement (HBE1) des humanen SeP-Promotors in SH-SY5Y Neuroblastomzellen. Nukleäre Proteine wurden von transfizierten (1 oder 2 μ g pBud-HNF-4 α) oder nichttransfizierten SH-SY5Y-Zellen nach 24-stündiger Kultivierung in serumfreiem Medium isoliert. Die Durchführung des EMSA erfolgte analog zu Abbildung 18.

4.1.4 Regulation der SeP-Promotoraktivität in humanen Neuroblastomzellen

In Übereinstimmung mit der sehr niedrigen mRNA- und Proteinexpression von SeP war die basale Aktivität des SeP-Promotorkonstrukts SeP-luc in SH-SY5Y-Zellen um mehr als 80 % geringer als in HepG2-Zellen (s. Abbildung 24). Die Promotorkonstrukte mit inaktivierten Bindestellen für HNF-4 α und / oder FoxO1a besaßen wie auch in HepG2-Zellen signifikant niedrigere Aktivitäten als das Wildtyp-Promotorkonstrukt. Die Effektstärken durch Inaktivierung der Bindestellen der Transkriptionsfaktoren in SeP-luc unterschieden sich jedoch von denen in HepG2-Zellen. Während die Inaktivierung der Bindestelle für FoxO1a im Konstrukt SeP-Mut2-luc in einer Abnahme der Promotoraktivität um 80 % im Vergleich zum Wildtyppromotor resultierte, war der Effekt der Inaktivierung der HNF-4 α -Bindestelle im Konstrukt SeP-Mut3-luc schwächer als in HepG2-Zellen. In der Doppelmutante SeP-

Mut4-luc führte die Inaktivierung der HNF-4 α -Bindestelle zu keiner weiteren Verringerung der Promotoraktivität im Vergleich zum DBE2-mutierten Konstrukt SeP-Mut2-luc. Die geringere Relevanz des HBE1-Elements für die basale Aktivität des SeP-Promotorkonstrukts in SH-SY5Y-Zellen erklärt sich wahrscheinlich durch die im Vergleich zu HepG2-Zellen minimale Expression von HNF-4 α .

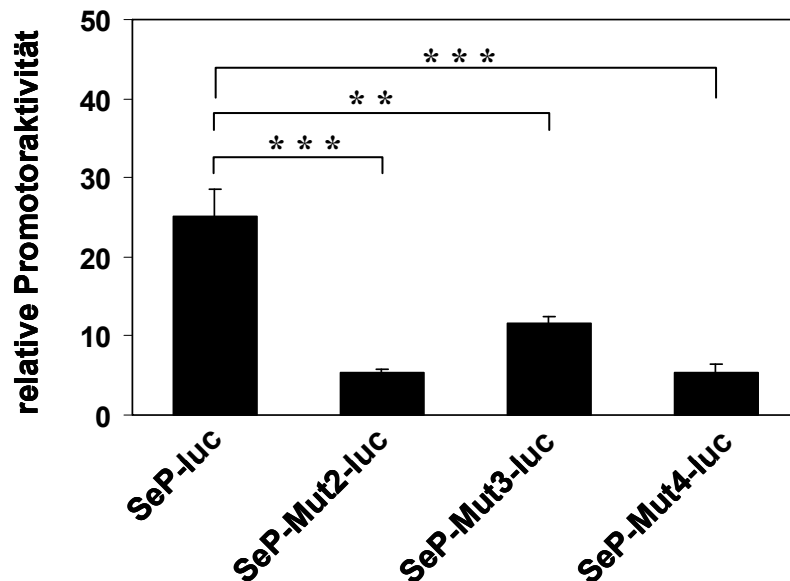


Abbildung 24: Basale Aktivitäten des SeP-Promotors (SeP-luc) und der SeP-Promotorkonstrukte mit inaktivierten Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren HNF-4 α und / oder FoxO1 α in humanen Neuroblastomzellen. SH-SY5Y-Zellen wurden mit den angegebenen Reportergenkonstrukten transfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Luziferaseaktivitäten in den Zelllysaten gemessen. Die Werte der SeP-Promotoraktivitäten wurden auf die Aktivität des promotorfreien Luziferasevektors pGL3 normiert. Die Werte stellen Mittelwerte $\pm$ SEM von drei unabhängigen Versuchen dar.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Aktivität des SeP-Promotors in SH-SY5Y-Zellen durch Überexpression der Faktoren HNF-4 α , FoxO1 α und PGC-1 α stimuliert werden kann. Während die Überexpression von HNF-4 α keinen Effekt auf den SeP-Promotor hatte, führten PGC-1 α und FoxO1 α zu einer zwei- bis vierfachen Stimulation von dessen Aktivität. In Kotransfektionsexperimenten wurde die Koaktivierung der Transkriptionsfaktoren HNF-4 α und FoxO1 α durch PGC-1 α untersucht. PGC-1 α bewirkte zusammen mit HNF-4 α eine sechsfache Erhöhung der SeP-Promotoraktivität, bzw. eine achtfache Erhöhung in Kombination mit FoxO1 α . Die Effekte der Kombinationen HNF-4 α /PGC-1 α und FoxO1 α /PGC-1 α potenzierten sich bei gleichzeitiger Überexpression aller drei Proteine. So resultierte aus der Kotransfektion der drei Expressionsplasmide eine synergistische Aktivierung des SeP-Promotors, dessen Aktivität um das 30-fache des Wertes

kontrolltransfizierter SH-SY5Y-Zellen gesteigert wurde. In Kontrollexperimenten bewirkte die Kotransfektion der drei Faktoren dagegen keine nennenswerte Steigerung der Hintergrundaktivität des promotorlosen Luziferasevektors pGL3 (s. Abbildung 25).

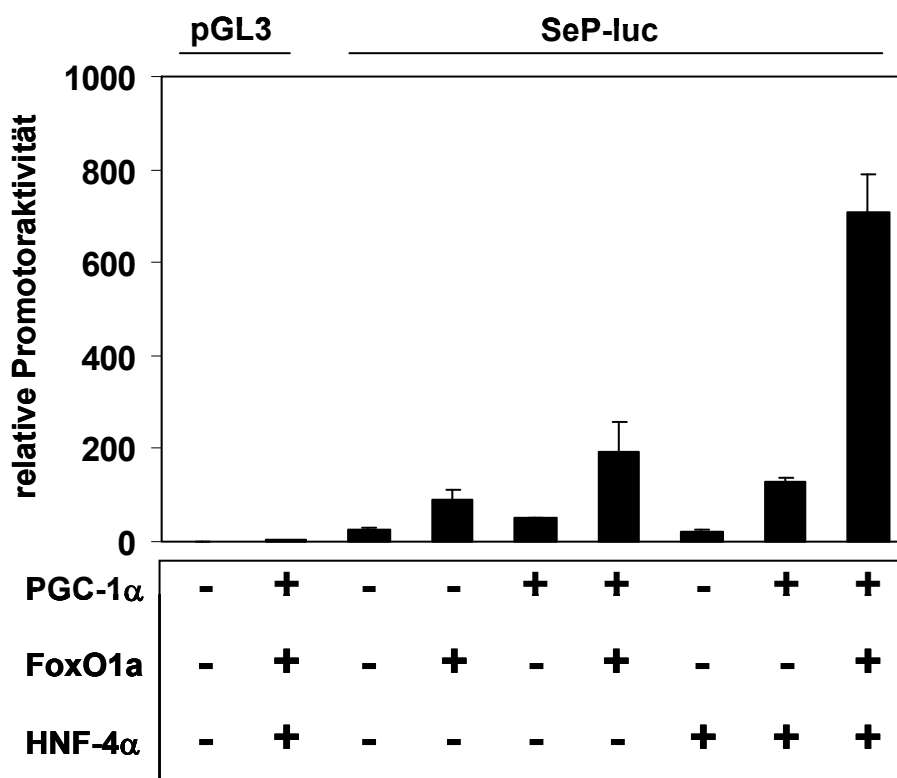


Abbildung 25: Synergistische Aktivierung des SeP-Promotors durch HNF-4α, FoxO1a und PGC-1α. SH-SY5Y-Zellen wurden mit dem Reportergenkonstrukt SeP-luc und Expressionsvektoren für PGC-1α und / oder FoxO1a und / oder HNF-4α kotransfiziert. Transfektionen mit den insertfreien Leervektoren pBud und / oder pCI-neo dienten als Negativkontrolle. 24h nach der Transfektion wurden die Luziferaseaktivitäten in den Zelllysaten gemessen. Die Werte der SeP-Promotoraktivität wurden auf die Aktivität des promotorfreien Luziferasevektors pGL3 normiert. Die Werte stellen Mittelwerte $\pm$ SEM von drei bis fünf unabhängigen Versuchen dar.

Der Synergismus von HNF-4α/FoxO1a/PGC-1α wurde durch Inaktivierung der HNF-4α- und / oder der FoxO1a-Bindestelle im SeP-Promotor jeweils nahezu vollständig aufgehoben (s. Abbildung 26). Dies zeigt, dass die maximale Aktivierung des SeP-Promotors durch einen Komplex der drei Faktoren erreicht wird. In der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y sind alle drei Faktoren limitierend und insbesondere durch die minimale Expression von HNF-4α erklären sich die sehr geringe Promotoraktivität und mRNA-Expression von SeP im Vergleich zur Hepatomzelllinie HepG2. Durch Koaktivierung von FoxO1a zusammen mit

PGC-1 α konnte jedoch auch bei Abwesenheit von HNF-4 α eine signifikante Steigerung der SeP-Promotoraktivität erreicht werden.

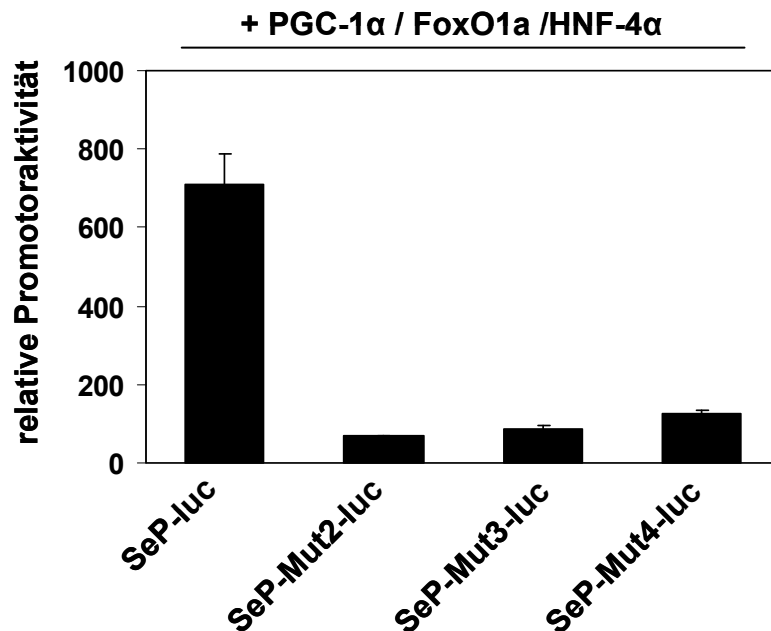


Abbildung 26: Synergistische Aktivierung des SeP-Promotors durch HNF-4 α , FoxO1a und PGC-1 α via HBE1 und DBE2. SH-SY5Y-Zellen wurden mit dem Wildtyp-SeP-Promotorkonstrukt SeP-luc bzw. den Mutanten SeP-Mut2/3/4-luc und Expressionsvektoren für PGC-1 α , FoxO1a und HNF-4 α kotransfiziert. Messung der Luziferaseaktivitäten und Auswertung erfolgten analog zu Abbildung 25. Die Werte stellen Mittelwerte $\pm$ SEM von drei unabhängigen Versuchen dar.

4.2 Hormonelle Regulation der hepatischen Selenoprotein P-Biosynthese

Aus den in Kapitel X4.1 dargestellten Ergebnissen wird die Bedeutung des Transkriptionsfaktors HNF-4 α für die starke basale mRNA-Expression von SeP in der Leber im Vergleich zum Gehirn ersichtlich. HNF-4 α ist konstitutiv aktiv, ohne einen externen Liganden zu benötigen. Eine Modulation der Expression und der Biosynthese von SeP in der Leber könnte daher vermutlich vor allem via FoxO1a und PGC-1 α erfolgen, wobei PGC-1 α als kritischer Regulator der Promotoraktivität von SeP fungiert, indem es die beiden Transkriptionsfaktoren HNF-4 α und FoxO1a koaktiviert. Um diese Hypothese zu testen, sollte der Einfluss des Koaktivators auf die mRNA-Expression und Sekretion von SeP in Hepatocyten untersucht werden. Um die Funktion von PGC-1 α hierin in einem physiologischen Kontext zu untersuchen, wurde die endogene Expression von PGC-1 α durch

hormonelle Stimuli anstatt durch eine ektopische Überexpression moduliert. Da PGC-1 α in der Leber cAMP-abhängig und durch Glucocorticoide induziert wird (Yoon et al., 2001), wurden hierfür Dexamethason und ein Aktivator des Enzyms Adenylatcyclase eingesetzt. Um die Relevanz der Ergebnisse hinsichtlich der SeP-Regulation besser auf die Situation *in vivo* übertragen zu können, wurden die folgenden Versuche nicht in aus Tumoren isolierten Zelllinien sondern in primären, kultivierten Hepatocyten durchgeführt. Die Hepatocyten wurden aus männlichen Wistar-Ratten isoliert und freundlicherweise von Herrn PD Dr. Reinehr (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie) zur Verfügung gestellt.

4.2.1 Regulation der Biosynthese von Selenoprotein P durch Modulation der endogenen PGC-1 α -Expression

Die Quantifizierung der mRNA-Expression von PGC-1 α und SeP in primären Hepatocyten der Ratte erfolgte mittels Real-Time RT-PCR. Zur Normierung variierender Mengen an cDNA in der PCR wurden die Transkriptmengen der Zielgene auf die Expression eines durch die Kultivierungsbedingungen unbeeinflussten Referenzgens normiert. Zur Auswahl eines unter den gewählten Versuchsbedingungen geeigneten Referenzgens wurde die Expression von β -Aktin (ACTB) und der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT1) verglichen, zweier typischer Haushaltsgene. Aus Abbildung 27 ist ersichtlich, dass die mRNA-Expression von HPRT1 in Hepatocyten nach Behandlung mit Dexamethason, Forskolin und Insulin weitestgehend konstant blieb. Lediglich die gleichzeitige Behandlung mit Dexamethason und Forskolin führte zu einer leichten Abnahme der Expression von HPRT1. Die Expression von β -Aktin wurde dagegen bei allen Behandlungen, teils erheblich, verringert. Für die Quantifizierung der Expressionsunterschiede der Zielgene wurde daher auf die mRNA-Expression von HPRT1 normiert. Eine konstante mRNA-Expression von HPRT1 nach Dexamethasonbehandlung wurde bereits für primäre Hepatocyten des Menschen und der Ratte beschrieben; wogegen die mRNA-Expression anderer häufig verwendeter Referenzgene wie z.B. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat) und TBP (*TATA box binding protein*) teils erheblich durch Dexamethason beeinflusst war (Nishimura et al., 2006).

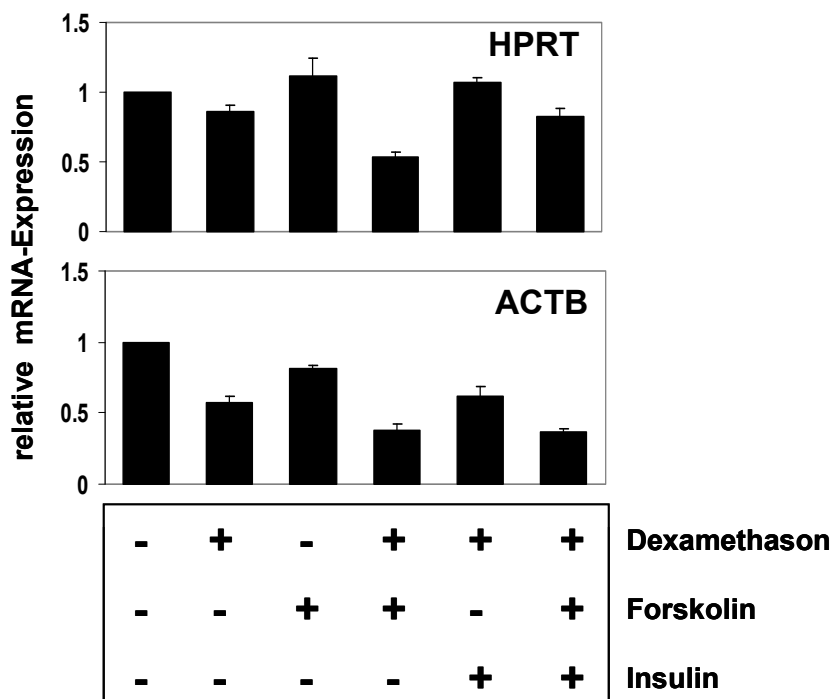


Abbildung 27: Beeinflussung der mRNA-Expression von HPRT1 und ACTB in primären Hepatocyten durch Dexamethason/cAMP und Insulin. Primäre Hepatocyten wurden ü. N. in serumfreiem Medium mit 200 nM Natriumselenit kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 24h in serumfreiem Medium mit 200 nM Natriumselenit und Kombinationen von Dexamethason (10 μ M), Forskolin (10 μ M) und Insulin (100 nM) behandelt. Die Analyse der relativen mRNA-Expressionen der Gene HPRT1 und ACTB erfolgte mittels Real-Time RT-PCR. Die Werte wurden auf die mRNA-Expression unbehandelter Zellen normiert und entsprechen Mittelwerten $\pm$ SEM aus drei bis sieben unabhängigen Versuchen.

PGC-1 α wird in der Leber durch Glucocorticoide und durch den cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktor CREB induziert (Yoon et al., 2001). Die Behandlung primärer Hepatocyten mit dem synthetischen Glucocorticoid Dexamethason führte zu einem zehnfachen Anstieg der mRNA-Expression von PGC-1 α (s. Abbildung 28). Die synergistische Wirkung von Dexamethason und einem cAMP-Analogen auf die PGC-1 α -Expression in Hepatocyten der Maus wurde beschrieben (Yoon et al., 2001), und konnte hier unter Verwendung des Adenylatcyclase-Aktivators Forskolin in Kombination mit Dexamethason nachvollzogen werden. Die Koinkubation mit Dexamethason und Forskolin resultierte in einer $\sim$ 30-fachen Stimulation der PGC-1 α mRNA-Expression. Insulin ist der wichtigste negative Regulator der hepatischen Expression und Aktivität von PGC-1 α (s. 1.3.4). Damit übereinstimmend bewirkte die Insulinbehandlung der Hepatocyten eine Inhibierung der durch Dexamethason und Forskolin stimulierten Expression von PGC-1 α (s. Abbildung 28).

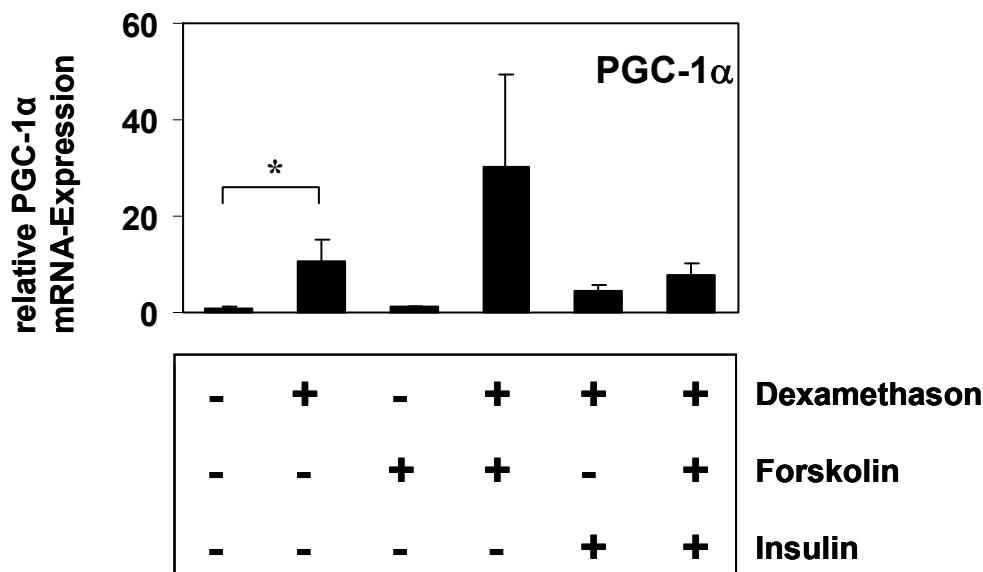


Abbildung 28: Regulation der PGC-1 α mRNA-Expression in primären Hepatocyten durch Dexamethason/cAMP und Insulin. Die Behandlung der Zellen erfolgte wie in Abbildung 27. Die Messung der relativen mRNA-Expression von PGC-1 α erfolgte mittels Real-Time RT-PCR unter Verwendung von HPRT1 als interner Kontrolle. Die Daten entsprechen Mittelwerten aus drei unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM.

Zur Kontrolle der Modulation der PGC-1 α -Aktivität durch die hormonelle Stimulation der Hepatocyten wurde die mRNA-Expression des Gens der G6Pase analysiert. PGC-1 α aktiviert die hepatische Gluconeogenese durch Induktion von Schlüsselgenen dieses Stoffwechselwegs (Yoon et al., 2001), und damit übereinstimmend führte die Inkubation der Hepatocyten mit Dexamethason und Forskolin zu einem drastischen Anstieg der G6Pase-Expression, der durch Insulinbehandlung unterdrückt wurde (s. Abbildung 29).

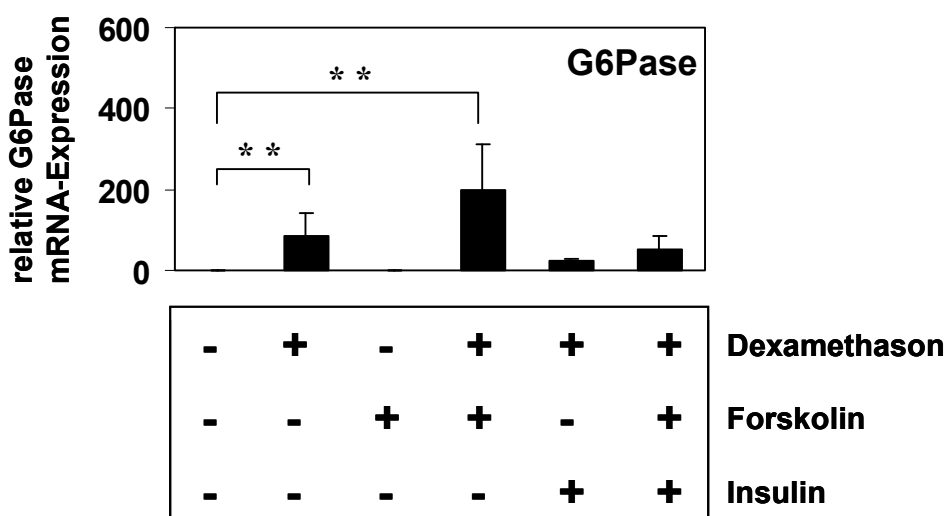


Abbildung 29: Regulation der G6Pase mRNA-Expression in primären Hepatocyten durch Dexamethason/cAMP und Insulin. Zellbehandlung und mRNA-Quantifizierung erfolgten analog zu Abbildung 28.

Die mRNA-Expression von SeP wurde durch die hormonelle Stimulation der Hepatocyten in Korrelation mit der PGC-1 α -Expression moduliert. So führte die Dexamethasonbehandlung zu einem sechsfachen Anstieg der SeP-Expression, die in Kombination mit Forskolin auf das zehnfache des Basalwerts anstieg. Andererseits bewirkte Insulin wiederum eine Reprimierung der durch Dexamethason sowie der durch Dexamethason und Forskolin stimulierten mRNA-Expression von SeP (s. Abbildung 30).

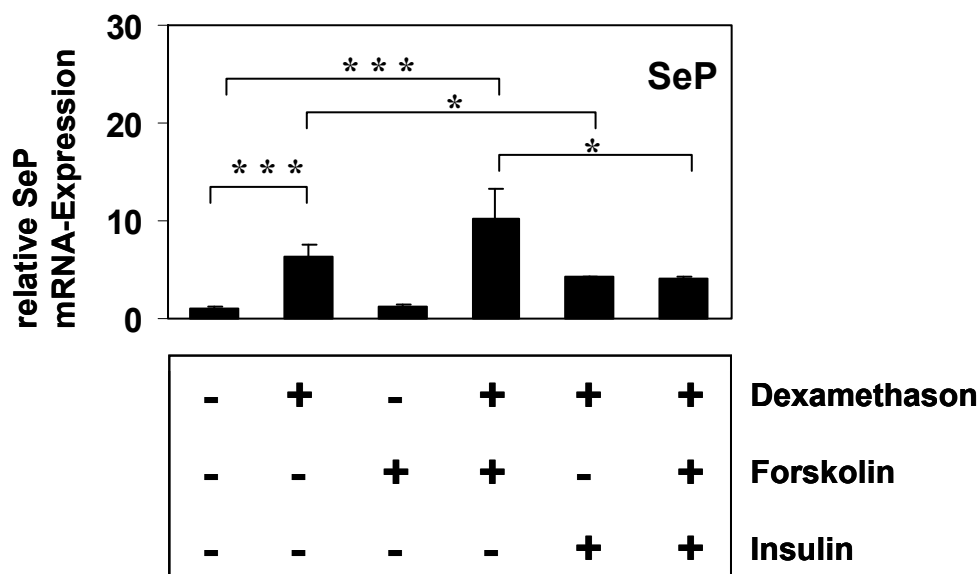


Abbildung 30: Regulation der SeP mRNA-Expression in primären Hepatocyten durch Dexamethason/cAMP und Insulin. Zellbehandlung und mRNA-Quantifizierung erfolgten analog zu Abbildung 28.

