



**Zum Einfluss von Selen auf den Kohlenhydratstoffwechsel und  
die Insulinsignaltransduktion in der Skelettmuskulatur**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Antonio Pinto**

aus Solingen

Düsseldorf, Februar 2012

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. Dr. Dr. H. Sies

Korreferent: Prof. Dr. L. Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung:

„Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an interessant zu werden, wo sie aufhört.“  
*Justus von Liebig - Chemische Briefe*

*Meinen Eltern in Dankbarkeit und Liebe*

<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 DAS ESSENTIELLE SPURENELEMENT SELEN.....	1
1.2 SELENOPROTEINE .....	3
1.3 INSULINSIGNALTRANSDUKTION .....	8
1.4 INSULINWIRKUNG UND INSULINRESISTENZ IM SKELETTMUSKEL .....	14
1.5 SELEN UND SELENOPROTEINE IN DER SKELETTMUSKULATUR .....	18
1.6 MOLEKULARE MECHANISMEN DER PRO- UND ANTIDIABETISCHEN WIRKUNGEN VON SELEN.....	21
<b>2 ZIELE DER ARBEIT</b> .....	<b>24</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>25</b>
3.1 MATERIALIEN.....	25
3.2 ZELLKULTUR .....	29
3.3 SELENSUPPLEMENTATIONSMODELL SUS SCROFA .....	33
3.4 BIOCHEMISCHE METHODEN.....	34
3.5 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN .....	38
3.6 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	41
<b>4 ERGEBNISSE</b> .....	<b>46</b>
4.1 EINFLUSS VON NIEDERMOLEKULAREN SELENVERBINDUNGEN AUF DIE INSULINSIGNALTRANSDUKTION IN L6 MUSKELZELLEN.....	46
4.2 EINFLUSS DES SELENTTRANSPORTPROTEINS SELENOPROTEIN P AUF DIE INSULINSIGNALTRANSDUKTION IN HUMANEN SKELETTMUSKELZELLEN .....	71
4.3 EINFLUSS VON SELENSUPPLEMENTATION AUF DIE SIGNALTRANSDUKTION UND GENEXPRESSION IN INSULINZIELGEWEBEN VON SUS SCROFA. ....	81
<b>5 DISKUSSION</b> .....	<b>95</b>
5.1 NATRIUMSELENIT UND METHYLSELENINIGE SÄURE BEEINTRÄCHTIGEN DIE INSULINSENSITIVITÄT VON SKELETTMUSKELZELLEN IN L6-ZELLEN.....	96
5.2 SELENOPROTEIN P BEEINFLUSST DIE PHOSPHORYLIERUNG VON INSULINABHÄNGIGEN SIGNALMOLEKÜLEN IN HUMANEN SKELETTMUSKELZELLEN .....	102
5.3 EINFLUSS EINER SUPPLEMENTATION MIT SELEN AUF DEN ENERGIESTOFFWECHSEL IN SKELETTMUSKULATUR UND VISZERALEM FETTGEWEBE IM TIERMODELL SUS SCROFA.....	107
5.4 POTENTIALBEWERTUNG VON SELEN ALS RISIKOFAKTOR FÜR TYP 2 DIABETES MELLITUS .....	112
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>116</b>
<b>7 LITERATUR</b> .....	<b>118</b>
<b>8 APPENDIX</b> .....	<b>147</b>
8.1 PRIMER.....	147
<b>9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>150</b>
<b>10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>152</b>
<b>11 TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>154</b>
<b>12 PUBLIKATIONEN</b> .....	<b>155</b>
<b>13 DANKSAGUNG</b> .....	<b>156</b>