Die Modulation der mRNA-Expression von SeP durch Dexamethason und Insulin resultierte auch in einer Verstärkung bzw. Reprimierung der Biosynthese und Sekretion von SeP. SeP wurde von den primären Hepatocyten in den Kulturüberstand sezerniert. Mittels Western Blot wurden zwei Isoformen von SeP mit Molekulargewichten von etwa 57 und 45 kDa detektiert. Dieses Sekretionsmuster findet sich auch im Rattenplasma, wo die beiden Isoformen einer *full-length* und einer am zweiten Selenocysteincodon terminierten Form von SeP entsprechen (Himeno et al., 1996). Die Sekretion von SeP aus den Hepatocyten wurde durch Dexamethason signifikant verstärkt, und diese Stimulation wurde durch die gleichzeitige Behandlung mit Insulin vollständig wiederaufgehoben (s. Abbildung 31).

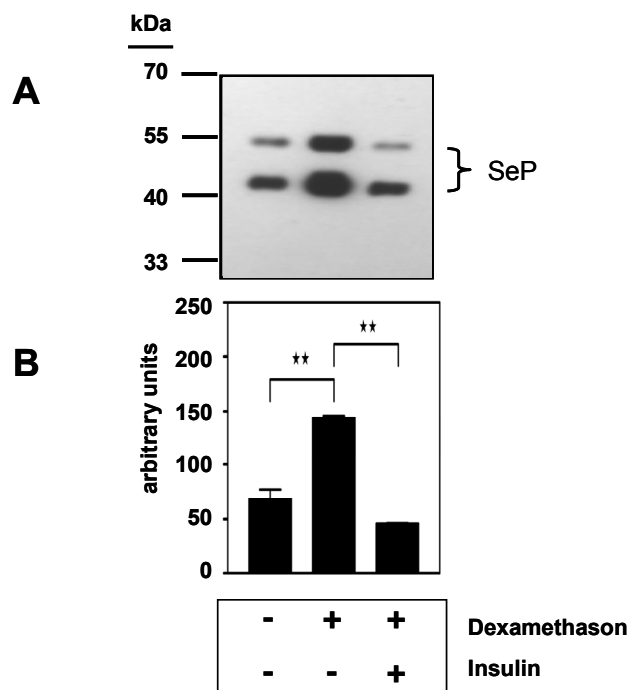


Abbildung 31: Regulation der SeP-Sekretion in primären Hepatocyten durch Dexamethason und Insulin. Hepatocyten wurden wie in Abbildung 27 behandelt. Nach 24-stündiger Inkubation wurde in den Kulturüberstand sezerniertes SeP mittels Western Blot detektiert (A). (B) Densitometrische Auswertung von 3 Versuchen. Die relativen Bandenintensitäten sind mit einheitsloser Skalierung dargestellt (a.u. *arbitrary units*).

4.3 Die Modulation der hepatischen Selenoprotein P-Expression durch die Glucosekonzentration

Selenoprotein P enthält 60 % des Selens im Plasma (Saito et al., 2002). Da in epidemiologischen Studien eine Korrelation des Glucosespiegels und der Selenkonzentration im Blut gezeigt wurde (s. Kapitel 1.1.3), sollte hier eine vermutete Abhängigkeit der SeP-Expression in Hepatocyten von der extrazellulären Glucosekonzentration überprüft werden. Dazu wurden primäre Hepatocyten aus der Ratte in Medium mit 11 mM oder 25 mM Glucose kultiviert, was näherungsweise Glucosekonzentrationen entspricht, die bei normoglykämischen bzw. diabetischen Ratten gemessen werden. Die Kultivierung der Hepatocyten in Medium mit 25 mM Glucose führte zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von SeP um 70 % ($p < 0.001$) gegenüber der Kultivierung in Medium mit 11 mM Glucose (s. Abbildung 32). Die verstärkte Transkription von SeP in hyperglykämisch kultivierten Hepatocyten wurde auch von einem Anstieg der Biosynthese und Sekretion von SeP begleitet (s. Abbildung 36B).

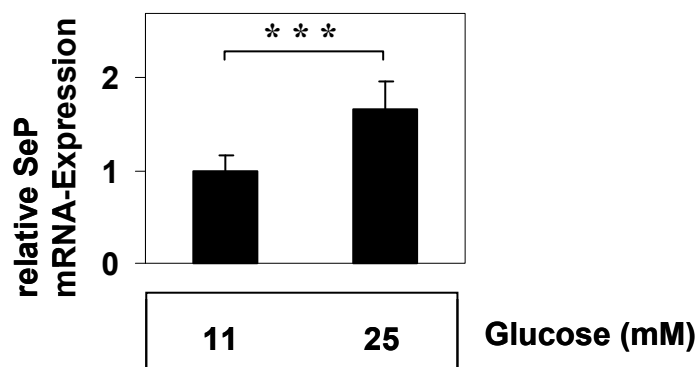


Abbildung 32: Stimulation der SeP mRNA-Expression in primären Hepatocyten durch Glucose. Hepatocyten wurden in serumfreiem Medium mit 11 oder 25 mM Glucose und 200 nM Natriumselenit für 18h kultiviert. Zur Minimierung des Einflusses einer vermehrten Laktatbildung wurde das Medium erneuert und nach anschließender 24-stündiger Kultivierung wurde die RNA isoliert. Die relative mRNA-Expression von SeP wurde durch Real-Time RT-PCR gemessen und auf die Expression des Referenzgens HPRT1 normiert. Die Daten entsprechen Mittelwerten $\pm$ SD aus sieben unabhängigen RNA-Präparationen.

Als Positivkontrolle des Effekts einer hyperglykämischen Kultivierung von Hepatocyten wurde die mRNA-Expression der G6Pase analysiert. Die erhöhte Glucosekonzentration von 25 mM führte zu einem signifikanten, sechsfachen Anstieg der G6Pase-mRNA-Expression im Vergleich zur normoglykämischen Zellkultivierung und bestätigte somit die von anderen Autoren beschriebene glucoseabhängige Regulation der G6Pase (Argaud et al., 1997).

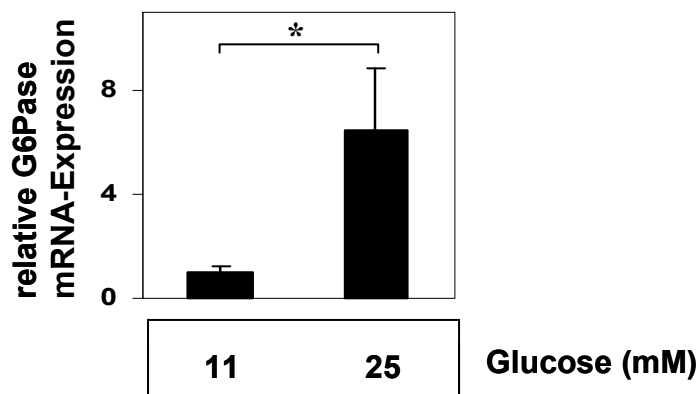


Abbildung 33: Stimulation der G6Pase mRNA-Expression in primären Hepatocyten durch Glucose. Durchführung und Auswertung erfolgten analog zu Abbildung 32. Die Daten entsprechen Mittelwerten $\pm$ SD aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Untersuchung der mRNA-Expression von PGC-1 α zeigte eine zweifache Stimulation durch die Kultivierung in Medium mit 25 mM Glucose gegenüber der niedrigeren Glucosekonzentration von 11 mM (s. Abbildung 34). Der Koaktivator wurde als ein bedeutender Regulator der hepatischen SeP-Expression identifiziert (s. Ergebnisse aus 4.1), so

dass die durch Glucose induzierte SeP-Expression zum Teil auf die Induktion von PGC-1 α zurückgeführt werden kann.

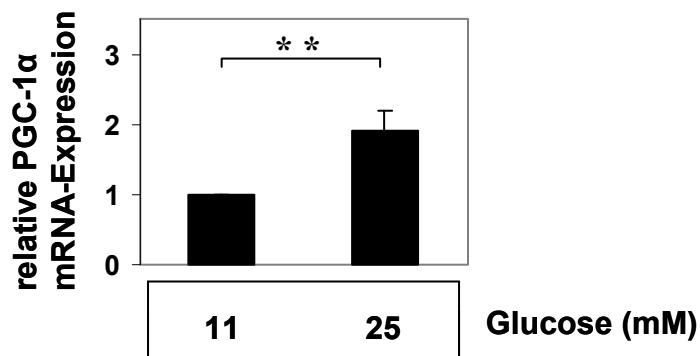


Abbildung 34: Stimulation der PGC-1 α mRNA-Expression in primären Hepatocyten durch Glucose. Die Durchführung erfolgte analog zu Abbildung 32. Die relative PGC-1 α mRNA-Expression wurde auf die Basalwerte (11 mM Glucose) der Einzelversuche normiert. Die Daten entsprechen Mittelwerten $\pm$ SD aus vier unabhängigen Versuchen.

4.4 Die Inhibierung der hepatischen SeP-Expression durch Metformin

Die Leber ist ein wichtiges Zielorgan des oralen Antidiabetikums Metformin. Die antihyperglykämische Wirkung von Metformin resultiert zu einem großen Teil aus der Hemmung der hepatischen Expression von Schlüsselenzymen der Gluconeogenese, einschließlich der G6Pase (Hundal et al., 2000). Da die hepatische Expression von Selenoprotein P sowohl durch Hormone des Kohlenhydratmetabolismus als auch durch die extrazelluläre Glucosekonzentration in ähnlicher Weise wie die G6Pase reguliert wird (Kapitel 4.2 und 4.3), wurde im Folgenden untersucht ob Metformin auch die Expression von SeP beeinflusst. Dazu wurden primäre Hepatocyten in normo- und hyperglykämischem Kulturmedium mit nicht-toxischen Konzentrationen von 0.5 – 2 mM Metformin inkubiert. Die Toxizität von Metformin wurde mittels MTT-Assay untersucht. Dabei wird ein wasserlösliches Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) von lebenden, metabolisch aktiven Zellen durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase zu einem violetten, unlöslichen Formazansalz reduziert. Im Vergleich unbehandelter mit kontrollbehandelten Zellen ist die Bildung des Formazansalzes ein Maß für die relative Zellviabilität. Selbst bei der höchsten eingesetzten Konzentration (2 mM) hatte Metformin keinen signifikanten Einfluss auf die Viabilität der Hepatocyten (s. Abbildung 35).

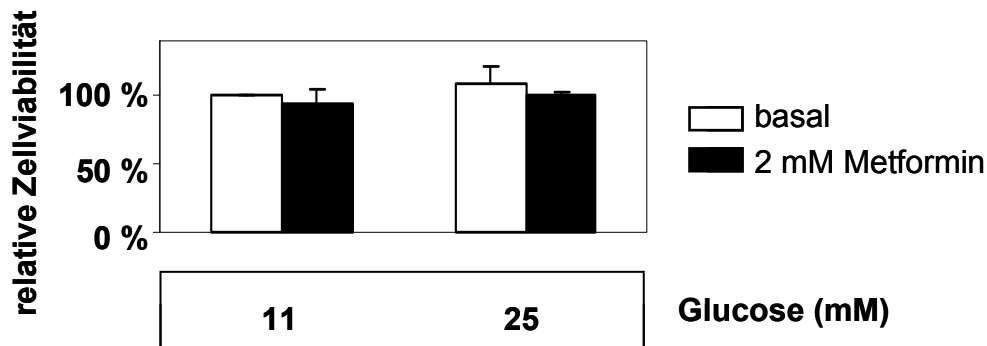


Abbildung 35: Zellviabilität von primären Hepatocyten nach 24-stündiger Behandlung mit 2 mM Metformin. Hepatocyten wurden in serumfreiem Medium mit 11 oder 25 mM Glucose und 200 nM Natriumselenit für 18h kultiviert. Dann folgte eine 24-stündige Kultivierung im gleichen Medium $\pm$ 2 mM Metformin. Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Test bestimmt und auf die Werte normoglykämisch (11 mM Glucose) kultivierter Zellen in Abwesenheit von Metformin normiert (n=3).

Metformin verursachte eine dosisabhängige Inhibierung der SeP mRNA-Expression sowohl unter normo- als auch unter hyperglykämischen Bedingungen. Bei Kultivierung der Zellen in Medium mit 11 mM Glucose verursachte nur die höchste eingesetzte Metforminkonzentration von 2 mM eine signifikante Abnahme der SeP mRNA-Expression um fast 50 %. Der inhibierende Effekt von Metformin auf die Expression von SeP war bei hyperglykämischer Kultivierung der Hepatocyten deutlich stärker ausgeprägt; 1 und 2 mM Metformin verursachten eine signifikante Inhibierung der SeP mRNA-Menge um 50 bzw. 70 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen (s. Abbildung 36A).

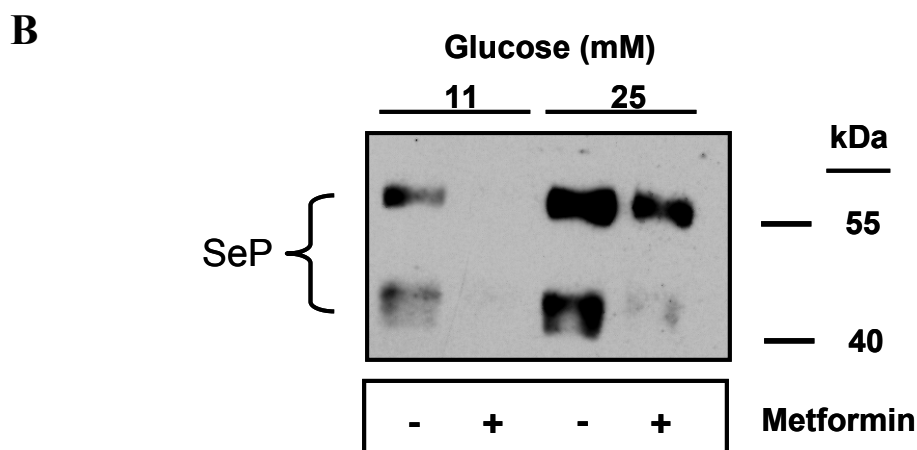
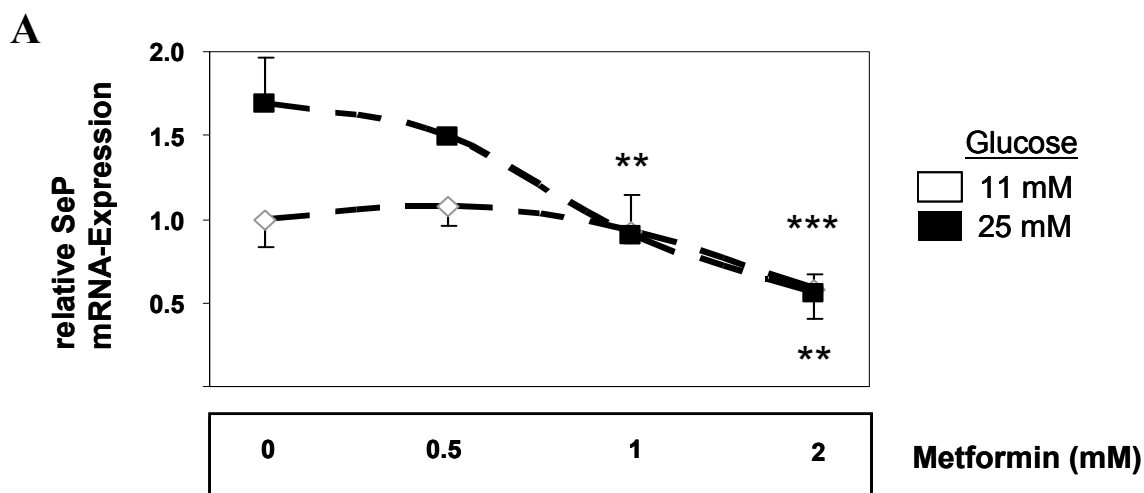


Abbildung 36: Reprimierung der SeP-Biosynthese in primären Hepatocyten durch Metformin. Hepatocyten wurden behandelt wie in Abbildung 35. (A) Die relative mRNA-Expression von SeP wurde nach 24-stündiger Inkubation $\pm$ Metformin in den angegebenen Konzentrationen mittels Real-Time RT-PCR bestimmt und auf die Expression des Referenzgens HPRT1 normiert. Die Daten entsprechen Mittelwerten $\pm$ SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. (B) Sezerniertes SeP wurde mittels Western Blot in den Kulturüberständen der Hepatocyten nach 24-stündiger Behandlung $\pm$ 2 mM Metformin detektiert.

Die Inhibierung der Transkription von SeP durch Metformin wurde auch von einer deutlich verminderten Sekretion von SeP aus den Hepatocyten begleitet (s. Abbildung 36B).

Als Positivkontrolle der Metforminbehandlung diente die Analyse der Expression der G6Pase, da dies als eines der Zielgene von Metformin bei der Inhibierung der hepatischen Gluconeogenese bekannt ist. Metformin verursachte eine Inhibierung der G6Pase mRNA-

Expression um 80 % und um 95 % bei Kultivierung der Hepatocyten unter 11 mM bzw. unter 25 mM Glucose (s. Abbildung 37).

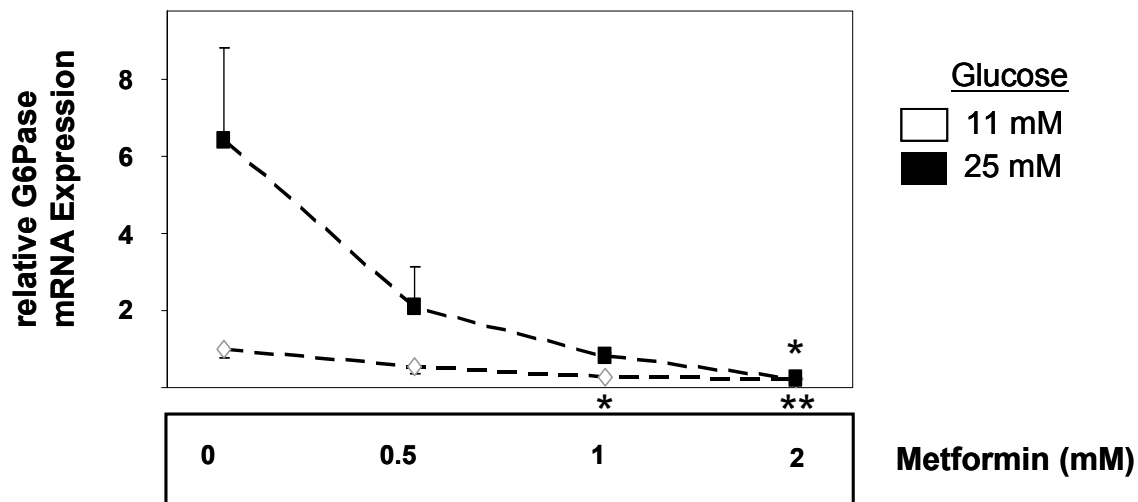


Abbildung 37: Inhibierung der G6Pase mRNA-Expression in primären Hepatocyten durch Metformin. Die Behandlung der Zellen und die Auswertung der Ergebnisse erfolgten analog zu Abbildung 36 (n=3).

Das synthetische Glucocorticoid Dexamethason stimuliert die Expression von SeP sowie der G6Pase in Hepatocyten (s. Abbildung 30 und Abbildung 29). Metformin wird auch zur Prävention einer durch Glucocorticoidbehandlung induzierten Hyperglykämie eingesetzt (Thomas et al., 1998). Daher wurde im Folgenden untersucht, ob Metformin die durch Dexamethason stimulierte Biosynthese von SeP inhibieren kann. Dexamethason bewirkte eine etwa siebenfache Stimulation der SeP mRNA-Expression in Hepatocyten bei normo- wie auch hyperglykämischer Kultivierung. Metformin bewirkte eine signifikante Inhibierung der durch Dexamethason stimulierten SeP-mRNA Expression um mehr als 60 %. Metformin hatte damit einen stärker inhibierenden Effekt als Insulin, das nur bei Kultivierung der Zellen mit 25 mM Glucose eine signifikante Abnahme der Dexamethason-induzierten SeP-Expression verursachte. Durch Koinkubation von Metformin und Insulin bei gleichzeitiger Anwesenheit von Dexamethason wurde die relative Menge der SeP-mRNA bis fast auf den Wert unbehandelter Zellen gesenkt (s. Abbildung 38).

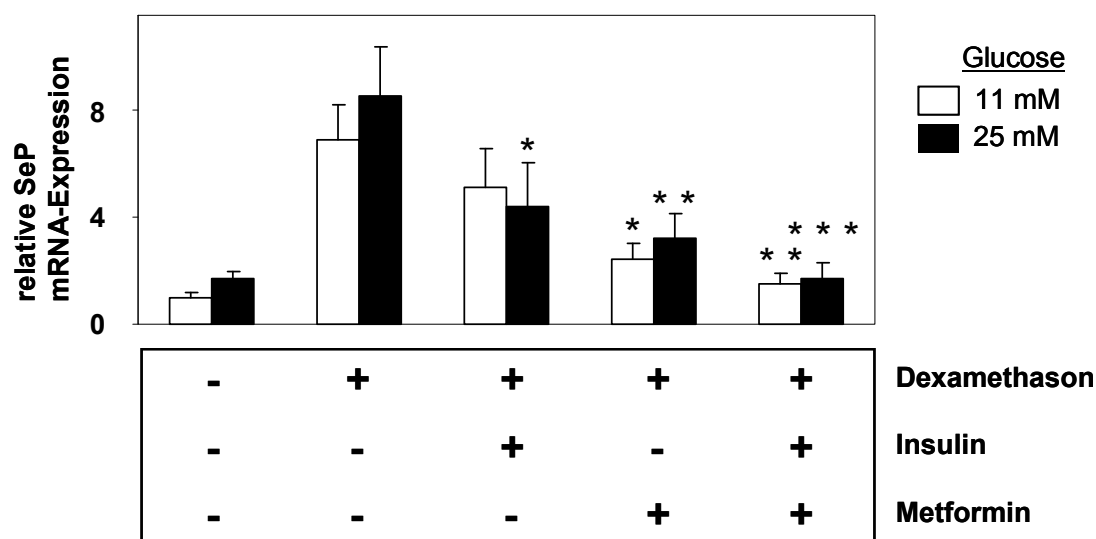


Abbildung 38: Metformin inhibiert die Dexamethason-stimulierte Transkription von SeP. Die Vorinkubation der Hepatocyten erfolgte wie in Abbildung 35. Dann wurden die Zellen für 24h in serumfreiem Medium mit 200 nM Natriumselenit und Kombinationen aus Dexamethason (10 μ M), Insulin (100 nM) und Metformin (2 mM) behandelt. Die relative mRNA-Expression wurde mittels Real-Time RT-PCR bestimmt und auf die Expression des Referenzgens HPRT1 normiert. Die Daten entsprechen Mittelwerten $\pm$ SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Der im Vergleich zu Insulin stärkere inhibitorische Effekt von Metformin auf die Expression von SeP zeigte sich in noch stärkerem Ausmaß bei der Untersuchung der Sekretion von SeP. Während Insulin bereits eine deutliche Verringerung der durch Dexamethason stimulierten Biosynthese und Sekretion von SeP bewirkte, war SeP im Überstand der mit Metformin behandelten Zellen nicht mehr detektierbar (s. Abbildung 39).

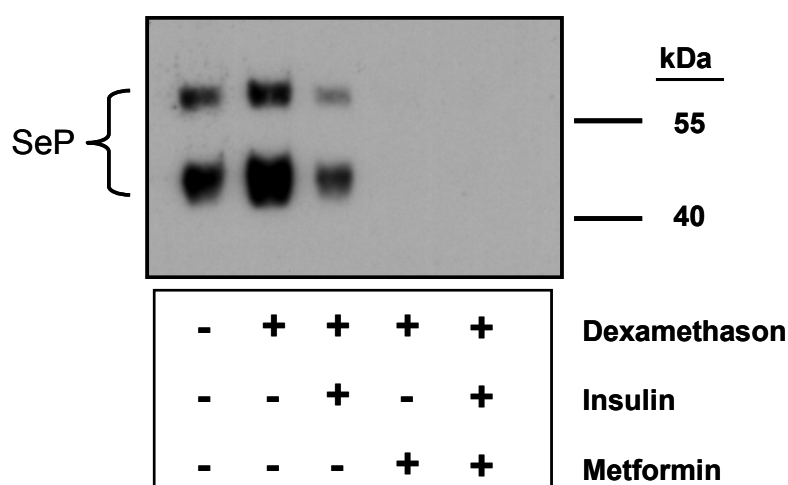


Abbildung 39: Metformin inhibiert die Dexamethason-stimulierte SeP-Sekretion. Hepatocyten wurden wie in Abbildung 38 in Medium mit 11 mM Glucose behandelt. Sezerniertes SeP wurde mittels Western Blot detektiert.

4.4.1 Einfluss von Metformin auf die mRNA-Expression von Faktoren der Selenoproteinbiosynthese

Hinsichtlich des vergleichsweise moderaten Effekts von Metformin auf die SeP-Transkription wurde ein zusätzlicher Effekt von Metformin auf die Biosynthese von SeP postuliert, durch den die drastische Inhibierung der Sekretion von SeP erklärt werden kann. Einen möglichen posttranskriptionellen Regulationspunkt stellt die Translation der SeP-mRNA dar. Die für die Inkorporation von Selenocystein benötigte Sec-tRNA^{Sec} wird durch mehrere, für die Biosynthese von Selenoproteinen spezifische Enzyme synthetisiert (s. Abbildung 2), deren Expression nach Metforminbehandlung der Hepatocyten untersucht wurde. Die relative mRNA-Expression der folgenden drei Enzyme wurde bestimmt: Selenophosphat-Synthetase 2 (SPS-2), Selenocystein-Synthase (SecS) und Phosphoseryl-tRNA^{Sec} Kinase (Pstk1). Da die mRNA-Transkripte von SecS und Pstk1 für die Ratte noch nicht charakterisiert sind, wurden aus den bekannten Sequenzen des murinen SecS (GenBank *Accession No.* BC166584) und des humanen Pstk1 (GenBank *Accession No.* XM_001053680) die für das Design der Primerpaare für die RT-PCR herangezogen. Die Kultivierung der Hepatocyten in hyperglykämischem Medium (25 mM Glucose) bewirkte einen leichten Anstieg der Expression der drei Gene um etwa 20 bis 50 % (Abbildung 40). Durch Metformin wurde die mRNA-Expression von SPS-2 und SecS inhibiert.

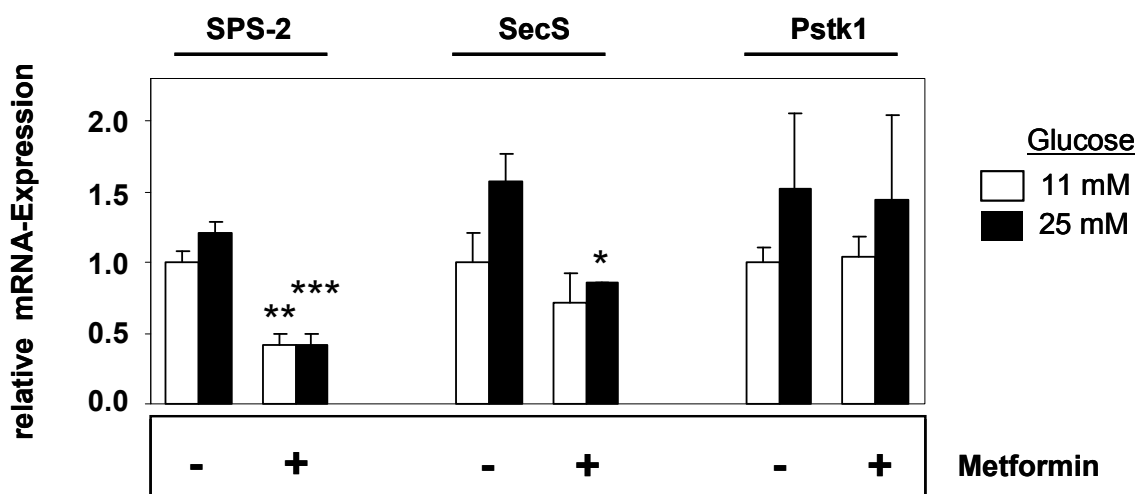


Abbildung 40: Inhibierung der mRNA-Expression von Enzymen der Selenoprotein-Biosynthese in primären Hepatocyten durch Metformin. Zellkultivierung und Bestimmung der relativen mRNA-Expression der untersuchten Gene erfolgten wie in Abbildung 36 (n=3).

SPS-2 wurde unter beiden Glucosekonzentrationen signifikant um jeweils mehr als 50 % des Werts unbehandelter Zellen inhibiert. Die Expression der SecS wurde bei Kultivierung in Medium mit 25 mM Glucose signifikant um etwa 50 % verringert, in geringerem,

nichtsignifikantem Ausmaß dagegen bei normoglykämischer Kultivierung. Die Expression der Pstkl wurde dagegen durch Metformin nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 40).

Die Selenophosphat-Synthetase 2 (SPS-2) katalysiert als Schlüsselenzym der Selenoproteinbiosynthese die Bildung des Selendonors Selenophosphat, das von der Selenocystein-Synthase (SecS) auf Phosphoseryl-tRNA^{Sec} übertragen wird. Die Regulation dieser beiden Enzyme wurde nach Koinkubation der Hepatocyten mit Dexamethason, Insulin und Metformin weiter untersucht. Die Behandlung der Zellen mit Dexamethason führte zu einem Anstieg der mRNA-Expression der SPS-2 um etwa 80 %. Diese Stimulation wurde durch die gleichzeitige Inkubation mit Metformin um 75 % unterdrückt auf eine geringere mRNA-Menge als in unbehandelten Zellen. Im Unterschied dazu hatte Insulin keinerlei Einfluss auf die Dexamethason-stimulierte Expression von SPS-2 alleine oder in Kombination mit Metformin (Abbildung 41).

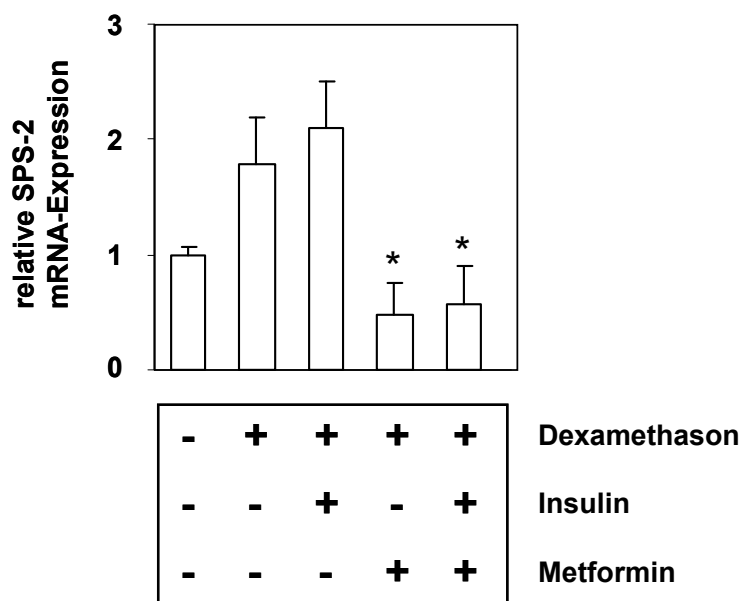


Abbildung 41: Modulation der SPS-2 mRNA-Expression durch Dexamethason und Metformin. Hepatocyten wurden in serumfreiem Medium mit 11 mM Glucose und 200 nM Natriumselenit für 18h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in gleichem Medium mit Kombinationen von Dexamethason (10 µM), Insulin (100 nM) und Metformin (2 mM) inkubiert. Die relative mRNA-Expression von SPS-2 wurde mittels Real-Time RT-PCR bestimmt und auf die Expression des Referenzgens HPRT1 normiert. Die Daten entsprechen Mittelwerten ± SD aus drei unabhängigen Versuchen.

Metforminbehandlung resultierte in einer signifikanten Abnahme der SecS mRNA-Expression um fast 50 %. Die Expression der SecS wurde anders als die der SPS-2 nicht durch Dexamethason stimuliert. Insulin hatte auch hier wiederum keinen Einfluss auf die Expression dieses Gens.

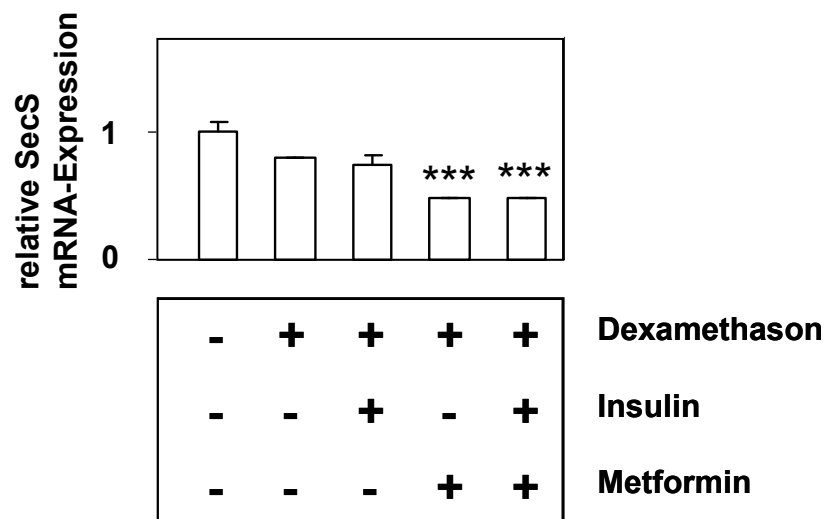


Abbildung 42: Inhibierung der mRNA-Expression von SecS durch Metformin. Die Zellkultivierung und die Analyse der relativen mRNA-Expression erfolgten wie in Abbildung 42 (n=3).

4.4.2 Beteiligung von intrazellulären Signalkaskaden an der Regulation der hepatischen SeP-Expression durch Metformin

Zu den Signalwegen für die eine Beeinflussung durch Metformin gezeigt worden ist, zählen der AMPK-Signalweg (Zhou et al., 2001), die Insulinsignalkaskade (Gunton et al., 2003), sowie der PKC- und der p38 MAP-Kinase-Signalweg.

Nun wurde untersucht, welche Signalkaskaden bei der durch Metformin induzierten Inhibierung der SeP-Expression involviert sind. In Hepatocyten wird die Inhibierung der Expression von Genen der Gluconeogenese und der Lipogenese durch Metformin durch die Kinase AMPK vermittelt (Zhou et al., 2001), die als intrazellulärer Energiesensor fungiert und den Kohlenhydrat- sowie den Lipidstoffwechsel moduliert (zusammengefasst in: Viollet et al., 2006). Durch Metforminbehandlung wird die AMPK LKB1-abhängig phosphoryliert und dadurch aktiviert. Inaktivierung der AMPK oder Deletion der *upstream* Kinase LKB1 resultiert dagegen in einer Aufhebung der hemmenden Wirkung von Metformin auf die hepatische Gluconeogenese (Zhou et al., 2001; Shaw et al., 2005). Hier sollte überprüft werden, ob die Kinase AMPK in der Hemmung der SeP-Expression durch Metformin involviert ist.

4.4.2.1 Aktivierung der AMPK in Hepatocyten durch Metformin

Die Phosphorylierung der AMPK α -Untereinheit in Position Thr172 ist ein Maß der AMPK-Aktivität und wurde in den Hepatocyten mittels eines phosphospezifischen Antikörpers detektiert. Hinsichtlich des Effekts der Glucosekonzentration im Kulturmedium auf die SeP-

Expression wurden die Hepatocyten vor der Behandlung mit Metformin in Medium mit 11 mM oder 25 mM Glucose vorinkubiert. Eine niedrige basale AMPK-Phosphorylierung zeigte sich bei hyperglykämischer Zellkultivierung (25 mM Glucose), während bei normoglykämischer Kultivierung (11 mM Glucose) eine stärkere Phosphorylierung beobachtet wurde (Abbildung 43). Dieser Effekt erklärt sich durch den relativen Energiemangel bei Kultivierung der Zellen mit der niedrigeren Glucosekonzentration (11 mM) und bestätigt Ergebnisse anderer Autoren (Zang et al., 2004).

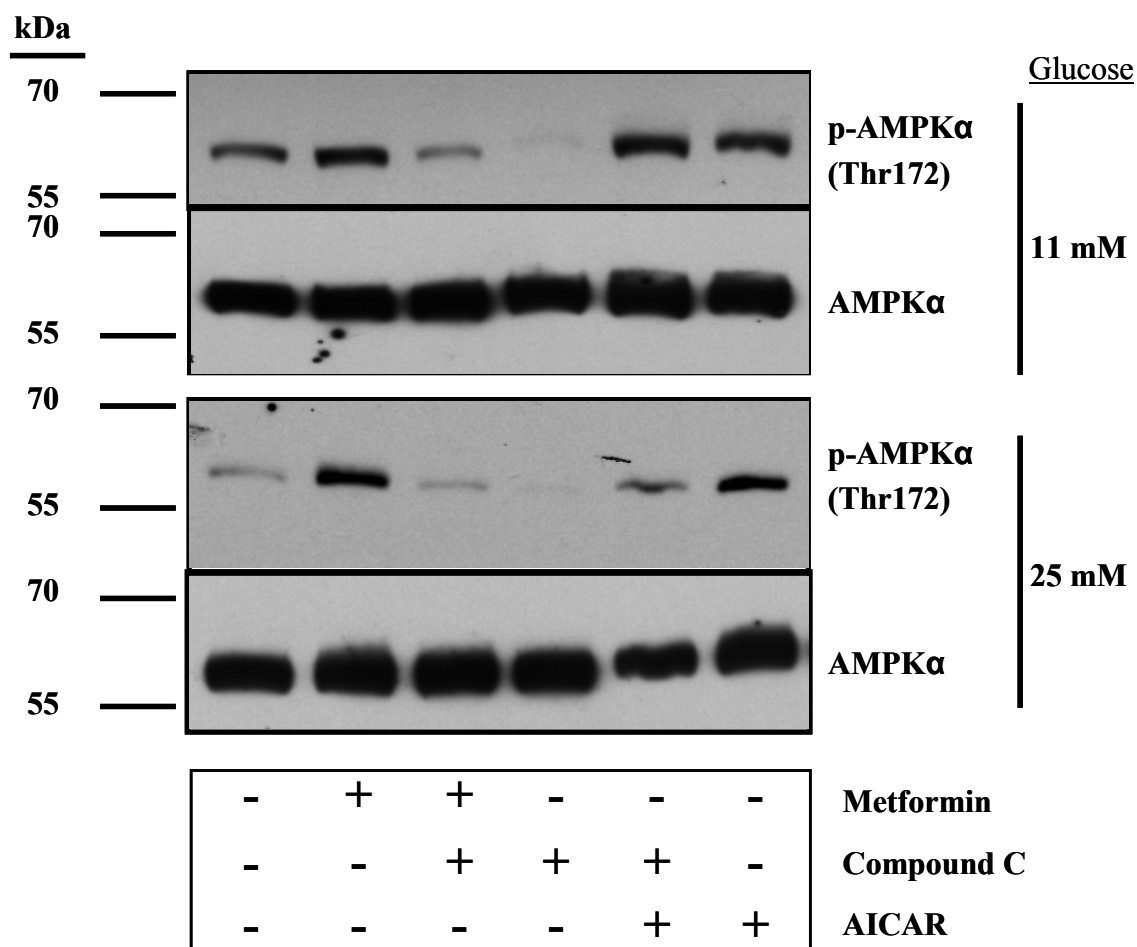


Abbildung 43: Modulation der AMPK-Phosphorylierung durch Glucose, Metformin, Compound C und AICAR. Hepatocyten wurden für 18h in serumfreiem Medium mit 11 oder 25 mM Glucose und 200 nM Natriumselenit kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h in dem gleichen Medium mit Metformin (2 mM), Compound C (10 µM) oder AICAR (125 µM) inkubiert. Bei Koinkubationen wurden die Zellen für 30 min mit Compound C vorbehandelt, bevor Metformin oder AICAR für 1 h zugegeben wurden. Phosphoryliertes (Thr172) und totales AMPKα wurden mittels spezifischer Antikörper in den Zelllysaten detektiert.

Eine einstündige Inkubation der Hepatocyten mit 2 mM Metformin resultierte in einer verstärkten AMPK α -Phosphorylierung unter beiden Glucosekonzentrationen. Aufgrund der niedrigeren basalen AMPK α -Phosphorylierung bei hyperglykämisch kultivierten Zellen war der Effekt von Metformin dort deutlich stärker als bei normoglykämisch kultivierten Zellen. Compound C ist ein pharmakologischer Inhibitor der AMPK (Zhou et al., 2001) und verringerte die basale wie auch die durch Metformin induzierte AMPK α -Phosphorylierung. Aufgrund des unterschiedlichen basalen Phosphorylierungsstatus der AMPK α war der Einfluss von Compound C auf die AMPK α -Phosphorylierung bei hyperglykämischer Kultivierung wiederum größer als unter normoglykämischen Bedingungen. AICAR wird intrazellulär phosphoryliert und bindet dann als AMP-Analogon an AMPK, worauf diese aktiviert wird (Zhou et al., 2001). AICAR wurde hier als Positivkontrolle der AMPK-Aktivierung eingesetzt und bewirkte eine dem Metformin vergleichbare Erhöhung der AMPK α -Phosphorylierung, die wiederum in hyperglykämischen Medium bei Koinkubation mit Compound C vermindert wurde. Die Modulation der hepatischen AMPK α -Phosphorylierung durch die AMPK-Aktivatoren Metformin und AICAR, den AMPK-Inhibitor Compound C sowie die Glucosekonzentration erfolgte demnach in Übereinstimmung mit Literaturdaten (Zhou et al., 2001; Viollet et al., 2006; Zang et al., 2004).

4.4.2.2 Modulation der SeP mRNA-Expression durch die AMPK

Im Folgenden wurde untersucht, ob die mRNA-Expression von SeP durch Modulation der AMPK-Aktivität beeinflusst wird, und ob die durch Metformin induzierte Hemmung der SeP mRNA-Expression durch AMPK vermittelt wird. Dazu wurden primäre Hepatocyten mit dem AMPK-Inhibitor Compound C über einen Zeitraum von 3 bis 24 h inkubiert. Um eine erhöhte basale Aktivität der AMPK zu gewährleisten, wurden für diese Versuche die Hepatocyten in Medium mit 11 mM Glucose kultiviert. Die Behandlung mit dem Inhibitor hatte nach 24-stündiger Inkubationsdauer keine Veränderung der Zellviabilität im Vergleich zu unbehandelten Hepatocyten zur Folge (s. Abbildung 44). Nach 3- und 6-stündiger Inkubationsdauer verursachte Compound C keine Änderung der SeP-mRNA-Menge im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Nach 24-stündiger Inkubation der Hepatocyten mit dem AMPK-Inhibitor war die SeP mRNA-Expression dagegen moderat aber signifikant gegenüber unbehandelten Zellen erhöht (+ 55 %, $p = 0.027$).

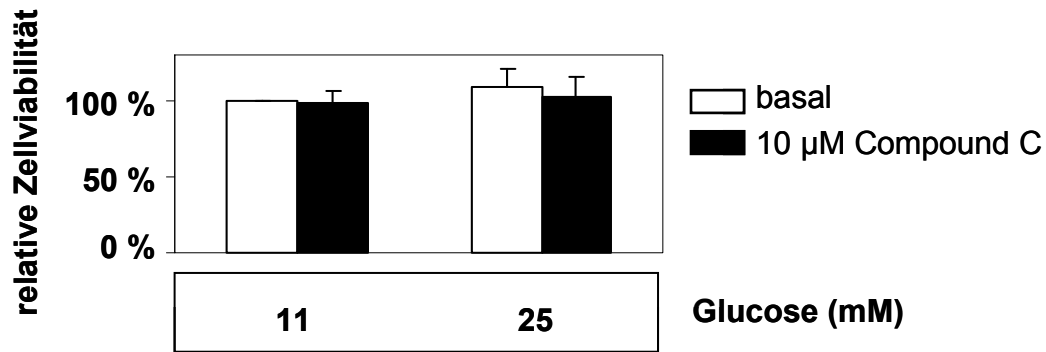


Abbildung 44: Zellviabilität von primären Hepatocyten nach 24-stündiger Behandlung mit 10 µM Compound C. Die Kultivierung und die Bestimmung der relativen Viabilität der Hepatocyten erfolgten analog zu Abbildung 35.

Eine Hemmung der AMPK scheint demnach einen stimulierenden Einfluss auf die mRNA-Expression von SeP zu haben. Die bei hyperglykämischer Kultivierung der Hepatocyten (25 mM Glucose) erhöhte SeP mRNA-Expression und Sekretion (Abbildung 36) vermag deshalb zum Teil aus der niedrigeren AMPK-Aktivierung bei erhöhter Glucoseverfügbarkeit im Vergleich zur Kultivierung unter 11 mM Glucose zu resultieren (Abbildung 43).

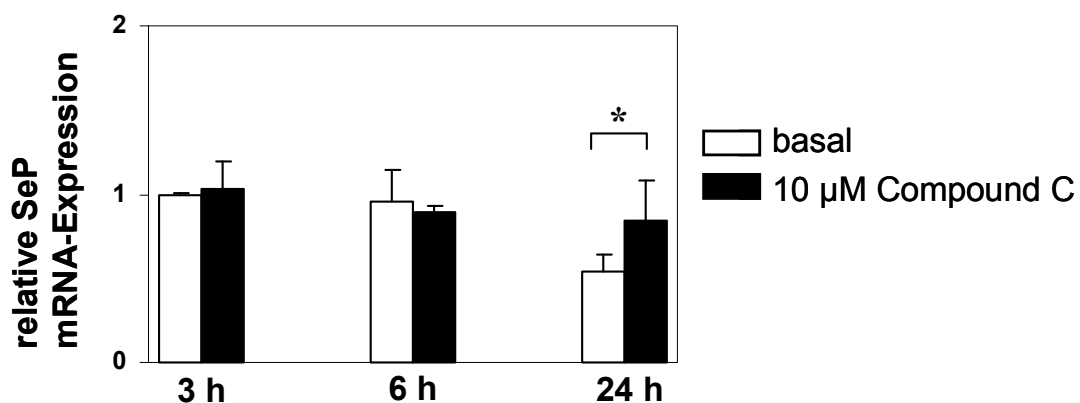


Abbildung 45: Modulation der SeP mRNA-Expression in primären Hepatocyten durch AMPK-Inhibierung. Hepatocyten wurden in serumfreiem Medium mit 200 nM Natriumselenit für 18 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in gleichem Medium $\pm$ 10 µM Compound C für 3, 6, oder 24 h inkubiert. Nach den jeweiligen Zeitpunkten wurde die relative mRNA-Expression von SeP mittels Real-Time RT-PCR bestimmt und auf die Expression des Referenzgens HPRT1 normiert. Die Daten wurden auf die relative SeP mRNA-Expression unbehandelter Hepatocyten nach 3-stündiger Kultivierung normiert ($n \geq 3$ (24h); $n=2$ (3 und 6h)).

Der AMPK-Aktivator AICAR verursachte in der Konzentration von 125 µM, in der er bei einstündiger Behandlung der Hepatocyten als Positivkontrolle zur Verstärkung der AMPK α -Phosphorylierung eingesetzt wurde, nach 24-stündiger Inkubation der Hepatocyten eine Verringerung von deren Viabilität um etwa 25 % (s. Abbildung 46). Ferner wurden eine ATP-Depletion in Hepatocyten und AMPK-unabhängige Effekte durch AICAR beschrieben, das

potentiell alle AMP-regulierten Enzyme in ihrer Aktivität beeinflussen kann (diskutiert in: Viollet et al., 2006). Wegen dieser Limitierungen wurde der Effekt einer AICAR-induzierten AMPK-Aktivierung auf die mRNA-Expression von SeP nicht untersucht.

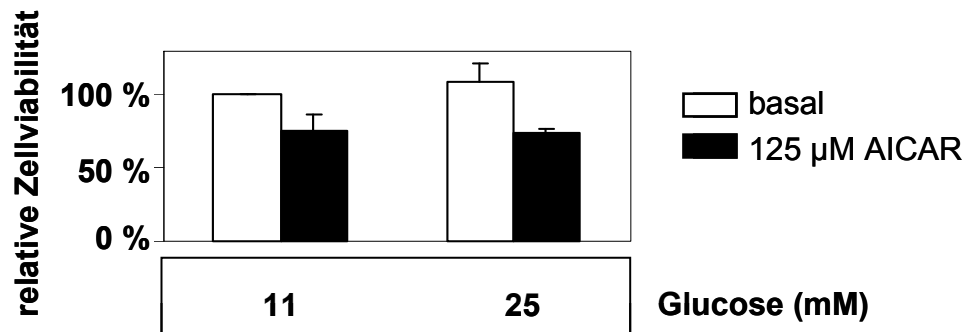


Abbildung 46: Zellviabilität von primären Hepatocyten nach 24-stündiger Behandlung mit 125 µM AICAR. Die Kultivierung und die Bestimmung der relativen Viabilität der Hepatocyten erfolgten analog zu Abbildung 35.