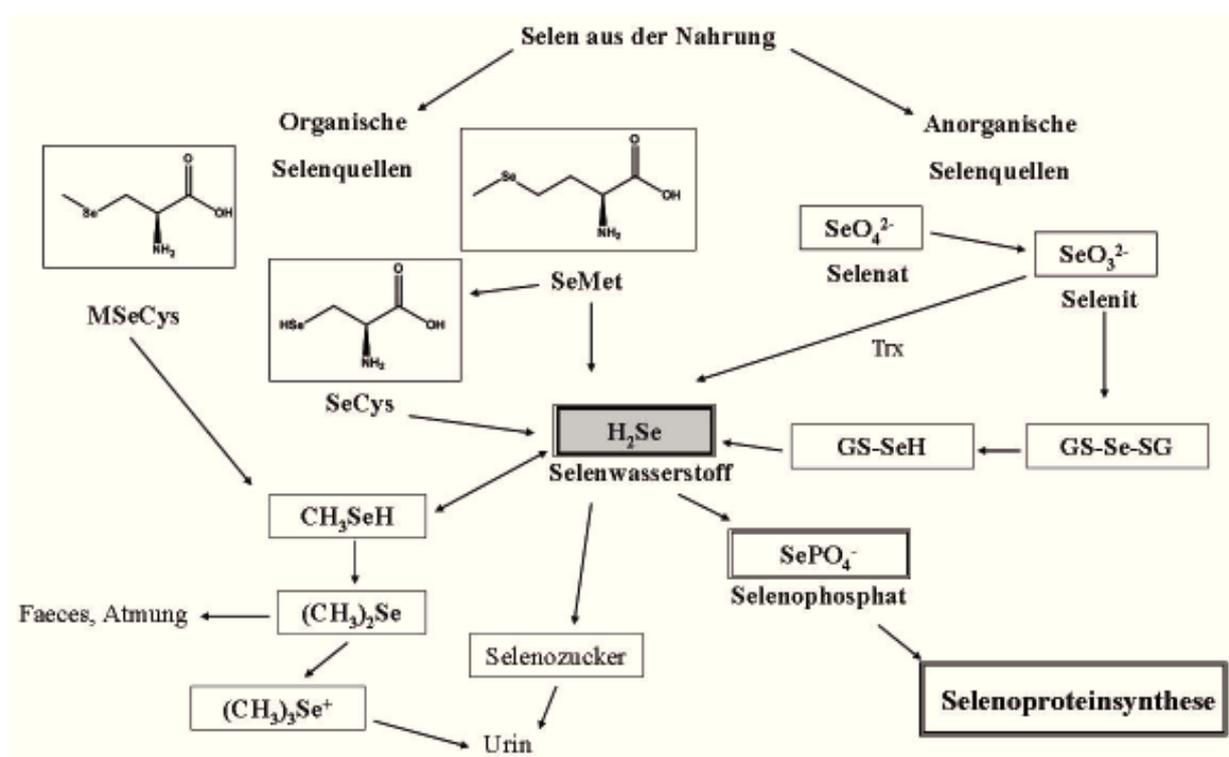


# 1 Einleitung

## 1.1 Das essentielle Spurenelement Selen

Selen ist das 34. Element im Periodensystem. Als Berzelius es 1817 im Schlamm einer Schwefelsäurefabrik entdeckte, fand er das Element assoziiert mit Tellur (Tellus = *lateinisch* Erde) vor. Um auf die enge Verwandtschaft der Elemente zu verweisen, benannte er das neu entdeckte Element nach Selene, der griechischen Göttin des Mondes. Neben seiner engen Verwandtschaft zum Tellur, mit dem es die Eigenschaften eines Halbmetalls teilt, besitzt Selen viele Eigenschaften des Nichtmetalls Schwefel. Erstmals in den Blickpunkt medizinisch-biologischer Forschung geriet es zu Beginn des 20. Jahrhunderts, als nachgewiesen wurde, dass direkt injiziertes Selen zum Rückgang von Ehrlich-Karzinomen führte. Dabei zeigte sich allerdings auch das toxische Potential des Selens, als Patienten an Überdosen Selen starben. Bis zu den 1950er Jahren hatte sich Selen den Ruf als natürliches Toxin erworben; man hatte festgestellt, dass der Tod tausender Herdentiere in den Great Plains der USA durch den Konsum stark selenhaltiger Pflanzen verursacht worden war (Schrauzer und Surai, 2009). Im Jahr 1957 zeigten Schwarz und Foltz, dass Selen ein essentielles Spurenelement ist, indem sie mangelernährte Ratten, durch Beigabe von Natriumselenit zum Futter, vor dem Tod durch Lebernekrose retten konnten. Nach weiteren 16 Jahren wurde die Glutathionperoxidase 1 (GPx1) in Erythrozyten als erstes Selenoenzym entdeckt (Flohé et al., 1973; Rotruck et al., 1973). Die Entdeckung weiterer selenabhängiger Glutathionperoxidasen und anderer Selenoproteine folgte in verschiedenen Geweben (Reeves und Hoffmann, 2009). Während Metalle in Coenzymen normalerweise koordinativ gebunden sind, wurde bei Selenoenzymen festgestellt, dass das Selen kovalent im Selenocystein gebunden ist (Cone et al., 1976). Die Aufnahme von Selen in den Organismus geschieht über die Nahrung. Gute Selenquellen sind z.B. Fisch, Fleisch, Knoblauch, Broccoli, und diverse Nussarten (Navarro-Alarcon und Cabrera-Vique, 2008). Da die Versorgung mit Selen regional unterschiedlich ist, variieren die Plasmaselenwerte der Bevölkerung je nach Land und Kontinent. Während z.B. in den USA durchschnittlich 106 µg/Tag an Selen durch die Nahrung aufgenommen werden, beträgt in Deutschland und im größten Teil von Westeuropa die durchschnittliche Selenaufnahme 30-50 µg pro Tag (Rayman, 2008 ; Fairweather-Tait et al., 2011). Damit liegt sie etwas unter der empfohlenen Tagesdosis von 55-75 µg Selen pro Tag (Stranges et al., 2010c).

Über die Nahrung wird Selen entweder in organischer Form als Selenocystein (SeCys), Se-Methylselenocystein (MSeCys) oder Selenomethionin (SeMet), oder in anorganischer Form (z.B. in Nahrungsmittelzusätzen) als Selenit ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) oder Selenat ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) aufgenommen. Im Mittelpunkt des Selenmetabolismus steht Selenwasserstoff ( $\text{H}_2\text{Se}$ ). Unabhängig davon, ob organische oder anorganische Verbindungen aufgenommen werden, werden diese in humanen Zellen in Selenwasserstoff umgewandelt (zusammengefasst in Fairweather-Tait et al., 2011). Die organischen Verbindungen können über Lyasen direkt in  $\text{H}_2\text{Se}$  oder Methylselenol umgewandelt werden. Selenomethionin wird entweder erst von einer Lyase in Selenocystein überführt oder kann über Methionasen zu  $\text{H}_2\text{Se}$  verstoffwechselt werden. Anorganisches Selen muss reduziert werden, um verwertbar zu werden. Selenat (+VI) wird dabei erst zu Selenit (+IV) reduziert. Über zelluläre Reduktionsysteme wie Glutathion (GSH) oder Thioredoxin (Trx) wird Selenit zu  $\text{H}_2\text{Se}$  (-II) umgewandelt.  $\text{H}_2\text{Se}$  wird zum Großteil in Selenophosphat umgewandelt, welches als reaktiver Donor für die Selenoproteinsynthese dient.



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Selenmetabolismus im Menschen (vereinfacht nach Fairwaither-Tait et al 2010)**

Überschüssiger Selenwasserstoff wird über Methyltransferasen zu Methylselenol umgewandelt, diese Reaktion ist über Demethylasen reversibel. Ausgehend von Methylselenol entstehen durch fortgesetzte Methylierung Exkretionsprodukte des Selen. Dimethylselenid wird über Atmung und Faeces ausgeschieden, über den Urin wird