4.4.2.3 Die Metformin-induzierte Inhibierung der SeP mRNA-Expression ist unabhängig von der AMPK-Aktivierung

Um zu überprüfen, ob die durch Metformin induzierte Abnahme der mRNA-Expression von SeP durch die AMPK vermittelt wird, wurde der Effekt von Metformin auf die SeP mRNA-Menge bei gleichzeitiger Hemmung der AMPK durch Koinkubation mit Compound C analysiert. Während Compound C nach 24-stündiger Inkubation der Hepatocyten bei normo- wie auch hyperglykämischer Zellkultivierung einen leichten Anstieg der SeP mRNA-Expression verursachte, wurde die Metformin-induzierte Hemmung der SeP mRNA-Expression bei Koinkubation mit Compound C nicht beeinflusst (s. Abbildung 47). Dies spricht dafür, dass der Effekt von Metformin auf die transkriptionelle Regulation von SeP -zumindest partiell- AMPK-unabhängig erfolgt.

AMPK-unabhängige Effekte von Metformin wurden in mehreren Organen und Zelltypen beschrieben. Dabei beeinflusste Metformin die Insulinsignalkaskade in der Leber (Gunton et al., 2003) und Signalwege, die durch die Kinasen PKC im Herz, p38 MAP-Kinase im Herz und in der Leber (Saeedi et al., 2008; Cleasby et al., 2004) sowie die p70S6K in einer Brustkrebszelllinie kontrolliert werden (Vazquez-Martin et al., 2009). Im Folgenden wurden Inhibitoren der Kinasen p38, PI3K und PKC eingesetzt, um die Beteiligung dieser Kinasen an der Metformin-induzierten Hemmung der SeP mRNA-Expression zu überprüfen. Die Inhibierung der PI3K hatte dabei keinen Einfluss auf die Metforminwirkung, wogegen Inhibitoren der p38 MAPK und der PKC (SB 202190 bzw. Calphostin C), die Inhibierung der mRNA-Expression von SeP durch Metformin vollständig aufhoben.

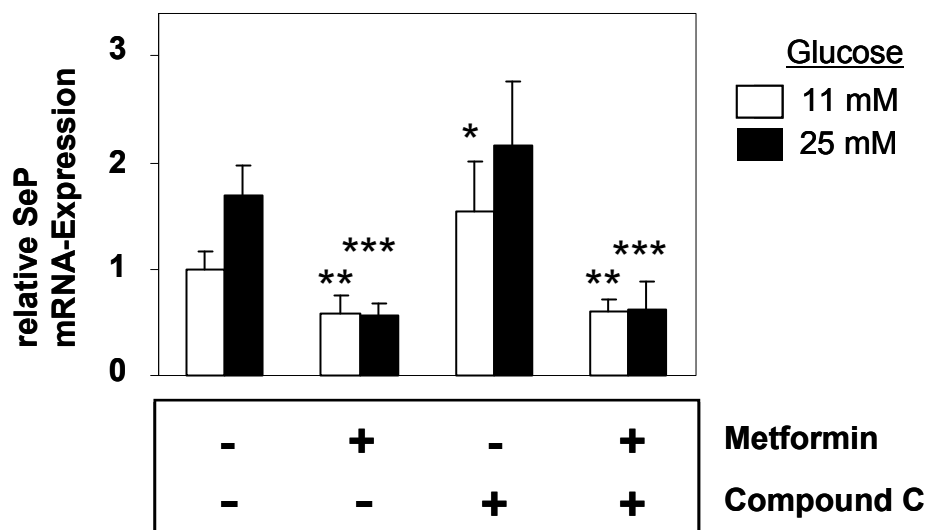


Abbildung 47: AMPK-unabhängige Inhibition der SeP mRNA-Expression in Hepatocyten durch Metformin. Hepatocyten wurden für 18h in serumfreiem Medium mit 11 oder 25 mM Glucose und 200 nM Natriumselenit kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h in dem gleichen Medium mit Metformin (2 mM) oder Compound C (10 μ M) inkubiert. Bei Koinkubationen wurden die Zellen vor der Zugabe von Metformin für 30 min mit Compound C vorbehandelt. Die relative SeP mRNA-Expression wurde mittels Real-Time RT-PCR bestimmt und auf die Expression des Referenzgens HPRT1 normiert. Die Daten wurden auf die relative SeP mRNA-Expression unbehandelter, in Medium mit 11 mM Glucose kultivierter Hepatocyten normiert und entsprechen Mittelwerten $\pm$ SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

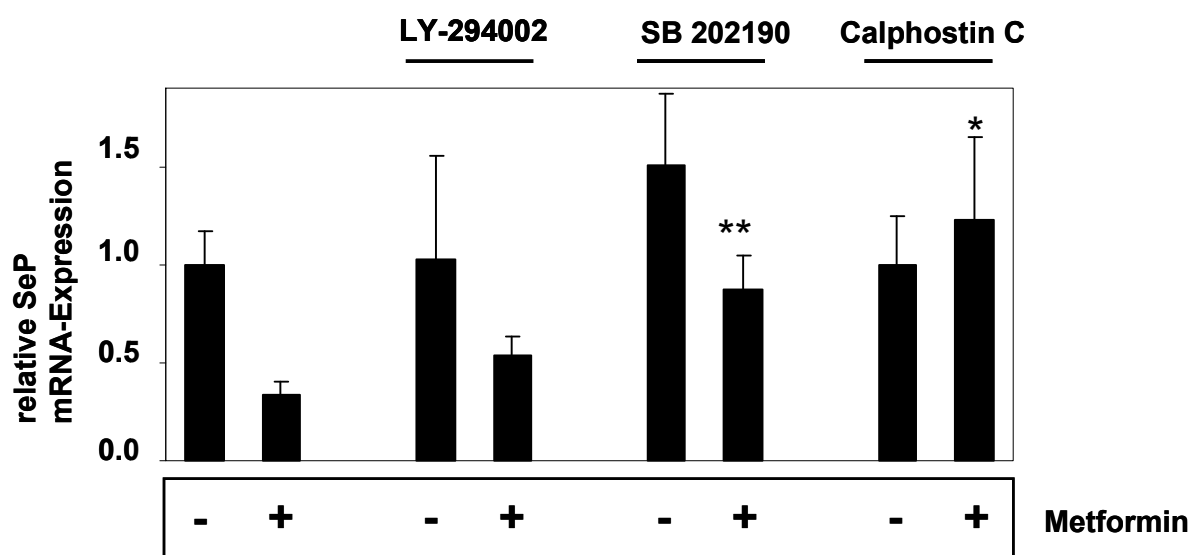


Abbildung 48: Modulation der Metformin-induzierten Inhibition der SeP mRNA-Expression durch Inhibitoren der PI3K, der p38 MAPK und der PKC. Hepatocyten wurden in serumfreiem Medium mit 200 nM Natriumselenit und 25 mM Glucose für 18 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in gleichem Medium $\pm$ Metformin (2 mM) inkubiert. Bei Koinkubationen wurden Metformin nach 1-stündiger Vorinkubation der Inhibitoren LY-294002 (50 μ M), SB 202190 (10 μ M) oder Calphostin C (500 nM) zugegeben. Nach 24 h wurde die relative mRNA-Expression von SeP mittels Real-Time RT-PCR bestimmt und auf die Expression des Referenzgens HPRT1 normiert. Die Daten wurden auf die relative SeP mRNA-Expression unbehandelter Hepatocyten normiert ($n \geq 3$).

5 Diskussion

5.1 Die Regulation der Selenoprotein P-Expression durch den HNF-4 α / FoxO1a / PGC1 α -Transkriptionskomplex

Trotz der Bedeutung von Selenoprotein P (SeP) als physiologischer Selentransporter ist über die molekularen Regulationsmechanismen seiner Expression bisher nur wenig bekannt. Die Ursachen der großen gewebespezifischen Unterschiede in der Expression von SeP sind ungeklärt, während die Modulation der Transkription und Translation von SeP unter verschiedenen physiologischen wie pathophysiologischen Bedingungen bisher ansatzweise, vor allem in Bezug auf die Akutphase-Antwort während einer Entzündung, untersucht worden ist (Burk et al., 2005; Renko et al., 2009). Einen ersten Beitrag zum Verständnis der transkriptionellen Regulation von SeP leisteten Walter et al. (2008) mit der kürzlich beschriebenen Stimulation der Promotoraktivität und der Transkription von SeP in Leberzellen durch den Transkriptionsfaktor FoxO1a.

In dieser Arbeit wurden mit dem Transkriptionsfaktor HNF-4 α und dem Koaktivator PGC-1 α zwei weitere Faktoren identifiziert, die zusammen mit dem Transkriptionsfaktor FoxO1a die Biosynthese von Selenoprotein P regulieren. Durch Untersuchungen am humanen SeP-Promotor wurde eine Bindestelle für HNF-4 α identifiziert und charakterisiert, die von entscheidender Bedeutung für die basale wie auch die hormonell regulierte SeP-Promotoraktivität in der Leber ist. So führte die Inaktivierung der HNF-4 α -Bindestelle mittels *in-vitro* Mutagenese zu einer Abnahme der Promotoraktivität von SeP um mehr als 90%, der auch durch Überexpression von FoxO1a und PGC-1 α nur marginal entgegengewirkt werden konnte. In einer neuronalen Zelllinie mit minimaler Expression von HNF-4 α wurde die Auswirkung einer transienten Überexpression der drei Faktoren auf die Aktivität des SeP-Promotors einzeln und in Kombination untersucht. Während die Einzelfaktoren alleine nur schwach aktivierend wirkten, wurden sowohl HNF-4 α als auch FoxO1a durch PGC-1 α koaktiviert. Die Kombination der drei Faktoren resultierte in einer synergistischen Aktivierung des SeP-Promotors, die durch Mutation der FoxO1a- und / oder der HNF-4 α -Bindestelle vollständig reprimiert wurde. Demnach erfolgt die maximale transkriptionelle Aktivierung von SeP durch Komplexbildung der drei in trans agierenden Faktoren HNF-4 α , FoxO1a und PGC-1 α an den beiden unmittelbar benachbarten cis-regulatorischen Elementen, die sich auf dem SeP-Promotor in einem Abstand von etwa 120 Basenpaaren vom Transkriptionsstartpunkt befinden.

5.1.1 Die Bedeutung von HNF-4 α für die gewebespezifische Expression von Selenoprotein P

Mittels Northernhybridisierung wurde eine ubiquitäre Expression der SeP-mRNA in allen untersuchten humanen und murinen Geweben und Zelllinien nachgewiesen; relativ große Mengen der SeP-mRNA fanden sich dabei in Leber und Niere (Dreher et al., 1997; Burk und Hill 1994). Das im Blutplasma zirkulierende SeP wird vor allem von der Leber und in geringerem Maße auch von der Niere sezerniert (Carlson et al., 2004). Da in beiden Organen auch große Mengen des gewebespezifischen Transkriptionsfaktors HNF-4 α vorhanden sind (Drewes et al., 1996), ist die in dieser Arbeit gefundene HNF-4 α -abhängige Regulation von SeP geeignet, dessen starke Expression in der Leber und der Niere zu erklären. Unterstützt wird diese Hypothese durch Expressionsanalysen an Lebergewebe und Nierenepithelzellen nach genetischer Manipulation der HNF-4 α -Expression. In einem Mausmodell war nach leberspezifischem *knock-out* des HNF-4 α -Gens die Expression von SeP im Vergleich zu Wildtypmäusen um mehr als 80% verringert (Holloway et al., 2008). Umgekehrt führte in einer HNF-4 α -defizienten Nierenepithelzelllinie die Überexpression von HNF-4 α zur Induktion von SeP (Grigo et al., 2008). Beide Effekte sind durch eine direkte Bindung dieses Transkriptionsfaktors an den Promotor und die nachfolgende Induktion von SeP erklärbar. Neben der Leber und der Niere wird HNF-4 α auch in den Insulin produzierenden β -Zellen des Pankreas exprimiert, wo ebenfalls die Expression von SeP nachgewiesen wurde, während die Glucagon produzierenden α -Zellen kein SeP exprimieren (Niwa et al., 1997). Eine genauere Analyse der gewebespezifischen Expression von SeP erfolgte durch die relative Quantifizierung der SeP-Transkriptmengen in verschiedenen Organen der Maus mittels *Real-Time* RT-PCR (Hoffmann et al., 2007). Ergebnisse dieser Studie bestätigten die von Dreher et al. (1997) beschriebene maximale Expression von SeP in der Leber und zeigten eine starke SeP-Expression in der Niere und im Darm. In allen anderen untersuchten Organen wurden deutlich niedrigere Werte der SeP-Expression gemessen. Die relative mRNA-Menge von SeP in der Niere betrug etwa 1/6 derjenigen in der Leber und wurde im Darm um etwa das Zweifache übertroffen. Im Dünndarm zeigte sich wie auch in der Leber und der Niere eine besonders starke HNF-4 α -Expression (Drewes et al., 1996). Die Korrelation der Expression von SeP und HNF-4 α zeigt sich demnach neben Leber und Niere auch im Darm und unterstützt somit die in der vorliegenden Arbeit gezeigte HNF-4 α -abhängige Expression von SeP. In humanen Gewebeproben aus dem Kolon wurde SeP immunhistochemisch und mittels Western Blot detektiert. Bei Patienten mit Kolontumoren ist die Expression von SeP und der Gpx-Isoformen 1 und 3 in tumorhaftem Kolongewebe deutlich erniedrigt, wogegen die

Expression anderer Selenoenzyme wie der Thioredoxinreduktase und der Gpx2 unverändert bzw. leicht erhöht ist (Murawaki et al., 2008). Selensupplementation kann die Inzidenz von Tumoren des Kolons verringern, andererseits sind genetische Polymorphismen von Gpx-1 und SeP mit einem erhöhten Risiko der Entstehung von Kolontumoren assoziiert (s. 1.1.3). Demnach ist eine protektive Funktion dieser beiden Selenoproteine gegenüber der Entstehung und Progression von Kolontumoren anzunehmen, die möglicherweise in der Abwehr von durch ROS induzierten, oxidativen DNA-Schäden bestehen könnte.

Mittels Northernhybridisierung wurde HNF-4 α -Defizienz in Gehirn, Milz und Testes detektiert (Drewes et al., 1996), und in diesen Organen wird SeP im Vergleich zur Leber folgerichtig nur in sehr geringen Mengen exprimiert ($\sim 1/100$ der mRNA-Menge in der Leber) (Hoffmann et al., 2007). Der Vergleich der Transkriptmengen von SeP zwischen einer neuronalen und einer hepatischen Zelllinie bestätigte dies. Die niedrigen SeP-Transkriptmengen in der neuronalen Zelllinie waren mit niedrigen HNF-4 α -Transkriptmengen korreliert, während FoxO1a und PGC-1 α in den beiden Zelllinien in ähnlicher Menge exprimiert waren.

Während die SeP-mRNA in der Lunge in moderater Menge exprimiert wird (Hoffmann et al., 2007), konnte dort keinerlei Expression der HNF-4 α mRNA nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch, dass mit HNF-4 γ eine weitere Isoform des Transkriptionsfaktors dort vorkommt. In Reporterassays konnte HNF-4 γ ebenfalls HNF4-abhängige Promotorkonstrukte aktivieren, wenn auch mit geringerem Potential als HNF-4 α (Drewes et al., 1996). Beide Isoformen weisen bezüglich der DNA-bindenden Domäne sowie der Domänen, über die Interaktionen mit FoxO1a und PGC-1 α vermittelt werden, auf Aminosäureebene Sequenzhomologien von 80-100 % auf. Insofern ist eine Redundanz der beiden HNF4-Isoformen bei der Transaktivierung von SeP wahrscheinlich, wodurch dessen Expression in der Lunge vermutlich ebenfalls HNF4-abhängig reguliert wird. Paradox erscheint die Situation im Herz: trotz Defizienz bezüglich beider Isoformen HNF-4 α und HNF-4 γ (Drewes et al., 1996) wird SeP dort in mit der Lunge vergleichbarer Menge exprimiert (Burk et al., 1994). Zwar werden sowohl FoxO1a als auch PGC-1 α im Herz exprimiert, jedoch ist die im Vergleich zum Gehirn relativ starke mRNA-Expression von SeP vermutlich nicht nur auf diese beiden Faktoren zurückzuführen (s. 4.1.4). Zwei alternative Mechanismen der Transkriptionskontrolle von SeP im Herz sind denkbar; zum einen kann die Transaktivierung durch einen weiteren Transkriptionsfaktor über eine unbekannte Bindestelle erfolgen, oder die HNF-4 α -Bindestelle im SeP-Promotor wird von einem anderen Transkriptionsfaktor besetzt. Aufgrund der essentiellen Bedeutung dieser Bindestelle für die Promotoraktivität in der Leber

erscheint die zweite Variante wahrscheinlicher. Als möglicher Kandidat kommt ein Heterodimer der nukleären Rezeptoren RXR α (*retinoid x receptor- α*) und RAR (*retinoic acid receptor*) in Frage. RXR α und Retinsäure kontrollieren die Expression von Erythropoetin (Epo) in frühen Stadien der Embryonalentwicklung, in denen Epo in der Leber synthetisiert und von dort in den Blutkreislauf abgegeben wird. Beginnend mit E11.5 (*embryonic day 11.5*) wird die Epo-Expression nicht mehr durch RXR α /Retinsäure sondern durch HNF-4 α kontrolliert. Die Transaktivierung von Epo erfolgt in beiden Fällen durch Bindung von sowohl HNF-4 α als auch RXR α /RAR an ein DNA-Element der Sequenz TGACCTCTTGACCC in einem *downstream* des Epo-Gens gelegenen Verstärkerbereich (Makita et al., 2001). Diese Sequenz ist der HNF-4 α -Bindestelle im SeP-Promotor (TGAACCTTTGGACTA) sehr ähnlich, so dass möglicherweise die Expression von SeP im Herz durch Heterodimere der dort vorhandenen Transkriptionsfaktoren RXR α und RAR kontrolliert werden könnte.

Die Expression von SeP in den betrachteten Organen ist insbesondere für die systemische Selenversorgung des Organismus durch SeP-Sekretion der Leber und der Niere von Bedeutung. Die Rolle von lokal exprimiertem SeP, z.B. im Gehirn, dem Darm und vermutlich auch anderen Organen und Geweben ist dagegen noch kaum verstanden, allerdings wird eine Funktion von intrazellulärem SeP bei der Entgiftung von ROS und der Selenspeicherung in Hirnzellen diskutiert (Steinbrenner et al., 2006a; Richardson 2005).

5.2 Die hormonelle Regulation der hepatischen Selenoprotein P-Expression

In Hepatomzellen des Menschen und der Ratte wurde eine durch Insulin induzierte Verminderung der Promotoraktivität und der Biosynthese von SeP nachgewiesen, was auf die Akt-abhängige Phosphorylierung und nachfolgende Translokation des Transkriptionsfaktors FoxO1a aus dem Zellkern in das Cytosol zurückgeführt wurde (Walter et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Modell der insulinabhängigen Regulation der SeP-Biosynthese bestätigt und durch Einbeziehung gegenregulatorischer Hormone des Kohlenhydratmetabolismus erweitert. Während des Fastens bewirken Glucagon und Adrenalin sowie Glucocorticoidhormone einen Anstieg der Gluconeogenese in der Leber. Die Stimulation primärer Rattenhepatocyten mit dem synthetischen Glucocorticoid Dexamethason führte zu einem deutlichen Anstieg der Expression und Sekretion von SeP, der durch Koinkubation mit Forskolin weiter gesteigert wurde. Forskolin, ein in der indischen Pflanze

Coleus forskoli vorkommendes Diterpenoid, ist ein Aktivator des Enzyms Adenylatcyclase und führt somit wie Glucagon und Adrenalin zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels. In einer Studie mit Mäusen resultierte eine chronische Gabe von Dexamethason nach einer Woche in einem signifikanten Anstieg der Selenkonzentration im Plasma um 20 %, wogegen sie in der Leber um etwa den gleichen Prozentsatz abnahm (Watanabe et al., 1997). Diese Umverteilung des Selens von der Leber ins Blut ist gut mit einer durch Dexamethason stimulierten hepatischen Biosynthese und Sekretion von SeP erklärbar. Die gleichzeitige Behandlung mit Insulin inhibiert die durch Dexamethason stimulierte Biosynthese von SeP. Die Effekte beider Hormone auf die SeP-Biosynthese lassen sich auf die Regulation der PGC-1 α -Expression zurückführen. Dessen mRNA-Expression wurde in Übereinstimmung mit einer Studie von Yoon et al. (2001) in primären Hepatocyten analog zum SeP synergistisch durch Dexamethason und Forskolin induziert und durch Insulin inhibiert. Die Inhibierung der basalen wie auch der hormonstimulierten Expression von SeP durch Insulin erfolgt durch Modulation der transkriptionellen Aktivität von FoxO1 α und PGC-1 α . Insulin induziert in Hepatocyten Akt-abhängig eine Translokation von Transkriptionsfaktoren der FoxO-Familie wie z.B. FoxO1 α (Greer und Brunet 2005; Walter et al., 2008). Dadurch wird einerseits die Transaktivierung von SeP verringert, andererseits ist auch PGC-1 α ein Zielgen von FoxO1 α (Daitoku et al., 2003). Außer durch FoxO1 α wird die PGC-1 α -Expression vor allem durch den Glucocorticoidrezeptor und den cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktor CREB induziert, der dabei auf die Koaktivierung durch TORC2 angewiesen ist (Herzig et al., 2001; Koo et al., 2005). Insulin trennt diese Interaktion, indem es die Translokation und den proteasomalen Abbau von TORC2 via Phosphorylierung durch die *salt inducible kinase 2* (SIK2) fördert (Dentin et al., 2007). Somit dominiert *in vivo* die inhibierende Insulinwirkung über die Stimulation der Expression von PGC-1 α und seinen Zielgenen durch Dexamethason.

Ein Modell der durch die Transkriptionsfaktoren HNF-4 α und FoxO1 α sowie den Koaktivator PGC-1 α regulierten Expression von SeP in der Leber ist in Abbildung 49 dargestellt. Die Transkription von SeP wird durch die Wirkung der gegenregulatorischen Hormone Insulin sowie Glucocorticoide und den sekundären Botenstoff cAMP beeinflusst. Gegenwärtig sind keine anderen Selenoproteine bekannt, die in ähnlicher Weise durch Insulin und Glucocorticoide reguliert werden. Zusätzlich ist die hepatische Biosynthese und Sekretion von SeP auf eine ausreichende Verfügbarkeit von Selenverbindungen angewiesen (Yang et al., 1989; Xia et al., 2005). Aus dem hier präsentierten Modell wird ebenfalls ersichtlich, dass die hepatische SeP-Produktion hormonell ähnlich reguliert ist wie die Transkription von

Schlüsselgenen der Gluconeogenese (z.B. der G6Pase). Die hepatische Biosynthese und Sekretion von SeP beeinflusst die Selenhomöostase, da in SeP mehr als die Hälfte des Plasmaselens gebunden ist (Saito und Takahashi 2002) und es als Quelle der Selenversorgung extrahepatischer Gewebe dient.