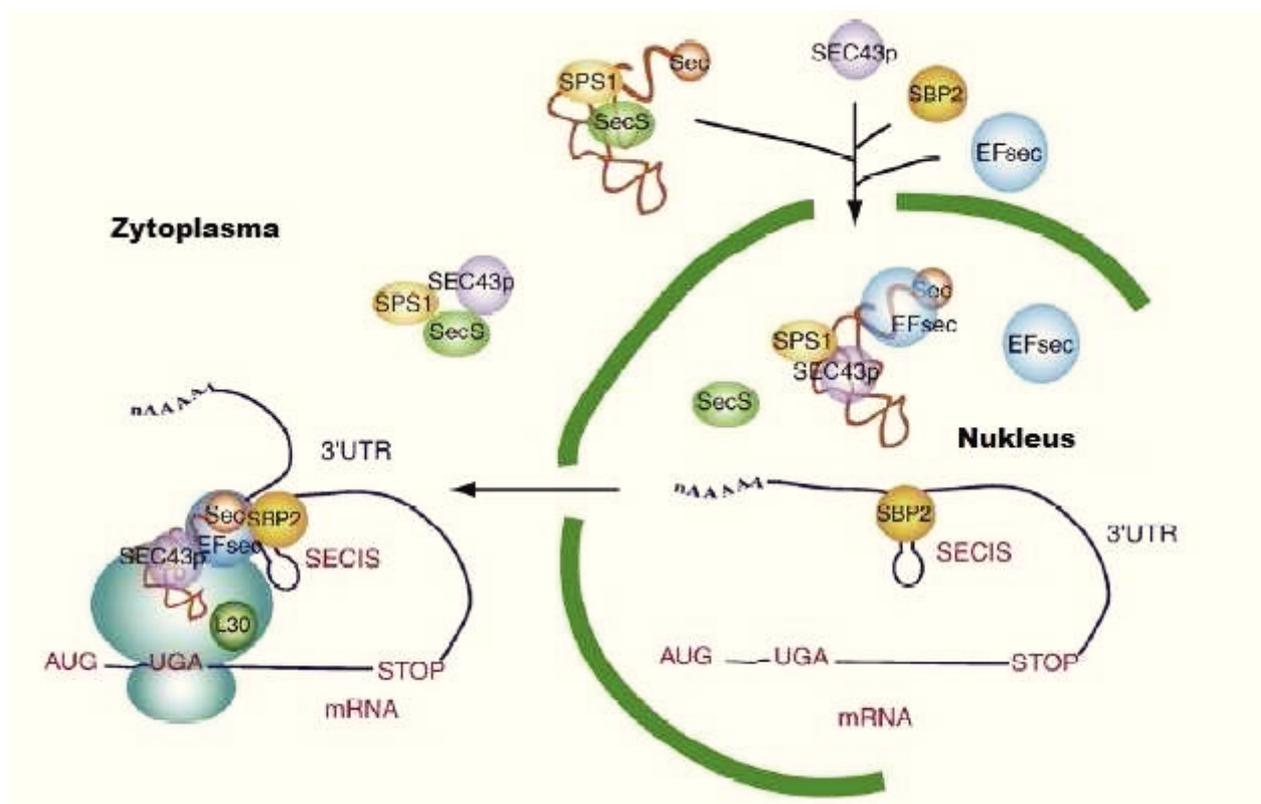
Trimethylselenonium ausgeschieden. Bei geringem Selengehalt ist auch die Ausscheidung über Selenozucker möglich. Die Aufnahme des Selens findet hauptsächlich in Enterozyten statt, wo es dann über Selenoproteine oder als niedermolekulare Verbindungen der Leber zugeführt wird. Von dort aus werden über das Plasmaprotein Selenoprotein P (SelP) systemisch die einzelnen Organe mit Selen versorgt (Burk und Hill, 2009). Durch Deletion des Selenoprotein P findet in einem Mausmodell eine Umverteilung des Selens statt, Selen reichert sich dann in der Leber an, während sich in den SelP-Organen eine Selendefizienz bildet (Hill et al., 2003; Schomburg et al., 2003).

## 1.2 Selenoproteine

Die Integration von Selen in Proteine findet über zwei Hauptwege statt. Es kann unspezifisch in methioninhaltige Proteine als Selenomethionin inkorporiert werden, oder in Form der 21. proteinogenen Aminosäure, Selenocystein, für die Biosynthese der eigentlichen Selenoproteine bereitgestellt werden (Arnér, 2010). Es wurde auch eine Klasse von Proteinen entdeckt, die Selen als Liganden binden können (*Selenium-Binding-Proteins*). Welche Struktur motive für diese Bindung zuständig sind, ist allerdings unklar (Bansal et al., 1990; Fang et al., 2010). Zusätzlich können Selenverbindungen unspezifisch mit Proteinen wie Albumin assoziieren.

Spezifische Selenoproteingene kodieren für mRNAs, in deren Leserahmen mindestens ein UGA-Codon enthalten ist, welches normalerweise zu einer Termination der Proteinbiosynthese führen würde, aber in Selenoproteinen den Einbau von Selenocystein markiert (Chambers et al., 1986;). Diese Aufhebung des Translationsabbruchs kann nur durch einen komplexen und aufwendigen Erkennungsmechanismus sichergestellt werden. Selenoprotein-mRNAs enthalten im 3'-untranslatierten-Bereich (UTR) ein oder zwei SECIS-Elemente (Selenocystein-Insertion-Sequenzen), die während der Translation von speziellen Proteinen erkannt werden und den Abbruch verhindern (Low und Berry, 1996). Durch Bindung des Adaptorproteins SBP2 (SECIS-Bindendes-Protein-2) an das SECIS-Element wird die kooperative Bindung des weiteren Elongationsfaktors EFSec ermöglicht, der ebenfalls mit dem SECIS-Element interagiert und die Selenocysteinyl-tRNA ( $tRNA^{Sec}$ ) rekrutiert (Tujebajeva et al., 2000; Thanbichler und Böck, 2002). Da es sich beim SECIS-Element um eine Haarnadelstruktur handelt, gelangt die Selenocysteinyl-tRNA auf diese Weise in die räumliche Nähe der ribosomalen Translationsstelle und führt zu einer Integration des Selenocysteins (Hatfield et al., 2006). Anders als bei den kanonischen proteinogenen

Aminosäuren wird  $tRNA^{Sec}$  nicht durch eine Aminoacyl-tRNA-Synthetase beladen, sondern ausgehend von Seryl-tRNA synthetisiert. Die Seryl-tRNA wird phosphoryliert und danach mit dem Selendonator von der Pyridoxalphosphat-abhängigen Selenocysteinsynthase zu  $tRNA^{Sec}$  umgesetzt (Diamond, 2004). Noch ist der komplexe Ablauf der Selenocysteininsertion nicht vollständig verstanden. So wurden das ribosomale Protein L30, das RNA-bindende Protein Secp43 und das SLA (*Soluble Liver Antigen*) als weitere Komponenten des Insertionskomplexes identifiziert (Chavatte et al., 2005; Xu et al., 2005). Weitere Interaktionspartner, die die Bindung des SBP2 an SECIS beeinflussen, wurden ebenfalls entdeckt, werden hier aber nicht erläutert (Allmang et al., 2009).



**Abbildung 1.2:** Schema der Selenocysteininsertion: Nach abgeschlossener  $tRNA^{Sec}$ -Synthese bleiben Selenocysteinsynthase (SecS) und Selenophosphatsynthetase (SPS1) an der tRNA gebunden. Ein Komplex aus  $tRNA^{Sec}$ , SPS1, SecS, EFsec und Secp43 transloziert in den Zellkern und interagiert dort mit dem bereits von SBP2 gebundenen SECIS-Element. SecS verlässt den Komplex bei erneuter Translokation ins Zytoplasma. Dort wird über L30 die Bindung zum Ribosom vermittelt (modifiziert nach Allmang et al., 2009).

Selenoproteine sind in allen drei Domänen des Lebens (Archea, Bakterien und Eukaryoten) vertreten. Die Größe des Selenoproteoms kann je nach systematischer Klasse variieren und ist nicht mit der evolutionären Entwicklung korrelierbar (Castellano, 2009). So ist in den Nematoden *Caenorhabditis elegans* und *Caenorhabditis briggsae* jeweils nur ein Selenoprotein vorhanden (Taskov et al., 2005), während in der Taufliege *Drosophila melanogaster* drei Selenoproteine identifiziert wurden (Martin-Romero et al., 2001).

In Pflanzen sind Selenoproteine nicht mehr präsent (Lobanov et al., 2007). Beim Menschen konnten durch bioinformatische Ansätze 25 Selenoproteingene identifiziert werden. In derselben Studie wurden auch 24 Selenoproteingene in *Mus musculus* (Maus) und in *Rattus norvegicus* (Ratte) identifiziert. Die 24 Selenoproteine der Nagerspezies sind identisch mit den humanen Selenoproteinen, nur die GPX6 ist in Maus und Ratte ein Cysteinanalogon ohne funktionsfähiges SECIS-Element (Kryukov et al., 2003).

Selenocystein hat Eigenschaften, die die biochemische Reaktionsfähigkeit der Selenoproteine mitbestimmen. So hat Selenocystein einen pKs-Wert von 5.2 bei physiologischem pH, während das strukturanaloge Cystein bei gleichen Bedingungen einen pKs-Wert von 8.5 aufweist (Huber und Criddle, 1967). Das bedeutet, dass Selenocystein bei pH 7,4 hauptsächlich als Selenolat vorliegt und damit reaktionsfreudiger sein kann als das Thiol des Cysteins. Ebenfalls großen Einfluss auf die Reaktionsfähigkeit des Selenocysteins hat die höhere Nukleophilität und Polarisierbarkeit im Vergleich zum Cystein, sowie die Fähigkeit in Redoxprozessen sowohl ein als auch zwei Elektronen aufzunehmen und auch elektrophile Reaktionen besser zu katalysieren. (Nauser et al., 2006; Arnér, 2010; Steinmann et al., 2010). Diese Eigenschaften machen viele Selenoproteine in Säugetieren zu aktiven Oxidoreduktasen mit einer Selenocystein-Cystein-Wechselwirkung im katalytischen Zentrum. Zwar gibt es, z.B. in *Drosophila melanogaster*, Cystein-Analoga von Selenoproteinen, die ähnliche hohe katalytische Aktivität erreichen (Johansson et al., 2006). In Säugetieren führt die Mutation des Selenocysteins (U) zu C jedoch zu einer 10-1000fachen Verringerung der Aktivität der entsprechenden Selenoproteine, was die Wichtigkeit des Selens für ihre Enzymfunktion untermauert (Johansson et al., 2005). Das vollständige Fehlen der Selenoproteine in einem tRNA<sup>Sec</sup>-KO-Maus-Modell führte zum Tod der Mäuse im Embryonalstadium (Bosl et al., 1997). Eine stark verminderte Selenoproteinexpression durch eine heterozygote Deletionsmutation im SBP2-Gen führt auch im Menschen zu schweren Multisystemerkrankungen (Schoenmakers et al., 2010).

Die gegenwärtig am besten untersuchten Selenoproteine sind die Enzymklassen der Glutathionperoxidasen (GPx), Thioredoxinreduktasen (TrxR) und Deiodinasen (DIO).

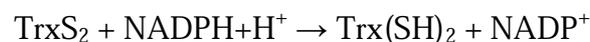
Glutathionperoxidasen können mit Hilfe ihres Kosubstrats Glutathion (GSH) Hydroperoxide entgiften. Das Tripeptid Glutathion ( $\gamma$ -Glutamylcysteinylglycin) ist hauptverantwortlich für den zellulären Thiol-Redox-Status (Arteel und Sies, 2001). Je nach GPx-Form liegt eine unterschiedliche Organdistribution sowie Hydroperoxidspezifität vor (Sies, 1993; Brigelius-Flohé, 2006). Auch sind von den 7 verschiedenen GPx-Isoformen, die GPx5 und die GPx7

beim Menschen keine Selenoproteine, sondern Cysteinanaloge (Kryukov et al., 2003). Gemeinsam ist den Glutathionperoxidasen folgender Reaktionsmechanismus:



Diese Reaktion läuft in einem stringent konservierten Reaktionszentrum aus Selenocystein, Cystein, Tryptophan und Glutamin ab (Flohé et al, 1972; Ganther und Kraus, 1984; Toppo et al., 2009). Die Glutathionperoxidasen tragen folglich zur antioxidativen zellulären Antwort bei.

Die drei FADH<sub>2</sub>-abhängigen Thioredoxinreduktasen (TrxR1-TrxR3) sind ebenfalls an der antioxidativen Antwort beteiligt. Sie regenerieren oxidiertes Thioredoxin (Trx) durch Übertragung von Elektronen von NADPH nach folgendem Mechanismus:



Über die Reduktion von Trx sind die TrxR an essentiellen zellulären Prozessen beteiligt wie der Regeneration von Peroxiredoxinen und Glutaredoxinen, sowie der Synthese von Desoxyribonukleotiden (Arnér und Holmgren, 2000; Arnér, 2009).

Deiodinasen (DIO1-3), die an der Biosynthese der Thyroidhormone beteiligt sind, können spezifisch Kohlenstoff-Iod-Bindungen spalten. Die erste Deiodinase (DIO1) wurde 1990 entdeckt (Behne et al., 1990). Sie kommen prominent in der Schilddrüse vor, aber auch in allen anderen Geweben ist zumindest eine andere Isoform der DIO exprimiert. Ihre Aufgabe besteht darin, das weniger aktive Schilddrüsenhormon T<sub>4</sub> (Thyroxin) in das aktivere T<sub>3</sub> zu überführen, sowie das fehl-iodierte rT<sub>3</sub> in Diiodothyronin (T<sub>2</sub>) umzuwandeln und überschüssiges T<sub>3</sub> zu inaktivieren (Koehle, 2005).

In Tabelle 1.1 sind die Lokalisation und Funktion der wichtigsten humanen Selenoproteine dargestellt. Die übrigen Selenoproteine werden an dieser Stelle nicht diskutiert.

**Tabelle 1.1**

<b>Selenoprotein</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Funktion</b>
Glutathionperoxidasen		Abbau von Hydroperoxiden
GPx1 (cGPx)	Ubiquitär, Leber	Entgiftung von zellulären Hydroperoxiden.
GPx2 (GI-GPx)	Epithel des Gastrointestinal (GI)-Trakt, andere epitheliale Zellen.	Schutz des GI-Trakts vor oxidativen Schäden.
GPx3 (eGPx)	Sekretorisch in Lumen und Plasma aus Niere, Bronchioepithel und Thyrocyten.	Extrazelluläre Schutzfunktion, kardioprotektiv.