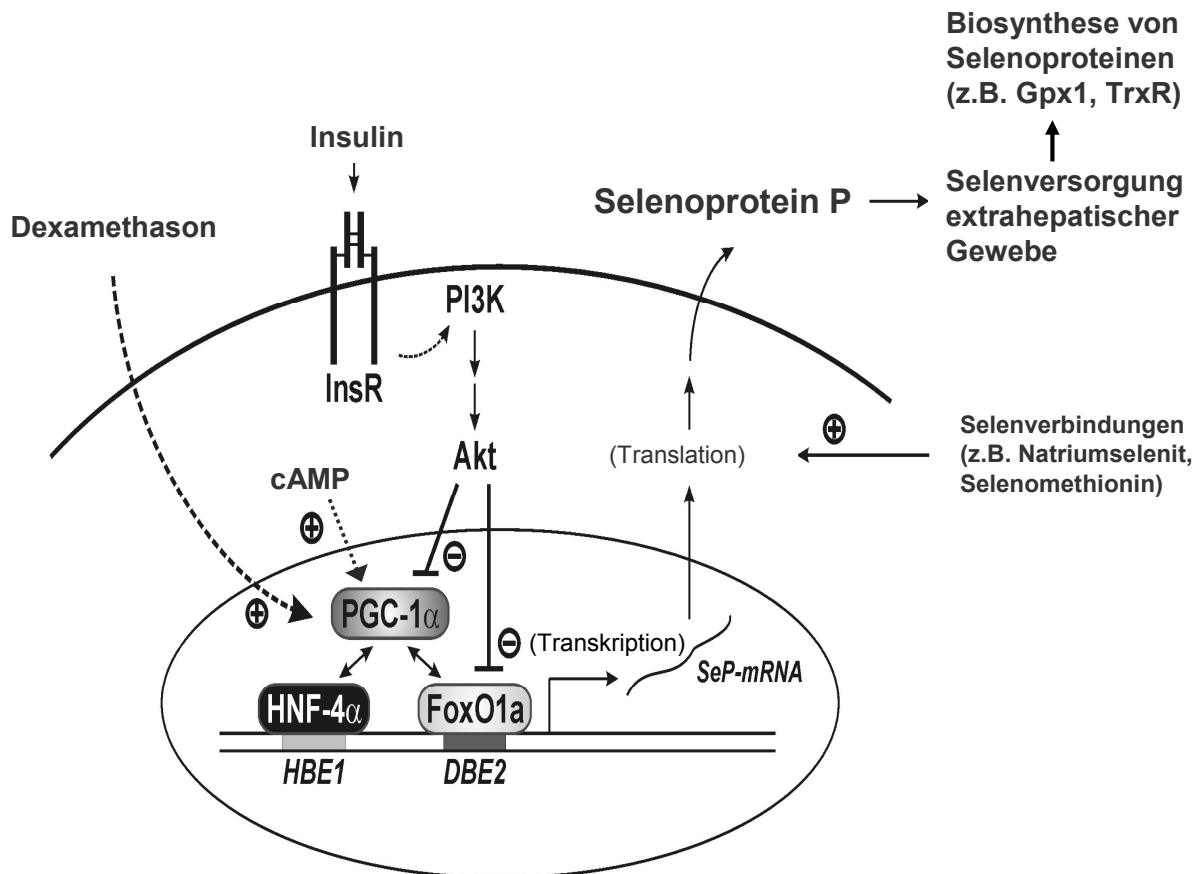


Abbildung 49: Regulation der SeP-Biosynthese in der Leber. Die transkriptionelle Regulation von SeP erfolgt via HNF-4 α , FoxO1 α und PGC-1 α . Hormonelle Stimuli (Insulin, Glucocorticoide und cAMP-Induktoren) modulieren die Aktivität des Transaktivierungskomplexes. Details s. Text 5.1 und 5.2. Nach: Speckmann et al. (2008).

5.3 Die Modulation der hepatischen Selenoprotein P-Expression durch die extrazelluläre Glucosekonzentration

Die erhöhte hepatische Glucoseproduktion ist eine wesentliche Ursache der für den Typ 2 Diabetes charakteristischen Hyperglykämie. Der wichtigste negative Regulator der Glucoseproduktion in der Leber ist das Hormon Insulin, das bei Typ 2 Diabetikern jedoch aufgrund verminderter Insulinsensitivität der Leber und anderer Zielgewebe und / oder verminderter Insulinsekretion nur unzureichend wirkt. In der Folge kommt es durch eine mangelhafte negative Regulation der hepatischen Gluconeogenese und durch eine verringerte Glucoseaufnahme peripherer Gewebe wie Skelettmuskulatur und Fettgewebe zu einem

Anstieg des Blutglucosespiegels. Zusätzlich und paradoxerweise führt Hyperglykämie selbst zu einer erhöhten Gluconeogenese in der diabetischen Leber durch Induktion des Enzyms G6Pase (Massillon et al., 1996), das den letzten Schritt der Gluconeogenese katalysiert, wodurch die Blutglucosekonzentration weiter ansteigt und der Krankheitsverlauf forciert wird. Hinsichtlich des in der vorliegenden Arbeit ermittelten Zusammenhangs der SeP-Regulation mit der G6Pase, wurde eine Beeinflussung der SeP-Biosynthese durch erhöhte Glucosekonzentrationen postuliert und untersucht.

Die Kultivierung primärer Rattenhepatocyten in Medium mit erhöhter Glucosekonzentration (25 mM) resultierte in einer signifikanten Steigerung der Transkription und der Sekretion von SeP im Vergleich zu Medium mit einer Glucosekonzentration von 11 mM. In gesunden, nüchternen Ratten werden Blutglucosespiegel von 8 - 11 mM gemessen, während Typ 2 oder Typ 1 diabetische Ratten Konzentrationen von etwa 20 bzw. bis zu 40 mM Glucose aufweisen (Shimizu et al., 2009), so dass die verwendeten Glucosekonzentrationen einem annähernd normo- bzw. einem hyperglykämischen Zustand in der Ratte entsprechen. Beim Menschen entspricht Normoglykämie einer Nüchtern-Plasmaglukosekonzentration von weniger als 6.1 mM Glucose im venösen Plasma. Bei einer Nüchtern-Plasmaglukosekonzentration von mehr als 7 mM ist ein Diabetes mellitus angezeigt, und im Bereich von 6.1 – 6.9 mM Glucose spricht man von einer abnormen Nüchtern-Glykämie. Erhöhte Glucosekonzentrationen führen unter anderem zu einem Anstieg des Metaboliten UDP-GlcNAc (Uridindiphosphat-N-acetylglucosamin), das in der Hexosaminbiosynthese gebildet wird, einem Nebenweg der Glycolyse. UDP-GlcNAc dient dem Enzym O-GlcNAc-Transferase als Donor für die Übertragung von GlcNAc auf Serin- und Threoninreste von cytosolischen und nukleären Proteinen. Dazu zählen auch Transkriptionsfaktoren, die durch die posttranslationale Modifizierung mit GlcNAc ähnlich wie durch eine Phosphorylierung dynamisch und reversibel in ihrer Funktion und Lokalisation moduliert werden (Hart et al., 2007). Zu den durch GlcNAc-Modifizierung regulierten Transkriptionsfaktoren zählen insbesondere auch FoxO1a (Housley et al., 2008) und der CREB-Koaktivator TORC2 (Dentin et al., 2008). Im Fall von FoxO1a ist dessen Transaktivierungspotential durch die GlcNAc-Modifizierung gesteigert und Zielgene von FoxO1a wie die G6Pase werden induziert (Housley et al., 2008). Die Glykosylierung von TORC2 verhindert dessen insulinabhängige Phosphorylierung durch die Kinase SIK2 (*salt inducible kinase 2*) und den darauf folgenden proteasomalen Abbau von TORC2 (Dentin et al., 2007; Dentin et al., 2008). Analog zu FoxO1a bewirkt glykosyliertes TORC2 zusammen mit CREB einen Anstieg der Expression der G6Pase und der Gluconeogenese (Dentin et al., 2008). Bei TORC2 zeigt sich eine

Konkurrenz der Glykosylierung definierter Aminosäurepositionen gegenüber deren Phosphorylierung, wobei die beiden Proteinmodifikationen gegensätzliche Effekte auf die Funktion und Lokalisation des Koaktivators haben.

Die Kultivierung primärer Hepatocyten in Medium mit 25 mM Glucose führte zur Steigerung der Expression von PGC-1 α um etwa 100 % im Vergleich zur Kultivierung mit 11 mM Glucose. Diese Stimulation kann vermutlich auf eine verstärkte transkriptionelle Aktivität des CREB/TORC2-Komplexes zurückgeführt werden, der in der Leber die Expression von PGC-1 α reguliert (Shaw et al., 2005). Unter hyperglykämischer Kultivierung der Hepatocyten wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls ein Anstieg der mRNA-Expression der G6Pase gemessen (Abbildung 33). Die Expression der G6Pase diente als Positivkontrolle des Effekts einer erhöhten Glucosekonzentration, da eine glucose-induzierte Expression der G6Pase in Ratten *in vivo* und in primären Rattenhepatocyten *in vitro* beschrieben wurde (Massillon et al., 1996; Argaud et al., 1997). Die Induktion von PGC-1 α und eine erhöhte transkriptionelle Aktivität von FoxO1a durch GlcNAc-Modifikation werden von uns als Ursache der glucoseabhängigen Regulation der SeP-Biosynthese angenommen. Dass erhöhte Glucosespiegel zu einer Verstärkung der hepatischen Glucoseproduktion führen, erscheint paradox, und es ist derzeit nicht klar, ob dieser Effekt lediglich ein Ausdruck von Glucosetoxizität in der Leber ist oder ob sich darin ein evolutionärer „Sinn“ offenbart. Zur Klärung dieser Frage trägt die Tatsache bei, dass durch GlcNAc-Modifikation auch antioxidative Enzyme induziert werden: die GlcNAc-abhängige Aktivierung von FoxO1a verstärkt nicht nur die Gluconeogenese, sondern induziert auch die Transkription von Genen, die für ROS-detoxifizierende Enzyme wie die Katalase und die manganabhängige Superoxiddismutase (MnSOD) codieren (Housley et al., 2008), so dass die durch Hyperglykämie erhöhte ROS-Produktion bei Diabetikern (Menon et al., 2004) besser abgewehrt werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde mit SeP ein weiteres glucosereguliertes und FoxO1a-abhängiges Protein identifiziert, das als extrazelluläres Antioxidans fungiert und wie Katalase und MnSOD an der Abwehr von ROS beteiligt ist. Zusätzlich könnte eine unter Hyperglykämie gesteigerte SeP-Sekretion die periphere Selenversorgung erhöhen und einen Anstieg der Expression und Aktivität selenabhängiger antioxidativer Enzyme in den Zielgeweben von SeP verursachen. *In vitro* wurde die Induktion intrazellulärer Selenoproteine durch extrazelluläres SeP bereits gezeigt. So bewirkte in einer Astrocytomzelllinie und einer endothelialen Zelllinie die Supplementation des Kulturmediums mit SeP eine Stimulation der Expression und Aktivität der Selenoenzyme Gpx1 und / oder Thioredoxinreduktase-1, was die Zellen gegen oxidative Schädigung

schützte (Steinbrenner et al. 2006a/b). Bisher ist mit Selenoprotein S (SelS) nur ein weiteres, durch die Glucosekonzentration reguliertes Selenoprotein bekannt. Die Expression von SelS wird in HepG2-Zellen im Unterschied zu SeP jedoch durch Glucosemangel (< 2 mM Glucose) induziert (Gao et al., 2004).

Die Ergebnisse der an kultivierten Hepatocyten durchgeführten *in vitro* Versuche werden durch eine Studie an US-Amerikanern mit unterschiedlicher Glucosetoleranz unterstützt (Menon et al., 2004). Den Werten der Blutglucosekonzentrationen im nüchternen Zustand entsprechend wurden drei Gruppen mit stoffwechselgesunden Probanden (< 6.1 mM Glucose), Teilnehmern mit eingeschränkter Glucosetoleranz (6.1 bis 7.0 mM Glucose) und Teilnehmern mit pathologischen Blutglucosekonzentrationen (>7.0 mM Glucose) gebildet. Als Marker des Selenspiegels wurde die Aktivität der Gpx3 im Plasma gemessen, die in der Gruppe mit den niedrigsten Blutglucosespiegeln am geringsten war. Bei den weiblichen Teilnehmern zeigte sich eine signifikante Korrelation des Blutglucosespiegels mit der Gpx3-Aktivität. Entscheidend in dieser Untersuchung ist der Vergleich diagnostizierter Typ 2 Diabetiker mit guter und schlechter glykämischer Kontrolle. Diabetiker mit schlecht kontrollierten Blutglucosespiegeln von mehr als 7 mM Glucose hatten um etwa 10 % höhere Aktivitäten der Gpx3 als gut kontrollierte Diabetiker (< 7 mM Glucose). Eine Korrelation erhöhter Plasmaselenspiegel mit der Inzidenz des Typ 2 Diabetes zeigte sich auch in einer Untersuchung an ~ 9000 Teilnehmern der Studie *National Health and Nutrition Examination Survey III* (Bleys et al., 2007). Eine durch Hyperglykämie erhöhte hepatische SeP-Sekretion ist konsistent mit den Ergebnissen dieser Studien. Um dies zu verifizieren, ist zusätzlich zur Messung der Selenspiegel die Messung der SeP-Spiegel im Plasma von Probanden erforderlich. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist ein möglicher Zusammenhang der Selenhomöostase und des Kohlenhydratstoffwechsels ableitbar. In Kapitel 5.5 werden pathophysiologische Konsequenzen diskutiert, die aus diesem Zusammenhang resultieren könnten.

5.4 Die Inhibierung der hepatischen SeP-Expression und Sekretion durch Metformin

Das Biguanid Metformin gehört neben Insulin, den Sulfonylharnstoffderivaten (z.B. Tolbutamid) und den Thiazolidinonen (z.B. Troglitazon) zu den Standardtherapeutika bei der medikamentösen Behandlung des Typ 2 Diabetes. Metformin wird erfolgreich zur Behandlung der Hyperglykämie und zur Verbesserung der Insulinsensitivität bei Typ 2

Diabetikern eingesetzt (Davidson und Peters 1997). Die Senkung des Blutglucosespiegels durch Metformin wird im Wesentlichen durch die Hemmung der hepatischen Gluconeogenese (Argaud et al., 1993; Hundal et al., 2000) sowie durch die Verbesserung der Insulinwirkung und der Glucoseaufnahme in Skelettmuskel und Fettgewebe bewirkt (Hundal et al., 1992; Kozka und Holman 1993). Metformin wird von Leberzellen durch den organischen Kationentransporter Oct-1 aufgenommen (Shu et al., 2007).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Metformin in isolierten Hepatocyten neben der Hemmung von Enzymen der Gluconeogenese auch eine Hemmung der Biosynthese von SeP verursacht. In normo- und hyperglykämisch kultivierten Hepatocyten führte die Inkubation mit Metformin zu einer signifikanten Verringerung der Transkription und der Sekretion von SeP (Abbildung 36). Auch einer durch Dexamethason stimulierten Biosynthese von SeP wurde durch Metformin entgegengewirkt. Kontrollexperimente bestätigten die in anderen Studien (Fulgencio et al., 2001) gezeigte Inhibierung der G6Pase-Expression in Hepatocyten durch Metformin. Signifikante Verminderungen der Expression von SeP und G6Pase wurden mit Metforminkonzentrationen von 1 oder 2 mM erreicht. Im Menschen werden nach oraler Aufnahme täglicher Metformindosen von bis zu 2 Gramm bei einer absoluten Bioverfügbarkeit von 50-60 % Plasmakonzentrationen von etwa 10 μ M Metformin gemessen (Wiernsperger 1999). Untersuchungen an Mäusen zeigten, dass durch Akkumulation von Metformin in der Leber lokale Konzentrationen von mehr als 180 μ M erreicht werden (Wilcock und Bailey 1994). In Versuchen an kultivierten Hepatocyten wird Metformin typischerweise in Konzentrationen von bis zu 2 mM eingesetzt. In dieser Konzentration bewirkt Metformin keine Änderung der intrazellulären ATP-Konzentration (Zhou et al., 2001). *In vitro*-Effekte von Metformin an primären Hepatocyten sind dosis- und zeitabhängig; ein wichtiger Mediator der Metforminwirkung in diesen Zellen ist die Kinase AMPK, deren signifikante Aktivierung bei einer kurzen Inkubationsdauer von bis zu 1 h nur mit hohen Metforminkonzentrationen von mindestens 500 μ M erreicht wird. Dagegen ist bei längerer Inkubation (39 h) für den gleichen Effekt eine -therapeutische- Konzentration von 10 – 20 μ M Metformin ausreichend (Zhou et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Metforminbehandlung der primären Hepatocyten in serumfreiem Medium. Zur Erhaltung der Zellviabilität schloss sich eine mehr als 24-stündige Kultivierung der Zellen in diesem Medium an, so dass zur Untersuchung der Metforminwirkung höhere Konzentrationen von bis zu 2 mM Metformin verwendet wurden. Die Ergebnisse dieser *in vitro* Untersuchungen zeigen erstmals einen Einfluss von Metformin auf den Selenstoffwechsel.

Die Kinase AMPK (*AMP-activated protein kinase*) ist ein zentraler Mediator der Effekte von Metformin auf Gene der Gluconeogenese und der Lipogenese in der Leber (Zhou et al., 2001). Die AMPK ist ubiquitär exprimiert und fungiert als intrazellulärer Energiesensor, der bei Energiemangel ATP-verbrauchende Stoffwechselwege reprimiert und katabole Stoffwechselwege aktiviert. Energiemangel und andere metabolische Stressoren wie Sauerstoffmangel oder erhöhte körperliche Aktivität bewirken einen Anstieg des intrazellulären AMP/ATP-Konzentrationsverhältnisses, wobei durch ATP-Verbrauch entstandenes ADP durch die Adenylatkinase in AMP und ATP umgesetzt wird. AMP bewirkt eine allosterische Aktivierung der AMPK, die nach AMP-Bindung durch die Kinase LKB1 an der katalytischen α -Untereinheit phosphoryliert (Thr172) und dadurch maximal aktiviert wird (zusammengefasst in: Towler et al., 2007). In Übereinstimmung mit dieser energiesensitiven Regulation der AMPK-Aktivität wurde in der vorliegenden Arbeit eine inverse Korrelation des Phosphorylierungsstatus der AMPK α an Position Thr172 und der extrazellulären Glucosekonzentration (25 mM Glucose) gezeigt. Zusätzlich zum bereits diskutierten Effekt der Glucosekonzentration auf die Expression bzw. transkriptionelle Aktivität der Faktoren PGC-1 α und FoxO1a mag die glucoseregulierte SeP-Biosynthese zum Teil auch aus der Modulation der AMPK-Aktivität durch Glucose resultieren. Durch Hemmung der bei 11 mM Glucose erhöhten AMPK-Aktivität mit dem synthetischen Inhibitor Compound C wurde in der Tat eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression von SeP nachgewiesen. Unter Kultivierung der Hepatocyten mit 25 mM Glucose, also bei erniedrigter AMPK-Aktivität, hatte Compound C dagegen keinen signifikanten Effekt auf die SeP-Expression (Abbildung 45). Die Hemmung der AMPK, durch die direkte Wirkung des Inhibitors Compound C oder andererseits durch die indirekte metabolische Wirkung einer erhöhten Verfügbarkeit von Glucose, führt demzufolge zu einer erhöhten SeP mRNA-Expression. Dieser Effekt kann möglicherweise wiederum durch die Regulation des CREB-Koaktivators TORC2 erklärt werden. So wurde eine AMPK-abhängige Phosphorylierung von TORC2 beschrieben (Koo et al., 2005), die an derselben Position (Ser171) auch Insulinabhängig durch SIK2 phosphoryliert wird und die Translokation von TORC2 vom Zellkern in das Zytosol bewirkt. Die dadurch erniedrigte Expression von PGC-1 α könnte eine AMPK-abhängige Reprimierung der SeP mRNA-Expression bewirken.

Metformin verursacht eine Aktivierung der AMPK (Zhou et al., 2001; Koo et al., 2005), durch die der inhibierende Effekt von Metformin auf die hepatische Gluconeogenese vermittelt wird (Shaw et al., 2005). Dafür ist außerdem die Kinase LKB1 erforderlich, welche die AMPK in Position Thr172 phosphoryliert; der genaue Mechanismus der AMPK-

Aktivierung durch Metformin ist jedoch unbekannt. In Kontrollexperimenten wurde durch die Untersuchung der AMPK-Phosphorylierung die Modulation der AMPK-Aktivierung durch Metformin sowie die AMPK-Abhängigkeit der durch Metformin induzierten Inhibierung gluconeogenetischer Gene anhand der mRNA-Expression der G6Pase bestätigt. Durch die Verwendung des AMPK-Inhibitors Compound C konnte gezeigt werden, dass der reprimierende Effekt von Metformin auf die mRNA-Expression von SeP jedoch nicht oder zumindest nicht ausschließlich durch diese Kinase vermittelt wird. In Kontrollexperimenten wurde jedoch die bekannte Modulation der AMPK-Phosphorylierung durch Metformin sowie die AMPK-Abhängigkeit der durch Metformin induzierten Inhibierung der mRNA-Expression des Gluconeogenese-Enzyms G6Pase bestätigt. Compound C ist neben dem Adenosid-Analogon AraA (9- β -D-Arabinosyladenin) der derzeit einzige kommerziell erhältliche AMPK-Inhibitor, und dessen Spezifität für diese Kinase ist unklar. Um eine Funktion der AMPK bei der durch Metformin induzierten Inhibierung der SeP-Biosynthese ausschließen zu können, sind zusätzlich Versuche an AMPK- oder LKB1-defizienten Hepatocyten erforderlich. In der Literatur wurde die Beeinflussung weiterer Signalwege durch Metformin beschrieben. Beispiele für Kinasen, deren Aktivitäten durch Metformin moduliert werden, sind der Insulinrezeptor bzw. das Insulinrezeptorsubstrat-2 in der Leber (Gunton et al., 2003), die p38 MAPK und die PKC im Herz (Saeedi et al., 2008) sowie die p70S6K in Brustkrebszellen (Vazquez-Martin et al., 2009). Inhibitoren der Kinasen p38 und PKC bewirkten eine signifikante Verringerung des durch Metformin induzierten Effekts auf die mRNA-Expression von SeP. Die Beteiligung dieser Kinasen bedarf jedoch der Bestätigung durch molekulargenetische Techniken wie *siRNA*-Transfektion oder *knock-out*, da die verwendeten Enzyminhibitoren keine absolute Spezifität besitzen.

Die Inhibierung der basalen und der durch Dexamethason induzierten SeP-Sekretion deutete auf einen zusätzlichen posttranskriptionellen Effekt von Metformin auf die SeP-Biosynthese hin. Hierbei zeigte sich, dass Metformin die mRNA-Expression von Enzymen verringert, die essentiell für den Einbau von Selenocystein in Selenoproteine sind. Die Enzyme Selenocysteinsynthase (SecS) und Selenophosphatsynthetase-2 (SPS-2) waren bei erhöhter Glucosekonzentration (25 mM) leicht stimuliert (Abbildung 40). SPS-2 ist im Gegensatz zum homologen Protein SPS-1 selbst ein Selenoprotein und als alleiniges Enzym dazu in der Lage, das für die Synthese der Selenocystein-tRNA essentielle Selenophosphat zu generieren (Xu et al., 2007) und stellt damit ein Schlüsselenzym bei der Translation der Selenoproteine dar. Die Expression der SPS-2 wurde unter normo- und hyperglykämischer Kultivierung durch Metformin signifikant gehemmt, wodurch eine verringerte Translation und Sekretion von SeP

erklärt werden konnten. Bei hyperglykämischer Kultivierung primärer Hepatocyten führte Metforminbehandlung auch zur Inhibierung der Selenocystein-Synthase (SecS), einem weiteren Enzym des Selenstoffwechsels.

Eine konzertierte Inhibierung von für die Selenoproteinbiosynthese essentiellen Faktoren wurde *in vivo* in einem Entzündungsmodell der Maus beobachtet (Renko et al., 2009). Dort bewirkte die durch Injektion von Lipopolysacchariden (LPS) verursachte Akut-Phase-Reaktion eine Verminderung der mRNA-Expression der SPS-2 und SecS sowie der Phosphoseryl-tRNA^{Sec} Kinase (Pstk1). Nach LPS-Injektion wurde eine kontinuierliche Abnahme der SeP-Serumkonzentration beobachtet, die einerseits aus einer verstärkten Bindung bzw. Aufnahme von SeP in Entzündungsarealen resultieren kann (s. 1.2.1.2); andererseits erklärt sie sich durch einen überwiegend posttranskriptionellen Effekt auf die SeP-Biosynthese durch die verminderte Expression von Selenoproteinsynthesefaktoren. Diese Hypothese wurde durch Versuche an HepG2 Hepatomzellen unterstützt, in denen der knock-down von nur einem der Selenoproteinsynthesefaktoren, der Pstk1, in einer Abnahme der SeP-Sekretion um etwa 40 % resultierte (Renko et al., 2009).

Aufgrund der durch Metformin induzierten Inhibierung der SPS-2- und der SecS-Expression in Hepatocyten wird ein erweitertes Spektrum der metabolischen Wirkungen von Metformin auf die Selenhomöostase und die Expression von Selenoenzymen postuliert. Hinsichtlich der in aktuellen Studien beobachteten Korrelation von Plasmaselenspiegeln und der Inzidenz eines Typ 2 Diabetes ist diese „neue“ Wirkung von Metformin von besonderem Interesse; dieser Punkt wird in 5.5 diskutiert. Die Hypothese der Beeinflussung der Selenhomöostase durch Metformin wird durch eine Studie an neudiagnostizierten Typ 2 Diabetikern unterstützt: die initiale Therapie mit einer täglichen Metformindosis von 850 mg resultierte in einer signifikanten Verringerung der Aktivität bzw. der Expression der Selenoenzyme Gpx3 im Plasma und der Gpx1 in Erythrozyten (Pavlović et al., 2000).