<b>Selenoprotein</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Funktion</b>
GPx4 (PH-GPx)	Ubiquitär, Testis, Leber, Herz	Entgiftung von Phospholipidhydroperoxiden, GPx4-KO ist embryonal letal.
Thioredoxinreduktasen		Reduktion von Thioredoxin.
TrxR1	Ubiquitär (zytosolisch)	TrxR1-KO ist embryonal letal.
TrxR2	Ubiquitär (mitochondrial)	TrxR2-KO ist embryonal letal.
TrxR3	Testis	
Deiodinasen		Regulation des verfügbaren Thyroxins
DIO1	Schilddrüse, Leber, Niere, Hypophyse	Breite Substratspezifität, T <sub>4</sub> →T <sub>3</sub> , rT <sub>3</sub> →T <sub>2</sub> .
DIO2	ZNS, Herz, braunes Fettgewebe, Skelettmuskel	Wichtiger im peripheren Gewebe, T <sub>4</sub> →T <sub>3</sub> , rT <sub>3</sub> →T <sub>2</sub>
DIO3	Fötale Gewebe, Plazenta, Haut, ZNS	Inaktivierung von T <sub>3</sub> , T <sub>3</sub> →T <sub>2</sub> ,
Selenophosphat Synthetase 2	Ubiquitär	Selenoproteinsynthese
Selenoprotein P (SelP)	Sekretorisch im Plasma (die Leber sezerniert 75% des SelP im Plasma)	Selentransport, Versorgung des ZNS mit Selen
Sep15	Prostata	Proteinfaltung und Glykosylierung
Methioninsulforeduktase	Leber, Niere, Hirn	Reduktion von Methioninsulfoxid

**Tabelle 1.1: Lokalisation und Funktion von humanen Selenoproteinen. Die Zusammenstellung der wichtigsten humanen Selenoproteine ist angelehnt an Papp et al., (2007); Reeves und Hoffmann, (2009); McCann und Ames, (2011).**

Bei einer Selendefizienz wird die Expression nichtessentieller Selenoproteine verringert. Dieses „Hierarchie der Selenoproteine“ genannte Phänomen hat mehrere Ursachen. Bei Fehlen von Selen wird das UGA-Codon als Stopcodon interpretiert, so dass es zu einem „Nonsense“-medierten Kettenabbruch kommt (*nonsense mediated decay*). Des Weiteren bestimmt die Stabilität des SECIS-Elements im 3'-UTR und die dadurch beeinflusste SBP2-Bindung die Expression der Selenoproteine. So werden bei den Glutathionperoxidasen unter Selenmangelbedingungen bevorzugt die GPx2 und GPx4 exprimiert und die Synthese der GPx1 unterdrückt. Durch Herstellung von 3'-UTR Chimären lassen sich diese Prozesse umkehren (Müller et al., 2003). Ein weiterer Faktor ist eine Isoform der tRNA<sup>Sec</sup>, die an Uracil 34 methyliert ist (tRNA<sup>Sec</sup>mcm<sup>5</sup>Um) und für die Expression besonders selenresponsiver Selenoproteine (z.B. GPx1 und Selenoprotein W) benötigt wird (Moustafa et al., 2001). Zusätzlich spielen noch gewebespezifische Faktoren eine Rolle, da die Hierarchie

je nach Gewebe eine veränderte Abfolge besitzen kann, obwohl grundlegende Tendenzen gleich bleiben (Hesketh, 2008).

### **1.3 Insulinsignaltransduktion**

Insulin ist ein Peptidhormon, das in den  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pancreas synthetisiert wird. Es besteht aus den Ketten A (21 AS) und B (30 AS), die über Disulfidbrücken kovalent gebunden sind. Es wird aus dem Präproinsulin proteolytisch abgespalten, das frei werdende C-Peptid wird ebenfalls ins Plasma abgegeben. Die Hauptaufgabe des Insulins ist es, die Voraussetzungen für eine effiziente Glucoseaufnahme, -verwertung und -speicherung in den Zielgeweben zu schaffen und dadurch eine Senkung des Blutglucosespiegels zu erreichen. Die  $\beta$ -Zellen des Pancreas fungieren als Glucosesensoren, die bei Stimulation durch Anstieg der Glucosekonzentration depolarisieren und in der Folge Insulin in die Blutbahn sezernieren. In seinen Zielgeweben löst Insulin rezeptorvermittelte Signalkaskaden aus. Diese Wirkung wird hauptsächlich über den Insulinrezeptor (InsR) vermittelt, doch kann Insulin auch an die verwandten IGF1-Rezeptoren und IRR-Rezeptoren (IGF = *Insulin-like growth factor*, IRR = *Insulin receptor related*) binden, mit denen der Insulinrezeptor funktionale Hybride bilden kann. Beim Insulinrezeptor handelt es sich um eine heterotetramere Rezeptortyrosinkinase, die aus zwei  $\alpha$ -Ektodomänen und zwei membrandurchspannenden  $\beta$ -Domänen besteht, die durch alternatives Spleißen aus dem InsR-Gen entstehen. Insulin bindet mit negativer Kooperativität an die  $\alpha$ -Ektodomänen, d.h. erst bindet ein Insulinmolekül an eine Hochaffinitätsbindestelle, dann können ein bis zwei weitere Insulinmoleküle an durch Konformationsänderung erzeugte niedrigaffine Bindungsstellen andocken (de Meyts, 2008). Durch die Bindung des Insulins wird eine gegenseitige Autophosphorylierung von Tyrosinresten der  $\beta$ -Domänen ausgelöst. Als Konsequenz wird im kanonischen Insulinsignalweg durch den Rezeptor das Insulinrezeptor Substrat (IRS) rekrutiert, das über eine Phosphotyrosindomäne bindet. Alternativ kann durch die Proteinphosphatase 1B (PTP1B) der InsR inaktiviert werden und die Rekrutierung der IRS verhindert werden (Dubé und Tremblay, 2005). Weiterhin wird IRS ebenfalls an einem Tyrosinrest phosphoryliert. An diesen können über SH2-Domänen (*src homology 2*) weitere Signalmediatoren binden (Siddle, 2011).

Ein Bindungspartner mit SH2-Domäne ist die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die aus einer regulatorischen (p85) und einer katalytischen Untereinheit (p110) besteht. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>), ein Membranphospholipid, wird durch die PI3K

am 3'-OH des Inositolrings phosphoryliert, so dass Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3) entsteht. PIP3 wird durch Proteine mit Pleckstrin-Homologie-Domänen (PH), wie die *Phospho-Inositid dependent Kinase 1* (PDK1) und Akt gebunden, die konsekutiv aktiviert werden können. Der Tumorsuppressor PTEN (*phosphatase und tensin homolog on chromosome 10*) wirkt diesem Vorgang entgegen. Er baut PIP3 wieder zu PIP2 ab und verhindert bzw. beendet so die Aktivierung der Kinasen (Cantrell, 2001).

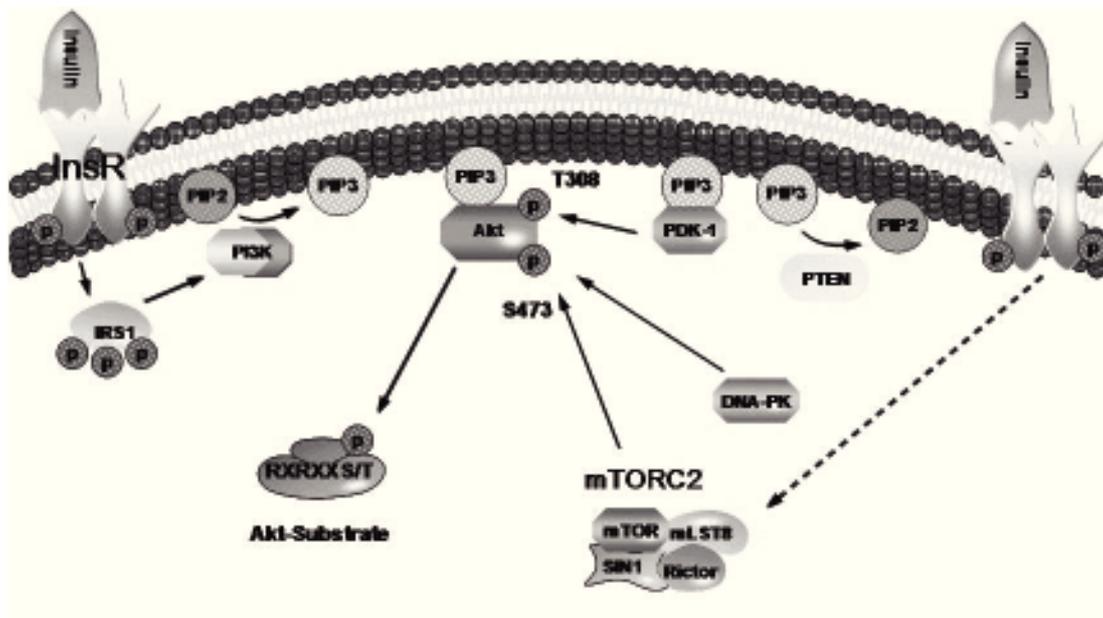
Dieser Signalweg ist hochkonserviert und findet sich kaum verändert ebenfalls in Nematoden und *Drosophila melanogaster* wieder (Ogg und Ruvkun, 1998; Brogiolo et al., 2001). Als Folge einer Insulinstimulation werden aber auch andere Signalwege wie der Ras/MAPK-Signalweg und der CAP/Cbl-Signalweg stimuliert (Siddle, 2011).

### 1.3.1 Akt-Signaling

Akt oder Protein Kinase B (PKB) ist einer der zentralen Signalverteiler in der Insulinsignalkaskade. Die PKB wurde 1991 als induziertes Onkogen des AKT8-Retrovirus entdeckt, sowie bei der Suche nach verwandten Kinasen der PKA und PKC identifiziert. Akt kommt in drei Isoformen vor, die ubiquitär exprimiert werden und teilweise redundante Funktionen besitzen, sowie alle über eine N-terminale PH-Domäne verfügen. Zusätzlich verfügen alle Akt-Isoformen über eine zentral gelegene katalytische und eine regulatorische C-terminale Domäne.

Die Aktivierung der Akt ist ein mehrere Schritte umfassender Prozess. Nach Bindung von PIP3 durch die PH-Domäne an der Membran wird durch Konformationsänderung die Phosphorylierung an Threonin 308 und Serin 473 in der regulatorischen Domäne ermöglicht. Externe Stimuli wie Insulin oder andere Wachstumsfaktoren lösen die Phosphorylierung von Threonin 308 durch die PDK1 aus. Die Phosphorylierung von Serin 473 kann zusätzlich auch durch xenobiotische und genotoxische Stimuli ausgelöst werden und wird durch die Kinasen mTORC2 (*mammalian target of rapamycin Complex 2*) und DNA-PK (DNA-abhängige Proteinkinase) vermittelt (Feng et al., 2004; Sarbassov et al., 2005; Bozulic et al., 2008).

Durch diese Phosphorylierungen aktiviert, kann Akt über seine zentrale Kinasedomäne Substrate mit der Konsensussequenz R-X-R-X-X-S/T-(B) ( $X \neq G$ , B = sperrige Aminosäure) phosphorylieren, wobei B nicht absolut benötigt wird (Alessi et al., 1996).

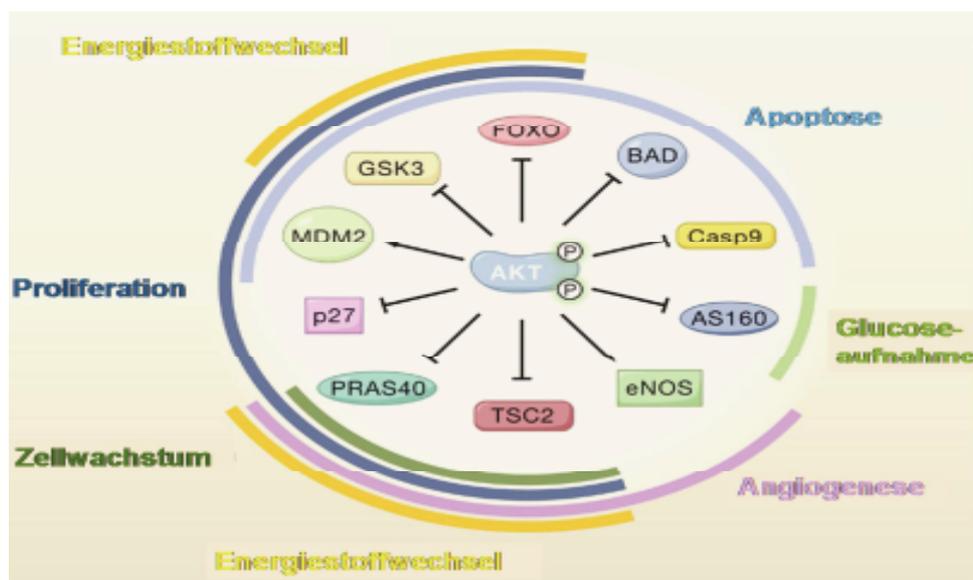


**Abbildung 1.3: Übersicht über den insulinstimulierten PI3K/Akt-Signalweg**

Inzwischen wurden mehr als einhundert Akt-Substrate identifiziert, eine ausführliche Zusammenfassung findet sich in Manning und Cantley (2007). Die Substrate der Akt sind an allen wichtigen Prozessen auf zellulärer Ebene beteiligt. Durch sie werden der Energiestoffwechsel, das Wachstum, die Apoptose, angiogenetische Signale und die Glucoseaufnahme kontrolliert. Zusätzlich zur Aktivierung durch Phosphorylierung kann auch eine negative Regulation erfolgen. Dies geschieht durch 14-3-3 Proteine, die die phosphorylierte Akt-Substratsequenz zur Bindung nutzen und die Zielproteine somit inhibieren (Yaffe et al., 1997). So wird das proapoptotische Bcl-2 bindende BAD-Protein (*Bcl-2 associated death promoter*) durch Akt an S136 phosphoryliert. Durch die beschriebene Bindung von 14-3-3 und diese Phosphorylierungsstelle kann Bcl-2 von BAD dissoziieren und seine antiapoptotische Wirkung entfalten, die besonders das Überleben von Neuronen positiv beeinflusst (Datta et al., 1997).