Interessanterweise verursachte Dexamethason einen Anstieg der SPS-2 mRNA-Expression um fast 100% (Abbildung 40), so dass die Stimulierung der SeP-Sekretion durch Dexamethason vermutlich auch aus einer verstärkten SeP-Translation resultiert. Ein genereller Effekt auf die Biosynthese von Selenoproteinen bei einer pharmakodynamischen Behandlung mit Glucocorticoiden ist zu vermuten und hinsichtlich erwünschter -antiinflammatorischer- wie unerwünschter -stoffwechselmodulierender- Effekte von klinischer Bedeutung. Bei langdauernder, hochdosierter Glucocorticoidtherapie kann es zur Ausbildung eines iatrogenen Cushing-Syndroms kommen, wobei Metformin erfolgreich zur Prävention einer sich dabei verschlechternden diabetischen Stoffwechsellage eingesetzt wird

(Thomas et al., 1998). Umgekehrt könnte der Inhibierung von SeP und Faktoren der Selenoproteinbiosynthese bei einer akuten Entzündung (Renko et al., 2009) evtl. durch Dexamethasongabe entgegengewirkt werden.

Im Gegensatz zu Metformin hatte Insulin keinerlei Einfluss auf die Expression von SecS und SPS-2. Der inhibierende Effekt von Insulin auf die SeP-Biosynthese beruht daher auf der Kontrolle der Transkription von SeP via Akt, wogegen Metformin die Biosynthese von SeP sowohl transkriptionell als auch posttranskriptionell inhibiert. Die Beeinflussung der hepatischen Biosynthese von SeP durch Metformin ist in Abbildung 50 schematisch dargestellt.

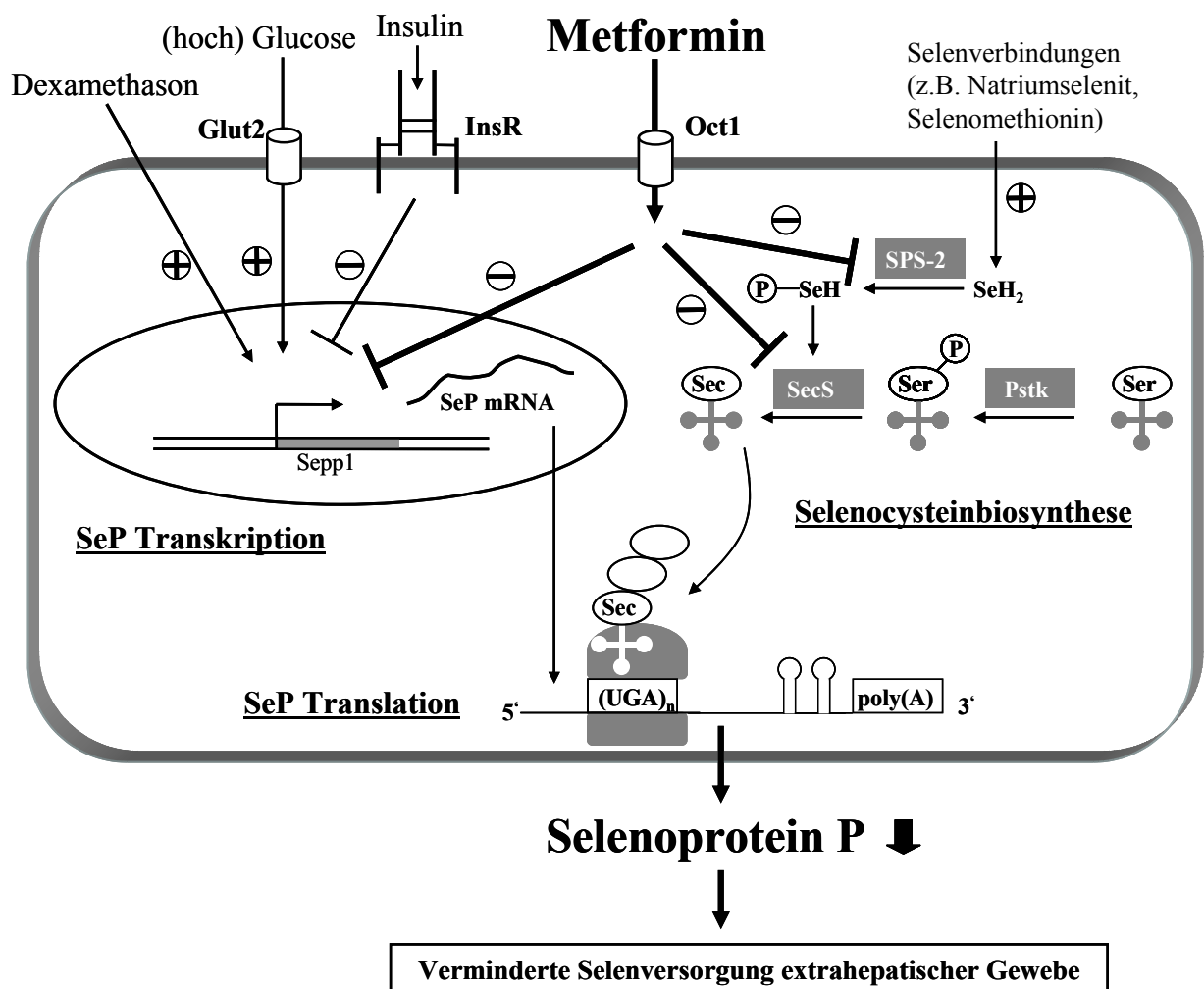


Abbildung 50: Beeinflussung der hepatischen Biosynthese von SeP durch Metformin. Metformin vermindert die basale wie auch die durch Dexamethason oder erhöhte Glucosekonzentrationen stimulierte Transkription und Biosynthese von SeP. Zusätzlich vermindert Metformin die mRNA-Expression von Genen mit essentieller Funktion in der Selenocysteinbiosynthese (SPS-2 und SecS). Details s. Text 5.3 und 5.4. Nach: Speckmann et al. (2009). Glut-2, *glucose transporter-2*; InsR, *insulin receptor*; Oct1, *organic cation transporter 1*.

5.5 Ausblick: Selen und Typ 2 Diabetes

Epidemiologische Studien und Tiermodelle zeigen eine Korrelation der Serumselenkonzentration mit dem Blutglucosespiegel sowie der Prävalenz des Typ 2 Diabetes. Die umfassendste Interventionsstudie, die Effekte von Selen auf den Kohlenhydratstoffwechsel und die Inzidenz des Typ 2 Diabetes untersuchte, ist der in den USA durchgeführte *NPC trial (nutritional prevention of cancer)*. In dieser randomisierten und placebokontrollierten Doppelblindstudie wurde ursprünglich der Effekt der Supplementation durch eine tägliche Dosis von 200 µg Selen in Form einer Selenhefetablette über einen Zeitraum von durchschnittlich 7.5 Jahren auf die Inzidenz verschiedener Tumore untersucht. Eine Sekundäranalyse auf die Inzidenz des Typ 2 Diabetes bei etwa 1.200 Probanden zeigte, dass das relative Risiko (RR) an Typ 2 Diabetes zu erkranken durch Selensupplementation um 55 % erhöht war (Stranges et al., 2007). Dieses Risiko stand in direktem Zusammenhang mit der initialen Plasmaselenkonzentration; bei Probanden mit den niedrigsten Selenspiegeln (< 105 µg/l) zu Beginn der Studie bewirkte die Selensupplementation keine Änderung der Diabetesinzidenz (RR 1.03). Im Tertil mit mittleren initialen Selenspiegeln (105.3 – 121.6 µg/l) dagegen war das Risiko bereits um 35 % erhöht und im Tertil mit den höchsten Plasmaselenkonzentrationen (>121.6 µg/l) sogar um 140 % (RR 2.4). Die durchschnittlichen Plasmaselenkonzentrationen der Suppletionsgruppe lagen über den gesamten Zeitraum der Studie in einem Bereich von 150 – 200 µg/l, der demnach bzgl. der Typ 2 Diabetes-Inzidenz als kritisch anzusehen ist. Eine positive Korrelation der Selenspiegel und der Diabeteshäufigkeit zeigte sich auch in der epidemiologischen Studie *National Health and Nutrition Examination Survey III* (NHANES III) mit mehr als 9.000 Teilnehmern. Über einen Zeitraum von etwa sechs Jahren war die Typ 2 Diabetes-Prävalenz beim Quintil mit Plasmaselenkonzentrationen von mehr als 137.7 µg/l um etwa 60 % höher als beim Quintil mit den niedrigsten Selenspiegeln (<111.6 µg/l) (Bleys et al., 2007). Aktuellere Daten, die in den Jahren 2003-2004 in den USA erfasst wurden (NHANES 2003-2004), zeigen einen Anstieg der mittleren Serumselenkonzentration auf 137.1 µg/l in einer für die US-Bevölkerung repräsentativen Gruppe mit einer Diabetesprävalenz von 10.0 % (Laclaustra et al., 2009). Innerhalb dieser Gruppe von etwa 1000 Teilnehmern betrug die Diabeteshäufigkeit im Quartil mit den höchsten Selenspiegeln (≥ 147 µg/l) 16.1 %, beim Quartil mit weniger als 124 µg/l dagegen nur 3.6 %. In dieser und einer weiteren Humanstudie waren die Selenspiegel auch mit dem Nüchternblutglucosespiegel positiv korreliert (Czernichow et al., 2006). Eine experimentelle Bestätigung dieser Korrelation ergibt sich aus einer Suppletionsstudie an Ratten, in denen durch Behandlung mit Streptozotocin eine

Zerstörung der Insulin produzierenden Betazellen des Pankreas ausgelöst wurde. Die Zufuhr von täglich etwa 80 µg Selenomethionin bewirkte bei diesen diabetischen Ratten einen Anstieg des Nüchternblutglucosespiegels um fast 50 % nach drei Monaten (Erbayraktar et al., 2007).

Eine wichtige Frage in Bezug auf den von uns postulierten Zusammenhang zwischen Selen- und Kohlenhydratstoffwechsel ist die nach Ursache und Wirkung. Bestimmt der Kohlenhydratstoffwechsel die Homöostase von Selen oder hat die Selenkonzentration im Plasma einen dominierenden Einfluss auf den Metabolismus von Kohlenhydraten und evtl. auch auf andere Stoffwechselwege? Die Klärung dieser Fragestellung ist insbesondere vor dem Hintergrund der epidemischen Verbreitung des Typ 2 Diabetes und der weitverbreiteten Einnahme zusätzlichen Selens in Form von Nahrungsergänzungsmitteln in westlichen Bevölkerungen von Bedeutung (Combs 2001).

5.5.1 Beeinflussung der Selenhomöostase durch den Kohlenhydratstoffwechsel

Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zur Regulation der hepatischen Biosynthese von SeP wird eine Beeinflussung der Selenhomöostase durch Hormone des Kohlenhydratstoffwechsels sowie durch die Glucosekonzentration selbst postuliert. Die hormon- und glucoseabhängige Modulation der SeP-Biosynthese wird dabei insbesondere durch PGC-1 α und FoxO1a vermittelt, die als entscheidende Faktoren der transkriptionellen Regulation von SeP identifiziert worden sind. Unzureichende Insulinwirkung oder Insulindefizienz führt in der Leber diabetischer Mäuse und Menschen zur Überexpression von PGC-1 α und Enzymen der mitochondrialen Atmungskette (Yoon et al., 2001; Misu et al., 2007). Erhöhte Serumselenkonzentrationen sind deshalb während eines schlecht kontrollierten Diabetes zu erwarten, und dies wurde neben den bereits genannten auch in weiteren Studien beobachtet (Cser et al., 1993; Zwirska-Korczala et al., 2003). Dass erhöhte Selenspiegel als direkte Folge eines Diabetes auftreten, wurde in einer Studie an Ratten beobachtet, ohne dass dieser Effekt jedoch erklärt werden konnte. Nach Streptozotocinbehandlung von Ratten stiegen Plasmaselenkonzentration und erythrozytäre Gpx1-Aktivität zeitabhängig an, während beide Parameter in einer unbehandelten Kontrollgruppe unter identischen Diätbedingungen konstant blieben (Erbayraktar et al., 2007).

5.5.2 Beeinflussung der Insulinsignalwirkung durch Selen bzw. Selenoproteine

Umgekehrt deutet vor allem die bereits erwähnte NPC-Studie (Stranges et al., 2007) darauf hin, dass die Selenkonzentration im Plasma den Kohlenhydratstoffwechsel beeinflusst. Die dort beobachteten adversen Selenwirkungen waren insofern überraschend, als in früheren Untersuchungen an isolierten Zellen und an Tieren Selenverbindungen insulinmimetische Wirkungen zeigten. So bewirkte Selenat in isolierten Adipocyten eine erhöhte Glucoseaufnahme und eine Verstärkung der Insulinwirkung (Ezaki 1990). In diabetischen Mäusen bewirkte es eine Verbesserung der Glucosetoleranz und der Insulinresistenz (Becker et al., 1996; Müller et al., 2003). Diese *in vitro* und *in vivo* Effekte waren jedoch auf sehr hohe Dosen (15 % der LD50) von Selen in der Oxidationsstufe des Selenats (+VI) beschränkt (Müller et al., 2006). Bei der Gabe von Selen in physiologisch relevanteren Konzentrationen entwickelten die Ratten dagegen Übergewicht und Hyperlipidämie, die kennzeichnend für unzureichende Insulinwirkung sind und einen prädiabetischen Phänotyp darstellen (Müller et al., 2008). Selen bewirkt eine Modulation der Insulinsignalkaskade, deren Aktivität in Hepatocyten durch sehr hohe Selenatkonzentrationen verstärkt, durch moderate Konzentrationen von Selenat und Selenit aber gehemmt wird. Die Insulinsignalkaskade wird durch Insulinbindung an dessen Rezeptor ausgelöst, der daraufhin dimerisiert und sich selbst phosphoryliert. Darauf ist dessen Tyrosinkinaseaktivität erhöht und Substrate wie das *insulin receptor substrate* 1 und 2 (IRS-1/2) werden an spezifischen Tyrosinresten phosphoryliert. Phosphoryliertes IRS aktiviert Kinasen wie z.B. die PI3-Kinase, die das Insulinsignal weiterleiten (Saltiel und Kahn 2001). Nach Bindung von Insulin an seinen Rezeptor kommt es zu einem kurzfristigen Anstieg der intrazellulären Wasserstoffperoxidkonzentration durch die Aktivierung von NADPH-Oxidasen. Die Blockade dieser durch Insulin induzierten H₂O₂-Bildung durch Vorinkubation mit Katalase oder durch Deletion der NADPH-Oxidase führt zu einer deutlichen Inhibierung der Insulinsignalkaskade (Mahadev et al., 2004). Die negative Regulation der Insulinwirkung erfolgt durch Proteintyrosinphosphatasen (PTP), von denen die Isoform PTP1B als wichtiger Regulator der Insulinwirkung *in vivo* identifiziert wurde (Elchebly et al., 1999). Durch Insulinbindung induziertes wie auch exogen zugeführtes H₂O₂ bewirken eine Verstärkung der Insulinwirkung, die auf die reversible Inhibierung der insulinantagonistischen Proteintyrosinphosphatase-1B (PTP1B) zurückgeführt werden konnte. Die katalytische Domäne der PTP1B enthält einen Cysteinrest, der während der Dephosphorylierung von Phosphotyrosinproteinen ein Cysteinylphosphatintermediat bildet.

Dieser für die Katalyse kritische Cysteinrest wird durch ROS oxidiert und dadurch inaktiviert (zusammengefasst in: Goldstein et al., 2005).

In Ratten resultierte die Supplementation physiologischer Mengen von Selenit und Selenat (0.2 -2 mg/kg Trockenfutter) in einer dosisabhängigen Zunahme der PTP1B-Aktivität. Zwei Gründe werden dafür diskutiert: einerseits nimmt in Folge des Metabolismus der Selenverbindungen der Gehalt an Glutathion ab, das durch Konjugation an den katalytischen Cysteinrest von PTP1B dessen Tyrosinphosphataseaktivität blockiert, und andererseits wird die Expression des Selenoenzyms Gpx1 maximiert, das durch Abbau von H₂O₂ die oxidative Inhibierung von PTP1B verhindert (Müller et al., 2008). Damit übereinstimmend führt die Überexpression der Gpx1 durch genetische Manipulation in Mäusen zur Entwicklung von Fettleibigkeit und Insulinresistenz (McClung et al., 2004). Auch die Überexpression der Katalase, die wie die Gpx1 die Reduktion von H₂O₂ katalysiert, führt zu Insulinresistenz und erhöhter Aktivität der PTP1B (Dong et al., 2006). Diese Arbeiten an Tiermodellen zeigen, dass eine erhöhte Aktivität selenabhängiger, antioxidativer Enzyme oder eine erhöhte Selenzufuhr zu einer Fehlregulation des Kohlenhydrat- und des Lipidstoffwechsels führen können.

In einer aktuellen Studie wurde der Einfluss hoher Dosen von anderen Antioxidantien (Vitamin C und E) auf die durch körperliches Training gesteigerte Insulinsensitivität im Menschen untersucht (Ristow et al., 2009). Nach 4-wöchigem Training war die Insulinsensitivität, gemessen nach der euglykämischen Insulin-Clamp-Methode, von Probanden einer nicht-supplementierten Kontrollgruppe um etwa das Zweifache erhöht. Dieser positive Trainingseffekt trat dagegen nicht bei Probanden auf, die während der Trainingsphase täglich Vitamin C und E erhielten. Eine durch das Training induzierte Expression von PGC-1 α , das in Skelettmuskelzellen als Insulinsensitizer wirkt, wurde nur in der nicht-supplementierten Kontrollgruppe gemessen (Ristow et al., 2009). Diese Ergebnisse stimmen mit einem Modell überein, nach dem geringe Mengen an ROS, die durch Training transient gebildet werden, die Insulinsensitivität erhöhen, was durch eine Supplementation mit Antioxidantien anscheinend verhindert wird.

In vitro führt die Supplementation von Kulturmedien mit SeP zu erhöhter Expression und Aktivität der intrazellulären Gpx1 in Zelllinien, die dadurch eine erhöhte Kapazität zum Abbau von ROS haben (Steinbrenner et al., 2006a/b). *In vivo* ist aus der Leber sezerniertes SeP die physiologische Transportform von Selen, das von extrahepatischen Organen z.T. durch rezeptorvermittelte Endozytose und z.T. durch noch nicht bekannte Mechanismen aufgenommen wird (siehe 1.2.1). In einem Folgeprojekt soll daher die Aufnahme von SeP in

insulinsensitiven Geweben wie dem Skelettmuskel und dem Fettgewebe untersucht werden, da hier durch die Induktion der Gpx1 und anderer Selenoenzyme eine Modulation der Insulinsignalkaskade und der Glucoseaufnahme zu erwarten ist. Eine erhöhte SeP-Konzentration im Plasma, z.B. nach Selensupplementation, könnte via Gpx1 die Aktivität der PTP1B in insulinsensitiven Zellen erhöhen. Dies würde in Muskelzellen und Adipocyten die Wirkung von Insulin verringern und eine verminderte Glucoseaufnahme zur Folge haben (s. Abbildung 51). Umgekehrt könnte die Inhibierung der hepatischen Biosynthese von SeP durch Insulin analog zur Regulation der PTP1B zu einer Verstärkung der Insulinwirkung an insulinsensitiven Zellen beitragen. Bei einem manifesten Typ 2 Diabetes führt hepatische Insulinresistenz demnach zu weiter erhöhten SeP-Spiegeln, die im Sinne eines *circulus vitiosus* die periphere Insulinresistenz verstärken würden. Nach diesem Modell kann der therapeutische Erfolg von Metformin bei der Diabetesbehandlung möglicherweise zum Teil auf die Normalisierung erhöhter SeP-Spiegel zurückgeführt werden.

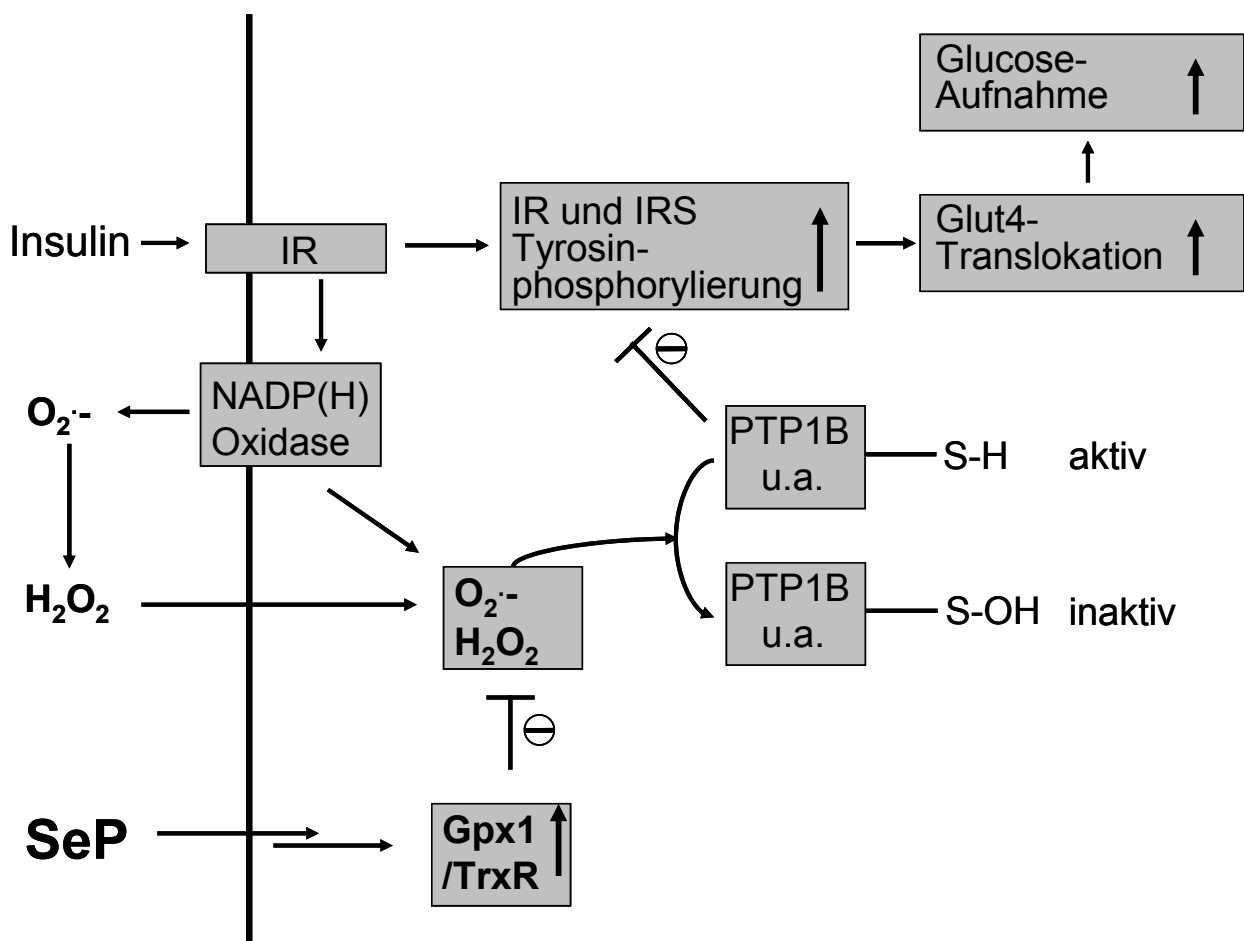


Abbildung 51: Schematische Darstellung der postulierten Beeinflussung der Insulinsignalkaskade in peripherem Skelettmuskel- und Fettgewebe durch die Verfügbarkeit von SeP im Blutplasma. Extrazelluläres SeP induziert intrazelluläre Selenoproteine, die durch ROS-Abbau die Aktivität des insulin-antagonistischen Enzyms PTP1B erhöhen und so die Insulinsignalkaskade hemmen. Details siehe Text 5.5. Modifiziert nach Goldstein et al. (2005).