Auf ähnliche Weise werden die hochkonservierten FoxO-Transkriptionsfaktoren reguliert, eine *Forkhead-box*-Motiv Proteinklasse. Akt phosphoryliert FoxO-Proteine im Zellkern an drei Phosphorylierungsstellen (Thr-24, Ser-256 und Ser-319 bei FoxO1a), woraufhin durch Bindung an 14-3-3 eine Relokalisation in das Zytosol stattfindet. Unter der Kontrolle von FoxO-Transkriptionsfaktoren stehen hauptsächlich Gene, die Zellzyklusarrest, Gluconeogenese, Verringerung oxidativer zellulärer Prozesse sowie Apoptose induzieren (zusammengefasst in Tran et al., 2003). Die von der Akt über mTORC1 (*mammalian target of rapamycin Complex 1*) vermittelte Signaltransduktion begünstigt Zellproliferation und Zellwachstum, so dass über die Translokation von FoxO eine Synchronisierung von Translation (mTORC1) und Transkription (FoxO) auf Wachstum und Proliferation stattfindet

(Kloet und Burgering, 2011). Ein weiteres Beispiel für die Inaktivierung von Signalmolekülen, die der proliferativen Wirkung der Akt entgegenwirken, ist TSC2 (*Tuberous Sclerosis Protein 2*). TSC2 ist ein Tumorsuppressor, der durch die Akt an mindestens vier verschiedenen Threonin- und Serinresten (S939, T1462, S981 und S1130/S1132) phosphoryliert und dadurch erst inaktiviert und dann verstärkt degradiert wird (Dan et al., 2002). Als Folge der Phosphorylierung von TSC2 wird mTORC1 nicht mehr inhibiert und das Insulinsignaling über Akt und mTORC1 verstärkt (Huang und Manning, 2009). Ein weiterer Inhibitor des mTORC1-Komplexes ist PRAS40. Im Gegensatz zu TSC2 genügt die Phosphorylierung des PRAS40 durch die Akt an T246 nicht, um die Inhibition aufzuheben. Es werden zwei zusätzliche Phosphorylierungen an S183 und S221 benötigt, die durch mTORC1 vermittelt werden. Dann wird PRAS40 von 14-3-3 gebunden und von mTORC1 entfernt, so dass mTORC1 die Translation positiv regulieren kann (Nascimento und Ouwens, 2009).



**Abbildung 1.4: Zelluläre Funktionen von Akt-Substraten nach Manning und Cantley, 2007.**

Die GSK3 (Glycogensynthasekinase 3) wird je nach  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Isoform an Serin 21 oder 9 phosphoryliert. Zu den Aufgaben der GSK3 gehört die Kontrolle der Glycogensynthese und die Markierung der G1-Proteine des Zellzyklus (Cyclin D und Cyclin E) für den proteasomalen Abbau (Diehl et al., 1998; Welcker et al., 2003). Da die Akt die GSK3 inhibiert, wird so die Degradation der G1-Proteine verzögert und ein Voranschreiten des Zellzyklus ermöglicht. Dies benötigt katabole Stoffwechselwege und folglich wird durch Inhibition der GSK3 Glykogensynthese verringert.

### 1.3.2 Funktion von reaktiven Sauerstoffspezies bei der Insulinsignalkaskade

In allen lebenden aeroben Systemen werden reaktive Sauerstoffverbindungen gebildet (Sies, 1986). Dabei handelt es sich hauptsächlich um das Superoxidion ( $O_2^{\bullet-}$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), und das Hydroxylradikal ( $OH^{\bullet}$ ). Die Lebensdauer dieser Verbindungen reicht von wenigen Sekunden für  $H_2O_2$  bis zu Bruchteilen einer Millisekunde für  $OH^{\bullet}$  (Chance, Sies und Boveris, 1979). Neben diesen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS = *Reactive Oxygen Species*) werden auch reaktive Stickstoffspezies (RNS = *Reactive Nitrogen Species*) gebildet. Diese Verbindungen werden oft bei pathophysiologischen Prozessen wie Krebsentstehung, altersbedingten Erkrankungen und Neurodegeneration in erhöhter Konzentration detektiert (Sies, 1991; Knight, 1997; Lee und Wei, 2007; Liou und Storz, 2010). Obwohl ROS/RNS in großen Mengen zellschädigend sind, und es spezialisierte Abwehrsysteme von antioxidativen Enzymen und Antioxidantien gibt, um die intrazelluläre und extrazelluläre Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies zu begrenzen, sind sie in geringen Konzentrationen ein durchaus erwünschter Teil der zellulären Redoxhomöostase (Sies und Jones, 2007; Brigelius-Flohé, 2009).

Innerhalb zellulärer Systeme gibt es verschiedene Quellen für ROS. Sie werden durch NADPH-Oxidasen (Nox) erschaffen oder beim mitochondrialen Elektronentransfer gebildet. Zusätzlich gibt es andere enzymatische Systeme, wie Lipoxygenasen, Xanthinoxidasen und Cytochrom P-450 Systeme, in denen ROS als Nebenprodukte anfallen (Sies, 1986; Bedard und Krause, 2007; Zangar et al., 2004; Rigoulet et al., 2011).

Bereits Ende der 1970er Jahre zeigte sich, dass  $H_2O_2$  teilweise ähnliche Wirkungen hatte wie Insulin (Livingston et al., 1977; May und de Haën, 1979b; Hayes und Lockwood, 1987). In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass  $H_2O_2$  in Adipozyten und Skelettmuskel die Glucoseaufnahme über den PI3K/Akt-Signalweg steigerte. (Kono et al., 1982; Higaki et al., 2008). Die sich daraus ergebende Hypothese, dass  $H_2O_2$  und weitere reaktive Sauerstoffverbindungen bei der Stimulation von Zellen mit Insulin entstehen, konnte nachfolgend von mehreren Arbeitsgruppen bestätigt werden (May und de Haën, 1979; Krieger-Brauer und Kather, 1995; Mahadev et al., 2001a; Goldstein et al., 2005). Auch für andere Wachstumsfaktoren und Zytokine konnte eine Beteiligung von ROS an der Signaltransduktion nachgewiesen werden (zusammengefasst in Finkel, 2011).