6 Zusammenfassung

Selen ist ein essentielles Spurenelement und in Form der Aminosäure Selenocystein integraler Bestandteil der Selenoproteine. Die Mehrheit des im humanen Blutplasma zirkulierenden Selens ist in Form von Selenoprotein (SeP) enthalten, das hauptsächlich von der Leber synthetisiert wird und extrahepatische Organe mit Selen versorgt. Trotz der Bedeutung von SeP für die Selenhomöostase ist über Faktoren, die die Biosynthese von SeP regulieren, bisher nur wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die transkriptionelle und die hormonelle Regulation von SeP in Hepatomzellen und Hepatocyten untersucht. Im Promotor des humanen SeP-Gens wurde eine Bindestelle für den gewebespezifisch exprimierten Transkriptionsfaktor HNF-4 α identifiziert. Mittels Gelshift-Analyse wurde die direkte Bindung von endogenem und überexprimiertem HNF-4 α an dessen Bindestelle im SeP-Promotor nachgewiesen. Die Inaktivierung der HNF-4 α -Bindestelle durch ortsspezifische *in-vitro* Mutagenese resultierte in einer drastischen Verringerung der basalen und der induzierbaren Promotoraktivität von SeP in Hepatomzellen. HNF-4 α wurde bei der Stimulation der SeP-Promotoraktivität durch das Protein PGC-1 α koaktiviert, das als ein weiterer Faktor der transkriptionellen Regulation von SeP identifiziert wurde. In Hepatomzellen mit hoher endogener HNF-4 α -Expression wurde der SeP-Promotor durch Überexpression von PGC-1 α aktiviert. In einer Neuroblastom-Zelllinie mit minimaler Expression von SeP und HNF-4 α resultierte die Überexpression von PGC-1 α zusammen mit HNF-4 α in der Aktivierung des SeP-Promotors. Eine maximale Aktivierung des SeP-Promotors wurde durch die Überexpression von PGC-1 α und HNF-4 α in Kombination mit dem Transkriptionsfaktor FoxO1a erreicht, der über eine in der Nähe der HNF-4 α -Bindestelle gelegene Zielsequenz mit dem SeP-Promotor interagiert. Durch Inaktivierung der benachbarten Bindestellen von HNF-4 α und FoxO1a einzeln und in Kombination wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Regulation der Promotoraktivität von SeP durch die Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren mit dem Koaktivator PGC-1 α erfolgt. In primären Hepatocyten der Ratte bewirkte die Stimulation der endogenen PGC-1 α -Expression durch das Glucocorticoid Dexamethason und einen Aktivator der Adenylatcyclase, Forskolin, eine Steigerung der Transkription und Sekretion von SeP. Die glucocorticoid-induzierte Biosynthese von SeP wurde durch Insulin reprimiert. In Kontrollexperimenten wurde eine analoge Regulation der Glucose-6-phosphatase (G6Pase), eines Schlüsselenzyms der Gluconeogenese, beobachtet. Die Modulation der hepatischen Biosynthese von SeP durch Hormone des Kohlenhydratstoffwechsels via PGC-1 α weist somit

auf eine Wechselwirkung des Selen- und des Kohlenhydratstoffwechsels hin. In diesem Zusammenhang wurde Glucose als Stimulator der SeP-Biosynthese in Hepatocyten identifiziert. Die Kultivierung von Hepatocyten in Medium mit erhöhter Glucosekonzentration (25 mM vs. 11 mM) resultierte in einer verstärkten Transkription und Sekretion von SeP, was wiederum von einer erhöhten Expression der G6Pase und von PGC-1 α begleitet wurde. Hyperglykämie bei Patienten mit Typ 2 Diabetes kann mit dem Medikament Metformin behandelt werden, das u.a. eine Verringerung der Glucoseproduktion in der Leber bewirkt. Die Inkubation von Hepatocyten mit Metformin bewirkte neben einer Inhibierung der Expression der G6Pase auch eine dosisabhängige Unterdrückung der durch Glucose sowie der durch Dexamethason stimulierten SeP-Biosynthese. Im Unterschied zu Insulin verursachte Metformin neben dem Effekt auf die mRNA-Expression von SeP auch dessen Inhibierung durch einen posttranskriptionellen Mechanismus. So zeigte sich, dass durch Metforminbehandlung von Hepatocyten die mRNA-Expression eines für die Translation von Selenoproteinen essentiellen Enzyms, der Selenophosphatsynthetase-2 (SPS-2), inhibiert wird.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit resultierten in einem detaillierten Modell der Regulation der Biosynthese von SeP. Das Modell ist dazu geeignet, die Ursachen gewebespezifischer Unterschiede der SeP-Expression zu verstehen ebenso wie eine Modulation der Biosynthese von SeP durch hormonelle Stimuli (e.g. Glucocorticoide, cAMP-Induktoren, Insulin) erklärt werden kann. Die Regulation des Selentransporters SeP durch Hormone des Kohlenhydratstoffwechsels und durch Glucose selbst kennzeichnet einen physiologischen Zusammenhang des Kohlenhydratstoffwechsels und der Selenhomöostase. Auf Grundlage dieses *in vitro* Modells kann die in klinischen Studien beobachtete Korrelation des Serumselengehaltes und der Plasmaglukosekonzentration erklärt werden. Weiterhin wurde erstmals gezeigt, dass das Antidiabetikum Metformin die Expression der Selenoproteine SeP und SPS-2 vermindert. Demzufolge wird ein erweitertes Spektrum der metabolischen Wirkungen von Metformin durch Beeinflussung der Selenhomöostase postuliert, was eine Verringerung erhöhter Selenspiegel zur Folge hätte, die gegenwärtig als Risikofaktor des Typ 2 Diabetes diskutiert werden.

7 Literaturverzeichnis

Adamson AW, Suchankova G, Rufo K, Nakamura MT, Teran-Garcia M, Clarke SD, Gettys TW (2006). Hepatocyte nuclear factor-4 α contributes to carbohydrate-induced transcriptional activation of hepatic fatty acid synthase. *Biochem. J.* 399 (2), 285-95.

Akesson B, Bellew T, Burk RF (1994). Purification of selenoprotein P from human plasma. *Biochim. Biophys. Acta* 1204 (2), 243-49.

Alfthan G, Neve J (1996). Reference values for serum selenium in various areas-evaluated according to the TRACY protocol. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 10 (2), 77-87.

Anderson MJ, Viars CS, Czekay S, Cavenee WK, Arden KC (1998). Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily. *Genomics* 47 (2), 187-99.

Argaud D, Roth H, Wiernsperger N, Leverve XM (1993). Metformin decreases gluconeogenesis by enhancing the pyruvate kinase flux in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 213 (3), 1341-18.

Argaud D, Kirby TL, Newgard CB, Lange AJ (1997). Stimulation of Glucose-6-phosphate gene expression by glucose and Fructose-2,6-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 272 (19), 12854-61.

Arteel GE, Mostert V, Oubrahim H, Briviba K, Abel J, Sies H (1998). Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration. *Biol. Chem.* 379 (8-9), 1201-05.

Arteel GE, Franken S, Kappler J, Sies H (2000). Binding of selenoprotein P to heparin: characterization with surface plasmon resonance. *Biol. Chem.* 381 (3), 265-68.

Becker DJ, Reul B, Ozcelikay AT, Buchet JP, Henquin JC, Brichard SM (1996). Oral selenate improves glucose homeostasis and partly reverses abnormal expression of liver glycolytic and gluconeogenic enzymes in diabetic rats. *Diabetologia* 39 (1), 3– 11.

Bleys J, Navas-Acien A, Guallar E (2007). Serum selenium and diabetes in U.S. adults. *Diabetes Care*. 30 (4), 829-34.

Bleys J, Navas-Acien A, Guallar E (2008). Serum selenium levels and all-cause, cancer, and cardiovascular mortality among US adults. *Arch. Intern. Med.* 168 (4), 404-10.

Blot WJ, Li JY, Taylor PR, Guo W, Dawsey S, Wang GQ, Yang CS, Zheng SF, Gail M, Li GY, et al. (1993). Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J. Natl. Cancer Inst.* 85 (18), 1483-92.

Bösl MR, Takaku K, Oshima M, Nishimura S, Taketo MM (1997). Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (*Trsp*). *PNAS* 94 (11), 5531-34.

Bosschaerts T, Guillemins M, Noel W, Hérin M, Burk RF, Hill KE, Brys L, Raes G, Ghassabeh GH, Baetselier de P, Beschin A (2008). Alternatively activated myeloid cells limit pathogenicity associated with african trypanosomiasis through the IL-10 inducible gene selenoprotein P. *J. Immunol.* 180 (9), 6168-75.

Brigelius-Flohé R (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic. Biol. Med.* 27 (9-10), 951-65.

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 96 (6), 857-68.

Budiman ME, Bubenik JL, Miniard AC, Middleton LM, Gerber CA, Cash A, Driscoll DM (2009). Eukaryotic initiation factor 4a3 is a selenium-regulated RNA-binding protein that selectively inhibits selenocysteine incorporation. *Mol. Cell*. 35 (4), 479-89.

Burk RF, Hill KE (1994). Selenoprotein P. A selenium-rich extracellular glycoprotein. *J. Nutr.* 124 (10), 1891-97.

Burk RF, Hill KE, Awad JA, Morrow JD, Kato T, Cockell KA, Lyons PR (1995). Pathogenesis of diquat-induced liver necrosis in selenium-deficient rats: assessment of the roles of lipid peroxidation and selenoprotein P. *Hepatology* 21 (2), 561-69.

Burk RF, Hill KE, Boeglin ME, Ebner FF, Chittum HS (1997). Selenoprotein P associates with endothelial cells in rat tissues. *Histochem. Cell. Biol.* 108 (1), 11-15.

Burk RF, Hill KE (2005). Selenoprotein P: An extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Ann. Rev. Nutr.* 25, 215-35.

Burk RF, Norsworthy BK, Hill KE, Motley AK, Byrne DW (2006a). Effects of chemical form of selenium on plasma biomarkers in a high-dose human supplementation trial. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15 (4), 804-10.

Burk RF, Hill KE, Motley AK, Austin LM, Norsworthy BK (2006b). Deletion of selenoprotein P upregulates urinary selenium excretion and depresses whole-body selenium content. *Biochim. Biophys. Acta* 1760 (12), 1789-93.

Burk RF, Hill KE, Olson GE, Weeber EJ, Motley AK, Winfrey VP, Austin LM (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. *J. Neuroscience* 27 (23), 6207-11.

Carlson BA, Novoselov SV, Kumaraswamy E, Lee BJ, Anver MR, Gladyshev VN, Hatfield DL (2004). Specific excision of the selenocysteine tRNA[Ser]Sec (Trsp) gene in mouse liver demonstrates an essential role of selenoproteins in liver function. *J. Biol. Chem.* 279 (9), 8011-17.

Carlson BA, Xu XM, Kryukov GV, Rao M, Berry MJ, Gladyshev VN, Hatfield DL (2004). Identification and characterization of phosphoseryl-tRNA[Ser]Sec kinase. PNAS 101 (35), 12848–53.

Carlson BA, Xu XM, Gladyshev VN, Hatfield DL (2005). Selective rescue of selenoprotein expression in mice lacking a highly specialized methyl group in selenocysteine tRNA. J. Biol. Chem. 280 (7), 5542-48.

Chambers I, Frampton J, Goldfarb P, Affara N, McBain W, Harrison PR (1986). The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. EMBO J. 5 (6), 1221-27.

Chavatte L, Brown BA, Driscoll DM (2005). Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes. Nat. Struct. Mol. Biol. 12 (5), 408–16.

Cheng YY, Qian PC (1990). The effect of selenium-fortified table salt in the prevention of Keshan disease on a population of 1.05 million. Biomed. Environ. Sci. 3 (4), 422-28.

Clark LC, Combs GF Jr, Turnbull BW, Slate EH, Chalker DK, Chow J, Davis LS, Glover RA, Graham GF, Gross EG, Krongrad A, Leshner JL Jr, Park HK, Sanders BB Jr, Smith CL, Taylor JR (1996). Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. JAMA 276 (24), 1957-63.

Cleasby ME, Dzamko N, Hegarty BD, Cooney GJ, Kraegen EW, Ye JM (2004). Metformin prevents the development of acute lipid-induced insulin resistance in the rat through altered hepatic signaling mechanisms. Diabetes. 53 (12), 3258-66.

Combs GF Jr (2001). Selenium in global food systems. Br. J. Nutr. 85 (5), 517-47.

Cser A, Sziklai-László I, Menzel H, Lombeck I (1993). Selenium status and lipoproteins in healthy and diabetic children. J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis. 7 (4), 205-10.

Czernichow S, Couthouis A, Bertrais S, Vergnaud AC, Dauchet L, Galan P, Hercberg S (2006). Antioxidant supplementation does not affect fasting plasma glucose in the supplementation with Antioxidant Vitamins and Minerals (SU.VI.MAX) study in France: association with dietary intake and plasma concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.* 84 (2), 395-99.

Daitoku H, Yamagata K, Matsuzaki H, Hatta M, Fukamizu A (2003). Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR. *Diabetes* 52 (3), 642-49.

Davidson MB, Peters AL (1997). An overview of metformin in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Med.* 102 (1), 99-110.

Dentin R, Liu Y, Koo SH, Hedrick S, Vargas T, Heredia J, Yates J 3rd, Montminy M (2007). Insulin modulates gluconeogenesis by inhibition of the coactivator TORC2. *Nature*. 449 (7160), 366-69.

Dentin R, Hedrick S, Xie J, Yates J 3rd, Montminy M (2008). Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRTC2. *Science*. 319 (5868), 1402-5.

Diamond AM, Choi IS, Crain PF, Hashizume T, Pomerantz SC, Cruz R, Steer CJ, Hill KE, Burk RF, McCloskey JA (1993). Dietary selenium affects methylation of the wobble nucleoside in the anticodon of selenocysteine tRNA([Ser]Sec). *J. Biol. Chem.* 268 (19), 14215-23.

Dong F, Fang CX, Yang X, Zhang X, Lopez FL, Ren J (2006). Cardiac overexpression of catalase rescues cardiac contractile dysfunction induced by insulin resistance: Role of oxidative stress, protein carbonyl formation and insulin sensitivity. *Diabetologia* 49 (6), 1421-33.

Dreher I, Jakobs TC, Köhrle J (1997a). Cloning and characterization of the human selenoprotein P promoter. *J. Biol. Chem.* 272 (46), 29364-71.

Dreher I, Schmutzler C, Jakob F, Köhrle J (1997b). Expression of selenoproteins in various rat and human tissues and cell lines. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 11 (2), 83-91.

Drewes T, Senkel S, Holewa B, Ryffel GU (1996). Human hepatocyte nuclear factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes. *Mol. Cell. Biol.* 16 (3), 925-31.

Duffield AJ, Thomson CD, Hill KE, Williams S (1999). An estimation of selenium requirements for New Zealanders. *Am. J. Clin. Nutr.* 70 (5), 896-903.

Dumitrescu AM, Liao X-H, Abdullah MSY, Lado-Abeal J, Majed FA, Moeller LC, Boran G, Schomburg L, Weiss RE, Refetoff S (2005). Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism. *Nature Genetics* 37 (11), 1247-52.

Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, Normandin D, Cheng A, Himms-Hagen J, Chan CC, Ramachandran C, Gresser MJ et al. (1999). Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science*. 283 (5407), 1544-48.

Erbayraktar Z, Yilmaz O, Artmann AT, Cehreli R, Coker C (2007). Effects of selenium supplementation on antioxidant defense and glucose homeostasis in experimental diabetes mellitus. *Biol. Trace Elem. Res.* 118 (3), 217-26.

Esaki N, Nakamura T, Tanaka H, Soda K (1982). Selenocysteine lyase, a novel enzyme that specifically acts on selenocysteine. *J. Biol. Chem* 257 (8), 4386-91.

Ezaki O (1990). The insulin-like effects of selenate in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 265 (2), 1124-28.

Fagegaltier D, Hubert N, Yamada K, Mizutani T, Carbon P, Krol A (2000). Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation. *EMBO J.* 19 (17), 4796–4805.

Finck BN, Kelly DP (2006). PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J. Clin. Invest.* 116 (3), 615–22.

Flohé L, Günzler WA, Schock HH (1973). Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Letters* 32 (1), 132-34.

Fukushima K, Ogawa H, Takahashi K, Naito H, Funayama Y, Kitayama T, Yonezawa H, Sasaki I (2003). Non-pathogenic bacteria modulate colonic epithelial gene expression in germ-free mice. *Scand. J. Gastroenterol.* 38 (6), 626-34.

Fulgencio JP, Kohl C, Girard J, Pégorier JP (2001). Effect of metformin on fatty acid and glucose metabolism in freshly isolated hepatocytes and on specific gene expression in cultured hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 62 (4), 439-46.

Furuyama T, Nakazawa T, Nakano I, Mori N (2000). Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem. J.* 349 (Pt 2), 629–634.

Ganther HE (1999). Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis* 20 (9), 1657-66.

Gao Y, Feng HC, Walder K, Bolton K, Sunderland T, Bishara N, Quick M, Kantham L, Collier GR (2004). Regulation of the selenoprotein SelS by glucose deprivation and endoplasmic reticulum stress - SelS is a novel glucose-regulated protein. *FEBS Lett.* 563 (1-3), 185-90.

Goldstein BJ, Mahadev K, Wu X, Zhu L, Motoshima H (2005). Role of insulin-induced reactive oxygen species in the insulin signaling pathway. *Antioxid. Redox Signal.* 7 (7-8), 1021-31.

Gonzalez FJ (2008). Regulation of hepatocyte nuclear factor 4 α -mediated transcription. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 23 (1), 2–7.

Greer EL, Brunet A (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 24 (50), 7410-25.

Grigo K, Wirsing A, Lucas B, Klein-Hitpass L, Ryffel GU (2008). HNF4 alpha orchestrates a set of 14 genes to down-regulate cell proliferation in kidney cells. *Biol. Chem.* 389 (2), 179-87.

Gromadzinska J, Reszka E, Bruzelius K, Wasowicz W, Akesson B (2008). Selenium and cancer: biomarkers of selenium status and molecular action of selenium supplements. *Eur. J. Nutr.* 47 (Suppl. 2), 29-50.

Gromer S, Eubel JK, Lee BL, Jacob J (2005). Human selenoproteins at a glance. *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (21), 2414-37.

Gunton JE, Delhanty PJ, Takahashi S, Baxter RC (2003). Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88 (3), 1323-32.

Guo S, Rena G, Cichy S, He X, Cohen P, Unterman T (1999). Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence. *J Biol. Chem.* 274 (24), 17184-92.

Guo H, Gao C, Mi Z, Zhang J, Kuo PC (2007). Characterization of the PC4 binding domain and its interactions with HNF4alpha. *J. Biochem.* 141 (5), 635-40.

Hadzopoulou-Cladaras M, Kistanova E, Evagelopoulou C, Zeng S, Cladaras C, Ladas JA (1997). Functional domains of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4. *J. Biol. Chem.* 272 (1), 539-50.

Hart GW, Housley MP, Slawson C (2007). Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature.* 446 (7139), 1017-22.

Hatfield DL, Gladyshev VN (2002). How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol. Cell. Biol.* 22 (11), 3565-76.

Hayhurst GP, Lee YH, Lambert G, Ward JM, Gonzalez FJ (2001). Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol. Cell. Biol.* 21 (4), 1393–1403.

Herrman JL (1977). The properties of a rat serum protein labelled by the injection of sodium selenite. *Biochim. Biophys. Acta* 500 (1), 61-70.

Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Schutz G, Yoon C, Puigserver P, Spiegelman B, Montminy M (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature*. 413 (6852), 179-83.

Hill KE, Lyons PR, Burk RF (1992). Differential regulation of rat liver selenoprotein mRNAs in selenium deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185 (1), 260-3.

Hill KE, Zhou J, McMahan WJ, Motley AK, Atkins JF, Gesteland RF, Burk RF (2003). Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse. *J. Biol. Chem.* 278 (16), 13640-46.

Hill KE, Zhou J, McMahan WJ, Motley AK, Burk RF (2004). Neurological dysfunction occurs in mice with targeted deletion of the selenoprotein P gene. *J. Nutr.* 134 (1), 157-61.

Himeno S, Chittum HS, Burk RF (1996). Isoforms of selenoprotein P in rat plasma. Evidence for a full-length form and another form that terminates at the second UGA in the open reading frame. *J. Biol. Chem.* 271 (26), 15769-75.

Hirota K, Daitoku H, Matsuzaki H, Araya N, Yamagata K, Asada S, Sugaya T, Fukamizu A (2003). Hepatocyte nuclear factor-4 is a novel downstream target of insulin via FKHR as a signal-regulated transcriptional inhibitor. *J. Biol. Chem.* 278 (15), 13056-60.

Hirota K, Sakamaki J, Ishida J, Shimamoto Y, Nishihara S, Kodama N, Ohta K, Yamamoto M, Tanimoto K, Fukamizu A (2008). A combination of HNF-4 and Foxo1 is required for reciprocal transcriptional regulation of glucokinase and glucose-6-phosphatase genes in response to fasting and feeding. *J. Biol. Chem.* 283 (47), 32432-41.

Hoffmann PR, Höge SC, Li PA, Hoffmann FW, Hashimoto AC, Berry MJ (2007). The selenoproteome exhibits widely varying, tissue-specific dependence on selenoprotein P for selenium supply. *Nucleic Acids Res.* 35 (12), 3963-73.

Holloway MG, Miles GD, Dombkowski AA, Waxman DJ (2008). Liver-specific hepatocyte nuclear factor-4alpha deficiency: greater impact on gene expression in male than in female mouse liver. *Mol. Endocrinol.* 22 (5), 1274-86.

Hondal RJ, Ma S, Caprioli RM, Hill KE, Burk RF (2001). Heparin-binding histidine and lysine residues of rat selenoprotein P. *J. Biol. Chem.* 276 (19), 15823-31.

Housley MP, Rodgers JT, Udeshi ND, Kelly TJ, Shabanowitz J, Hunt DF, Puigserver P, Hart GW (2008). O-GlcNAc regulates FoxO activation in response to glucose. *J. Biol. Chem.* 283 (24), 16283-92.

Hundal HS, Ramlal T, Reyes R, Leiter LA, Klip A (1992). Cellular mechanism of metformin action involves glucose transporter translocation from an intracellular pool to the plasma membrane in L6 muscle cells. *Endocrinology.* 131 (3), 1165-73.

Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, Inzucchi SE, Schumann WC, Petersen KF, Landau BR, Shulman GI (2000). Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes.* 49 (12), 2063-69.

Inoue Y, Hayhurst GP, Inoue J, Mori M, Gonzalez FJ (2002). Defective ureagenesis in mice carrying a liver-specific disruption of hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha). HNF4alpha regulates ornithine transcarbamylase in vivo. *J. Biol. Chem.* 277 (28), 25257-65.

Inoue Y, Peters LL, Yim SH, Inoue J, Gonzalez FJ (2006). Role of hepatocyte nuclear factor 4alpha in control of blood coagulation factor gene expression. *J Mol. Med.* 84 (4), 334-44.

Ip C (1998). Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. *J. Nutr.* 128 (11), 1845-54.

Jacobs FM, van der Heide LP, Wijchers PJ, Burbach JP, Hoekman MF, Smidt MP (2003). FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *J. Biol. Chem.* 278 (38), 35959–35967.

Jiang S, Tanaka T, Iwanari H, Hotta H, Yamashita H, Kumakura J, Watanabe Y, Uchiyama Y, Aburatani H, Hamakubo T, Kodama T, Naito M. (2003). Expression and localization of P1 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4alpha (HNF4alpha) isoforms in human and rats. *Nucl Recept.* 1 (1), 5.

Johansson L, Gafvelin G, Arnér ESJ (2005). Selenocysteine in proteins—properties and biotechnological use. *Biochim. Biophys. Acta* 1726 (1), 1-13.

Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE (2000). Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev.* 14 (2), 142-146.

Kajander EO, Harvima RJ, Eloranta TO, Martikainen H, Kantola M, Kärenlampi SO, Akerman K (1991). Metabolism, cellular actions, and cytotoxicity of selenomethionine in cultured cells. *Biol. Trace Elem. Res.* 28 (1), 57-68.

Kamiya A, Inoue Y, Gonzalez FJ (2003). Role of the hepatocyte nuclear factor 4alpha in control of the pregnane X receptor during fetal liver development. *Hepatology* 37 (6), 1375-84.

Kel AE, Niehof M, Matys V, Zemlin R, Borlak J (2008). Genome wide prediction of HNF4alpha functional binding sites by the use of local and global sequence context. *Genome Biol.* 9 (2), R36.

Knowles BB, Howe CC, Aden DP (1980). Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science.* 209 (4455), 497-99.

Knutti D, Kaul A, Kralli A (2000). A tissue-specific coactivator of steroid receptors, identified in a functional genetic screen. *Mol. Cell. Biol.* 20 (7), 2411-22.

Koo SH, Flechner L, Qi L, Zhang X, Sreaton RA, Jeffries S, Hedrick S, Xu W, Boussouar F, Brindle P, Takemori H, Montminy M (2005). The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature*. 437 (7062), 1109-11.

Kozka IJ, Holman GD (1993). Metformin blocks downregulation of cell surface GLUT4 caused by chronic insulin treatment of rat adipocytes. *Diabetes*. 42 (8), 1159-65.

Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehab O, Guigo R, Gladyshev VN (2003). Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 300 (5624), 1439-43.

Kuo CJ, Conley PB, Chen L, Sladek FM, Darnell JE Jr, Crabtree GR (1992). A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification. *Nature* 355 (6359), 457-61.

Laclaustra M, Navas-Acien A, Stranges S, Ordovas JM, Guallar E (2009). Serum selenium concentrations and diabetes in U.S. adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2004. *Environ. Health Perspect.* 117 (9), 1409-13.

Leclerc I, Lenzner C, Gourdon L, Vaulont S, Kahn A, Viollet B (2001). Hepatocyte nuclear factor-4alpha involved in type 1 maturity-onset diabetes of the young is a novel target of AMP-activated protein kinase. *Diabetes*. 50 (7), 1515-21.

Li J, Ning G, Duncan SA (2000). Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4 α . *Genes Dev.* 14 (4), 464-74.

Li X, Monks B, Ge Q, Birnbaum MJ (2007). Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1alpha transcription coactivator. *Nature* 447 (7147), 1012-16.

Lippman SM, Klein EA, Goodman PJ, Lucia MS, Thompson IM, Ford LG, Parnes HL, Minasian LM, Gaziano JM, Hartline JA et al. (2009). Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA* 301 (1), 39-51.

Liu Y, Dentin R, Chen D, Hedrick S, Ravnskjaer K, Schenk S, Milne J, Meyers DJ, Cole P, Yates J 3rd, Olefsky J, Guarente L, Montminy M (2008). A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange. *Nature* 456 (7219), 269-73.

Ma S, Hill KE, Caprioli RM, Burk RF (2002). Mass spectrometric characterization of full-length rat selenoprotein P and three isoforms shortened at the C terminus. Evidence that three UGA codons in the mRNA open reading frame have alternative functions of specifying selenocysteine insertion or translation termination. *J. Biol. Chem.* 277 (15), 12749-54.

Ma S, Hill KE, Burk RF, Caprioli RM (2003). Mass spectrometric identification of N- and O-glycosylation sites of full-length rat selenoprotein P and determination of selenide–sulfide and disulfide linkages in the shortest isoform. *Biochemistry* 42 (32), 9703-11.

Mahadev K, Motoshima H, Wu X, Ruddy JM, Arnold RS, Cheng G, Lambeth JD, Goldstein BJ (2004). The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* 24 (5), 1844-54.

Makita T, Hernandez-Hoyos G, Chen TH, Wu H, Rothenberg EV, Sucov HM (2001). A developmental transition in definitive erythropoiesis: erythropoietin expression is sequentially regulated by retinoic acid receptors and HNF4. *Genes Dev.* 15 (7), 889-901.

Maquat LE (2001). Evidence that selenium deficiency results in the cytoplasmic decay of GPx1 mRNA dependent on pre-mRNA splicing proteins bound to the mRNA exon-exon junction. *Biofactors* 14 (1-4), 37-42.

Martínez-Jiménez CP, Gómez-Lechón MJ, Castell JV, Jover R (2006). Underexpressed coactivators PGC1 α and SRC1 impair hepatocyte nuclear factor 4 α function and promote dedifferentiation in human hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* 281 (40), 29840-49.

Massillon D, Barzilai N, Chen W, Hu M, Rossetti L (1996). Glucose regulates in vivo glucose-6-phosphatase gene expression in the liver of diabetic rats. *J. Biol. Chem.* 271 (17), 9871-74.

- Matsumoto M, Pocai A, Rossetti L, Depinho RA, Accili D (2007). Impaired regulation of hepatic glucose production in mice lacking the forkhead transcription factor Foxo1 in liver. *Cell. Metab.* 6 (3), 208-16.
- McClung JP, Roneker CA, Mu W, Lisk DJ, Langlais P, Liu F, Lei XG (2004). Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101 (24), 8852-57.
- Menon V, Ram M, Dorn J, Armstrong D, Muti P, Freudenheim JL, Browne R, Schunemann H, Trevisan M (2004). Oxidative stress and glucose levels in a population-based sample. *Diabet. Med.* 21 (12), 1346-52.
- Méplan C, Crosley LK, Nicol F, Beckett GJ, Howie AF, Hill KE, Horgan G, Mathers JC, Arthur JR, Hesketh JE (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 J.* 21 (12), 3063-74.
- Méplan C, Nicol F, Burtle B, Crosley L, Arthur J, Mathers J, Hesketh J (2009). Relative abundance of selenoprotein P isoforms in human plasma depends on genotype, Se intake, and cancer status. *Antioxid. Redox Signal.* PMID: 19453253
- Misu H, Takamura T, Matsuzawa N, Shimizu A, Ota T, Sakurai M, Ando H, Arai K, Yamashita T, Honda M, Yamashita T, Kaneko S (2007). Genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately upregulated with fasting hyperglycaemia in livers of patients with type 2 diabetes. *Diabetologia.* 50 (2), 268-77.
- Monsalve M, Wu Z, Adelmant G, Puigserver P, Fan M, Spiegelman BM (2000). Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol Cell.* 6(2), 307-16.
- Mostert V, Lombeck I, Abel J (1998). A novel method for the purification of selenoprotein P from human plasma. *Arch. Biochem. Biophys.* 357 (2), 326-30.

Mostert V, Wolff S, Dreher I, Köhrle J, Abel J (2001). Identification of an element within the promoter of human selenoprotein P responsive to transforming growth factor- β . *Eur. J. Biochem.* 268 (23), 6176–81.

Motsenbocker MA, Tappel AL (1982). A selenocysteine-containing selenium-transport protein in rat plasma. *Biochim. Biophys. Acta* 719 (1), 147-53.

Mounier C, Posner BI (2006). Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84 (7), 713-24.

Müller AS, Pallauf J, Rafael J (2003). The chemical form of selenium affects insulinomimetic properties of the trace element: investigations in type II diabetic db/db mice. *J. Nutr. Biochem.* 14 (11), 637-47.

Müller AS, Pallauf J (2006). Compendium of the antidiabetic effects of supranutritional selenate doses. In vivo and in vitro investigations with type II diabetic db/db mice. *J. Nutr. Biochem.* 17 (8), 548-60.

Müller AS, Bosse AC, Most E, Kломann SD, Schneider S, Pallauf J (2008). Regulation of the insulin antagonistic protein tyrosine phosphatase 1B by dietary Se studied in growing rats. *J. Nutr. Biochem.* 20 (4), 235-47.

Murawaki Y, Tsuchiya H, Kanbe T, Harada K, Yashima K, Nozaka K, Tanida O, Kohno M, Mukoyama T, Nishimuki E, Kojo H, Matura T et al. (2008). Aberrant expression of selenoproteins in the progression of colorectal cancer. *Cancer Lett.* 259 (2), 218-30.

Nasim MT, Jaenecke S, Belduz A, Kollmus H, Flohe L, McCarthy JE (2000). Eukaryotic selenocysteine incorporation follows a nonprocessive mechanism that competes with translational termination. *J. Biol. Chem.* 275 (20), 14846–52.

Nishimura M, Koeda A, Suzuki E, Shimizu T, Kawano Y, Nakayama M, Satoh T, Narimatsu S, Naito S (2006). Effects of prototypical drug-metabolizing enzyme inducers on mRNA expression of housekeeping genes in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 346 (3), 1033-39.

Niwa H, Harrison LC, DeAizpurua HJ, Cram DS (1997). Identification of pancreatic beta cell-related genes by representational difference analysis. *Endocrinology* 138 (4), 1419-26.

Oberkofler H, Schraml E, Krempler F, Patsch W (2004). Restoration of sterol-regulatory-element-binding protein-1c gene expression in HepG2 cells by peroxisome-proliferator-activated receptor- γ co-activator-1 α . *Biochem. J.* 381 (Pt 2), 357–63.

Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, Bell GW, Rinaldi NJ, Murray HL, Volkert TL, Schreiber J, Rolfe PA, Gifford DK, Fraenkel E, Bell GI, Young RA (2004). Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 303 (5662), 1378-81.

Olson GE, Winfrey VP, Nagdas SK, Hill KE, Burk RF (2005). Selenoprotein P is required for mouse sperm development. *Biol. Reprod.* 73 (1), 201-11.

Olson GE, Winfrey VP, Nagdas SK, Hill KE, Burk RF (2007). Apolipoprotein E Receptor-2 (ApoER2) mediates selenium uptake from selenoprotein P by the mouse testis. *J. Biol. Chem* 282 (16), 12290-97.

Olson GE, Winfrey VP, Hill KE, Burk RF (2008). Megalin mediates selenoprotein P uptake by kidney proximal epithelial cells. *J. Biol. Chem* 283 (11), 6854-60.

Papp VL, Lu J, Holmgren A, Khanna KK (2007). From selenium to selenoproteins: synthesis, identity and their role in human health. *Antiox. Redox Sig.* 9 (7), 775-806.

Pavlović D, Kocić R, Kocić G, Jevtović T, Radenković S, Mikić D, Stojanović M, Djordjević PB (2000). Effect of four-week metformin treatment on plasma and erythrocyte antioxidative defense enzymes in newly diagnosed obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* 2 (4), 251-16.

Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell.* 92 (6), 829-39.

Puigserver P, Adelmant G, Wu Z, Fan M, Xu J, O'Malley B, Spiegelman BM (1999). Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science*. 286 (5443), 1368-71.

Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM (2003). Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* 423 (6939), 550-55.

Rayman MP (2004). The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up? *Br. J. Nutr.* 92 (4), 557-73.

Rayman MP (2008). Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. *Brit. J. Nutr.* 100 (2), 254-68.

Rayman MP (2009). Selenoproteins and human health: Insights from epidemiologic data. *Biochim. Biophys. Acta*, doi:10.1016/j.bbagen.2009.03.014.

Reeves MA, Hoffmann PR (2009). The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (15), 2457-78.

Renko K, Hofmann PJ, Stodter M, Hollenbach B, Behrends T, Köhrle J, Schweizer U, Schomburg L (2009). Down-regulation of the hepatic selenoprotein biosynthesis machinery impairs selenium metabolism during the acute phase response in mice. *FASEB J.* 23, doi: 10.1096/fj.08-119370

Rhee J, Inoue Y, Yoon JC, Puigserver P, Fan M, Gonzalez FJ, Spiegelman BM (2003). Regulation of hepatic fasting response by PPARgamma coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis. *PNAS USA* 100 (7), 4012-17.

Richardson DR (2005). More roles for selenoprotein P: local selenium storage and recycling protein in the brain. *Biochem. J.* 386 (pt. 2), e5-7.

Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klöting N, Birringer M, Kiehntopf M, Stumvoll M, Kahn CR, Blüher M (2009). Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106 (21), 8665-70.

Rodgers JT, Puigserver P (2007). Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 104 (31), 12861-66.

Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179 (73), 588-90.

Saeedi R, Parsons HL, Wambolt RB, Paulson K, Sharma V, Dyck JR, Brownsey RW, Allard MF (2008). Metabolic actions of metformin in the heart can occur by AMPK-independent mechanisms. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294 (6), H2497-506.

Saito Y, Hayashi T, Tanaka A, Watanabe Y, Suzuki M, Saito E, Takahashi K (1999). Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 274 (5), 2866-71.

Saito Y, Takahashi K (2002). Characterization of selenoprotein P as a selenium supply protein. *Eur. J. Biochem.* 269 (22), 5746-51.

Saito Y, Sato N, Hirashima M, Takebe G, Nagasawa S, Takahashi K (2004). Domain structure of bi-functional selenoprotein P. *Biochem. J.* 381 (Pt 3), 841-46.

Saltiel AR, Kahn CR (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 414 (6865), 799-806.

Sasakura C, Suzuki KT (1998). Biological interaction between transition metals (Ag, Cd and Hg), selenide/sulfide and selenoprotein P. *J. Inorg. Chem.* 71 (3-4), 159-62.

Scarpulla RC (2002). Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1576 (1-2), 1-14.

Schilling MM, Oeser JK, Boustead JN, Flemming BP, O'Brien RM (2006). Gluconeogenesis: re-evaluating the FOXO1-PGC-1alpha connection. *Nature* 443 (7111), E10-1.

Schmoll D, Wasner C, Hinds CJ, Allan BB, Walther R, Burchell A (1999). Identification of a cAMP response element within the glucose- 6-phosphatase hydrolytic subunit gene promoter which is involved in the transcriptional regulation by cAMP and glucocorticoids in H4IIE hepatoma cells. *Biochem. J.* 338 (Pt 2), 457-63.

Schmoll D, Walker KS, Alessi DR, Grempler R, Burchell A, Guo S, Walther R, Unterman TG (2000). Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase Balpha and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. *J. Biol. Chem.* 275 (46), 36324-33.

Schomburg L, Schweizer U, Holtmann B, Flohé L, Sendtner M, Köhrle J (2003). Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *Biochem. J.* 370 (Pt 2), 397-402.

Schrauzer GN, White DA, Schneider CJ (1977). Cancer mortality correlation studies--III: statistical associations with dietary selenium intakes. *Bioinorg. Chem.* 7 (1), 23-31.

Schwarz K, Foltz CM (1957). Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J. Am. Chem. Soc.* 79 (12), 3292-93.

Schwarz K, Foltz CM (1958). Factor 3 activity of selenium compounds. *J. Biol. Chem.* 233 (1), 245-51.

Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, Montminy M, Cantley LC (2005). The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of Metformin. *Science*. 310 (5754), 1642-26.

Shimizu K, Ikegami-Kawai M, Takahashi T (2009). Increased oxidized protein hydrolase activity in serum and urine of diabetic rat models. *Biol. Pharm. Bull.* 32 (9), 1632-25.

Shu Y, Sheardown SA, Brown C, Owen RP, Zhang S, Castro RA, Ianculescu AG, Yue L, Lo JC, Burchard EG, Brett CM, Giacomini KM (2007). Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J Clin Invest.* 117 (5), 1422-31.

Sladek FM, Zhong WM, Lai E, Darnell JE Jr. (1990). Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev.* 4 (12B), 2353-65.

Small-Howard A, Morozova N, Stoytcheva Z, Forry EP, Mansell JB, Harney JW, Carlson BA, Xu XM, Hatfield DL, Berry MJ (2006). Supramolecular complexes mediate selenocysteine incorporation in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 26 (6), 2337–46.

Speckmann B, Walter PL, Alili L, Reinehr R, Sies H, Klotz LO, Steinbrenner H (2008). Selenoprotein P expression is controlled through interaction of the coactivator PGC-1alpha with FoxO1a and hepatocyte nuclear factor 4alpha transcription factors. *Hepatology* 48 (6), 1998-2006.

Speckmann B, Sies H, Steinbrenner H (2009). Attenuation of hepatic expression and secretion of selenoprotein P by metformin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387 (1), 158-63.

Squires JE, Stoytchev I, Forry EP, Berry MJ (2007). SBP2 binding affinity is a major determinant in differential selenoprotein mRNA translation and sensitivity to nonsense-mediated decay. *Mol Cell Biol.* 27 (22), 7848-55.

Steinbrenner H, Alili L, Bilgic E, Sies H, Brenneisen P (2006a). Involvement of selenoprotein P in protection of human astrocytes from oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med.* 40 (9), 1513-23.

Steinbrenner H, Bilgic E, Alili L, Sies H, Brenneisen P (2006b). Selenoprotein P protects endothelial cells from oxidative damage by stimulation of glutathione peroxidase expression and activity. *Free Radic. Res.* 40 (9), 936-43.

Steinbrenner H, Alili L, Stuhlmann D, Sies H, Brenneisen P (2007). Post-translational processing of selenoprotein P: implications of glycosylation for its utilisation by target cells. *Biol. Chem.* 388 (10), 1043-51.

Steinbrenner H, Sies H (2009). Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* doi:10.1016/j.bbagen.2009.02.014.

Stoytcheva Z, Tujebajeva RM, Harney JW, Berry MJ (2006). Efficient incorporation of multiple selenocysteines involves an inefficient decoding step serving as a potential translational checkpoint and ribosome bottleneck. *Mol. Cell. Biol.* 26 (24), 9177-84.

St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM (2006). Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell.* 127 (3), 465-68.

Stranges S, Marshall JR, Natarajan R, Donahue RP, Trevisan M, Combs GF, Cappuccio FP, Ceriello A, Reid ME (2007). Effects of long-term selenium supplementation on the incidence of type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* 147 (4), 217-23.

Sun K, Montana V, Chellappa K, Brelivet Y, Moras D, Maeda Y, Parpura V, Paschal BM, Sladek FM (2007). Phosphorylation of a conserved serine in the deoxyribonucleic acid binding domain of nuclear receptors alters intracellular localization. *Mol. Endocrinol.* 21 (6), 1297-311.

Suzuki KT, Kurasaki K, Okazaki N, Ogra Y (2005). Selenosugar and trimethylselenonium among urinary Se metabolites: dose- and age-related changes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206 (1), 1-8.

Tcherepanova I, Puigserver P, Norris JD, Spiegelman BM, McDonnell DP (2000). Modulation of estrogen receptor-alpha transcriptional activity by the coactivator PGC-1. *J. Biol. Chem.* 275 (21), 16302-08.

Thomas CR, Turner SL, Jefferson WH, Bailey CJ (1998). Prevention of dexamethasone-induced insulin resistance by metformin. *Biochem. Pharmacol.* 56 (9), 1145-50.

Traulsen H, Steinbrenner H, Buchczyk DP, Klotz LO, Sies H (2004). Selenoprotein P protects low-density lipoprotein against oxidation. *Free Radic. Res.* 38 (2), 123-8.

Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, Monsalve M (2005). PGC-1alpha regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 66 (3), 562-73.

Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Menendez JA (2009). The antidiabetic drug metformin suppresses HER2 (erbB-2) oncoprotein overexpression via inhibition of the mTOR effector p70S6K1 in human breast carcinoma cells. *Cell Cycle* 8 (1), 88-96.

Viollet B, Foretz M, Guigas B, Horman S, Dentin R, Bertrand L, Hue L, Andreelli F (2006). Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. *J. Physiol.* 574 (Pt 1), 41–53.

Walter PL, Steinbrenner H, Barthel A, Klotz LO (2008). Stimulation of selenoprotein P promoter activity in hepatoma cells by FoxO1a transcription factor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 365 (2), 316-21.

Watanabe C, Kim CY, Satoh H (1997). Tissue-specific modification of selenium concentration by acute and chronic dexamethasone administration in mice. *Br. J. Nutr.* 78 (3), 501-9.

Wiernsperger NF (1999). Membrane physiology as a basis for the cellular effects of metformin in insulin resistance and diabetes. *Diabetes Metab.* 25 (2), 110-27.

Wilcock C, Bailey CJ (1994). Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. *Xenobiotica.* 24 (1), 49-57.

Wilson DS, Tappel AL (1993). Binding of plasma selenoprotein P to cell membranes. *J. Inorg. Biochem.* 51 (4), 707-14.

Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell BB, Scarpulla RC, Spiegelman BM (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98 (1), 115–24.

Xia Y, Hill KE, Byrne DW, Xu J, Burk RF (2005). Effectiveness of selenium supplements in a low-selenium area of china. *Am. J. Clin. Nutr.* 81 (4), 829-34.

Xu XM, Mix H, Carlson BA, Grabowski PJ, Gladyshev VN, Berry MJ, Hatfield DL (2005). Evidence for direct roles of two additional factors, SECp43 and soluble liver antigen, in the selenoprotein synthesis machinery. *J. Biol. Chem.* 280 (50), 41568–75.

Xu XM, Carlson BA, Mix H, Zhang Y, Saira K, Glass RS, Berry MJ, Gladyshev VN, Hatfield DL (2007). Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes. *Plos Biol.* 5 (1), 96-105.

Yang J-G, Hill KE, Burk RF (1989). Dietary selenium intake controls rat plasma selenoprotein P concentration. *J. Nutr.* 119 (7), 1010-12.

Yang G, Yin S, Zhou R, Gu L, Yan B, Liu Y, Liu Y (1989). Studies of safe maximal daily dietary Se-intake in a seleniferous area in China. Part II: Relation between Se-intake and the manifestation of clinical signs and certain biochemical alterations in blood and urine. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 3 (3), 123-30.

Yang GQ, Wang SZ, Zhou RH, Sun SZ (1983). Endemic selenium intoxication of humans in China. *Am. J. Clin. Nutr.* 37 (5), 872-81.

Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 409, 413 (6852), 131-38.

Yu SY, Zhu YJ, Li WG (1997). Protective role of selenium against hepatitis B virus and primary liver cancer in Qidong. *Biol. Trace Elem. Res.* 56 (1), 117-24.

Yuan X, Ta TC, Lin M, Evans JR, Dong Y, Bolotin E, Sherman MA, Forman BM, Sladek FM (2009). Identification of an endogenous ligand bound to a native orphan nuclear receptor. PLoS ONE 4 (5), e5609.

Zang M, Zuccollo A, Hou X, Nagata D, Walsh K, Herscovitz H, Brecher P, Ruderman NB, Cohen RA (2004). AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. J. Biol. Chem. 279 (46), 47898-905.

Zhao X, Gan L, Pan H, Kan D, Majeski M, Adam SA, Unterman TG (2004). Multiple elements regulate nuclear/cytoplasmic shuttling of FOXO1: characterization of phosphorylation- and 14-3-3-dependent and -independent mechanisms. Biochem. J. 378 (Pt 3), 839-49.

Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. J. Clin. Invest. 108 (8), 1167-74.

Zwirska-Korczala K, Jochem J, Rybus-Kalinowska B, Polaniak R, Birkner E (2003). Assessment of blood superoxide dismutase, glutathione peroxidase activity and malondialdehyde concentration as oxidation status parameters in obese women. Pol. Arch. Med. Wewn. 110 (1), 725-31.

8 Abkürzungen

AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CREB	<i>cAMP-responsive element binding protein</i>
DBE	<i>daf16-binding element</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eEFSec	<i>Sec-specific eukaryotic elongation factor</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
FoxO	<i>forkhead box class O</i>
G6Pase	Glucose-6-phosphatase
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
Gpx	Glutathionperoxidase
HNF-4 α	<i>hepatocyte nuclear factor-4</i>
HPRT1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
LB	Luria-Bertani Medium
Luc	Luziferase
MTT	3-[4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazoliumbromid
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotid-2'-phosphat
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGC-1 α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
Pstk	Phosphoseryl-tRNA ^{Sec} Kinase
PTP1B	Proteintyrosinphosphatase-1B
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SBP2	<i>SECIS binding protein 2</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Se	Selen
Sec	Selenocystein
SECIS	Selenocystein-Insertionssequenz
SecS,	Selenocystein-Synthase
Sec-tRNA ^{Sec}	Selenocysteinyl-tRNA ^{Sec}
SeP	Selenoprotein P
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SPS-2,	Selenophosphat-Synthetase 2

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBST	TBS + Tween-20
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
TORC2	<i>transducer of regulated CREB activity 2</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TrxR	Thioredoxinreduktase
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Enzymeinheiten (Units)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

9 Publikationen

9.1 Zeitschriftenartikel

Speckmann B, Walter PL, Alili L, Reinehr R, Sies H, Klotz LO, Steinbrenner H (2008). Selenoprotein P expression is controlled through interaction of the coactivator PGC-1alpha with FoxO1a and hepatocyte nuclear factor 4alpha transcription factors. *Hepatology* 48 (6), 1998-2006. [1]

Speckmann B, Sies H, Steinbrenner H (2009). Attenuation of hepatic expression and secretion of selenoprotein P by metformin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387 (1), 158-63. [2]

Khobta A, Kitsera N, Speckmann B, Epe B (2009). 8-Oxoguanine DNA glycosylase (Ogg1) causes a transcriptional inactivation of damaged DNA in the absence of functional Cockayne syndrome B (Csb) protein. *DNA Repair (Amst)* 8 (3), 309-17.

Ergebnisse dieser Dissertation wurden in den Artikeln [1] und [2] vorab veröffentlicht.

9.2 Kongressbeiträge

Poster

Speckmann B, Alili L, Klotz LO, Sies H, Steinbrenner H: Control of selenoprotein P expression through interaction of the co-activator PGC-1 α with FoxO1a and HNF-4 α transcription factors. (Kongress der SFRR-Europe, Berlin, 2008) *Young Investigator Award*

Speckmann B, Sies H, Steinbrenner H: Attenuation of hepatic expression and secretion of selenoprotein P by Metformin (Kongress der GBM, Aachen, 2009)

Vortrag

Speckmann B, Alili L, Klotz LO, Sies H, Steinbrenner H: Transcriptional Regulation of Hepatic Selenoprotein P Expression (Kongress der SFRR-Europe, Rom, 2009)

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. Helmut Sies danke ich für die freundliche Aufnahme in sein Institut, das Interesse an meiner Arbeit und das mir entgegengebrachte Vertrauen sowie die Förderung meiner wissenschaftlichen Laufbahn.

Herrn PD Dr. Holger Steinbrenner danke ich für die hervorragende Betreuung und Unterstützung bei allen Aspekten meiner Promotion. Diese Arbeit ist das Produkt zahlreicher kreativer und konstruktiver Diskussionen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Lutz Schmitt für die Übernahme des Koreferats.

Der Jung-Stiftung für Wissenschaft und Forschung danke ich für die Anerkennung und großzügige Förderung meiner Arbeit.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Wilhelm Stahl für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut durchführen zu können.

Andrea Borchardt danke ich für die ausgezeichnete Unterstützung bei der Zellkulturarbeit und bei anderen Labortätigkeiten.

Prof. Dr. Lars-Oliver Klotz und seinen Mitarbeitern aus dem Institut für Umweltmedizinische Forschung danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Die Hepatocyten wurden von PD Dr. Roland Reinehr und Elisabeth Winands zur Verfügung gestellt, wofür ich mich herzlich bedanke.

Außerdem möchte ich mich vor allem bei Dr. Lirija Alili, Simon Staubach, Antonio Pinto und Andre Bartholomé für die Diskussion praktischer und theoretischer Fragestellungen bedanken. Allen Kollegen und Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie I danke ich für die gesunde und produktive Arbeitsatmosphäre.

Schließlich und ganz besonders bedanke ich mich für die großen Dinge bei meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Freundin Kirsten.

Erklärung des Bewerbers:

Ich habe die vorgelegte Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und diese in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Erfolgreiche Promotionsversuche wurden nicht unternommen.