Die Insulinsignaltransduktion basiert im Wesentlichen auf der Aktivierung von Signalmediatoren durch Phosphorylierung. Der Phosphorylierungsstatus eines Proteins reflektiert die Balance zwischen der Aktivität von Kinasen und gegenregulatorischen

Phosphatasen. Wichtige Phosphatasen in der Regulation der Insulinsignalwirkung sind die PTP1B, PTEN, PP2A (Protein Phosphatase 2A) und MKP-1 (MAP-Kinasephosphatase-1) (Goldstein et al., 2005). Durch Oxidation ihrer katalytisch aktiven Cysteinthiolgruppen können die Phosphatasen reversibel inhibiert und damit die Insulinwirkung verstärkt oder induziert werden (Lee et al., 1998; Mahadev et al., 2001b; Denu und Tanner, 2002). Die insulinmimetischen Effekte von exogen zugeführtem  $\text{H}_2\text{O}_2$  in millimolaren Konzentrationen sind somit durch die Oxidation der insulinregulatorischen Phosphatasen erklärbar.

Aufgrund ihrer kurzen Lebensspanne und ihrer Fähigkeit, radikalinduzierte Kettenreaktionen räumlich und zeitlich begrenzt starten zu können, sind ROS/RNS gut geeignete *Second Messenger*. So konnte für das kurzlebige RNS-Molekül NO eine Funktion als endogener vasodilatatorischer *Second Messenger* nachgewiesen werden (Ignarro et al., 1999).

Als Quelle für rezeptorvermittelte ROS-Produktion wurden über Inhibitions- und Deletionsexperimente die NADPH-Oxidasen (Nox) identifiziert. Besonders die Isoform Nox4 scheint bei der Erzeugung von ROS durch Insulin eine entscheidende Rolle zu spielen (Mahadev et al., 2001a; Mahadev et al., 2004; Espinosa et al., 2009).

Durch Insulinstimulation wird die ROS-Produktion der Nox angeregt, die sich in der Plasmamembran oder in vesikulären Kompartimenten befindet. Das primäre Produkt der Nox ist  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , das extrazellulär oder intravesikulär produziert wird. Über Anionenkanäle kann das geladene Superoxidion die Membranen durchqueren und wird durch spontane oder enzymatische Dismutation zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  umgewandelt (Bedard und Krause, 2007).

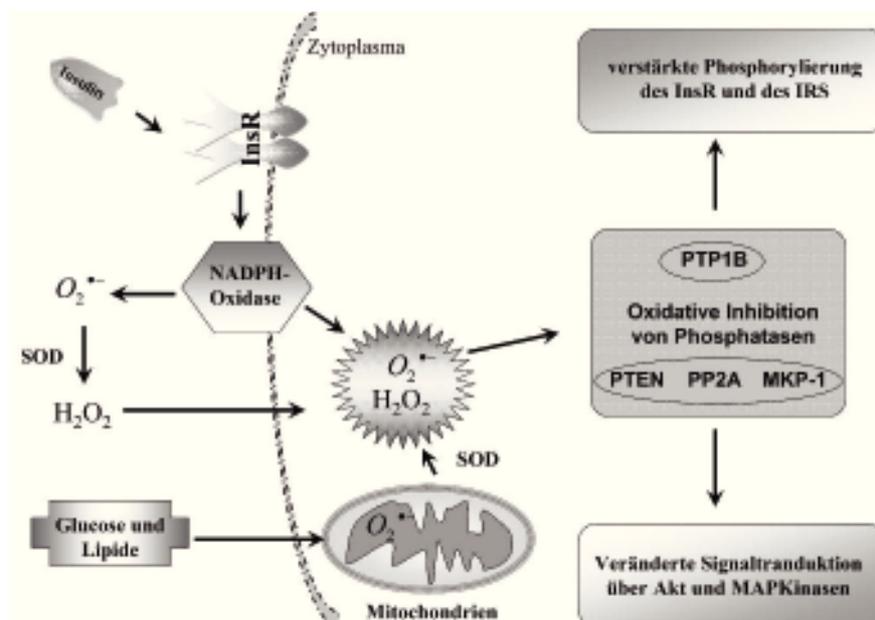


Abbildung 1.5 Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf die Insulinsignaltransduktion nach Goldstein et al., 2005. SOD = Superoxiddismutase.

Der Mechanismus der Stimulation von Nox4 durch Insulin ist unbekannt. Es wurde aber vermutet, dass die GTPase Rac und das G-Protein G $\alpha$ 2 daran beteiligt sind (Goldstein et al., 2005). Eine weitere Quelle von ROS sind die Mitochondrien, die im basalen Zustand für den Hauptteil der Produktion zellulärer reaktiver Sauerstoffspezies verantwortlich sind. An Komplex I und III der Atmungskette wird Superoxid erzeugt, das durch die Mangansuperoxiddismutase zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umgewandelt wird. Der Metabolismus der Mitochondrien wird durch Insulin anabol reguliert, allerdings werden dafür längere Zeiträume als für Aktivierung der Nox benötigt. Ein Überangebot an Glucose oder Lipiden kann aber kurzfristig zu einer erhöhten mitochondrialen ROS-Produktion führen. Bei mitochondrialer Dysfunktion ist die Insulinsignalwirkung gestört, so dass es zu einer Insulinresistenz kommen kann (Cheng et al., 2010; Rigoulet et al., 2011).

### **1.4 Insulinwirkung und Insulinresistenz im Skelettmuskel**

#### **1.4.1 Insulinwirkung im Skelettmuskel**

Im Skelettmuskel kann Glucose aerob oder anaerob metabolisiert werden. Einerseits kann Glucose über die Glycolyse zu Pyruvat und weiter zu Acetyl-CoA abgebaut werden, das über den Citratzyklus und die Atmungskette zur oxidativen Erzeugung von ATP benutzt wird. Andererseits kann Glucose anaerob, bei geringerer Energieausbeute, zu Lactat metabolisiert werden oder als Glycogen zur späteren Verwendung gespeichert werden. Bei Insulinstimulation wird die aufgenommene Glucose bevorzugt über die Inaktivierung der GSK3 und Aktivierung der Glycogensynthase zu Glycogen umgesetzt. Im Falle eines kontrahierenden Muskels wird die Glucose aber auch direkt zur Gewinnung von ATP herangezogen.

Unter Insulineinfluss sind die Insulinzielgewebe für bis zu 90% der Glucoseverwertung verantwortlich, wovon der Hauptanteil auf den Skelettmuskel entfällt (DeFronzo et al., 1981; DeFronzo et al., 1985). Postprandial wird ca. ein Drittel der verzehrten Glucose durch den Skelettmuskel aufgenommen (Moore et al., 2003). Die Glucose ist eine Aldohexose mit stark hydrophilem Charakter, die aus diesem Grund nicht ungehindert die Zellmembran passieren kann. Deshalb besitzen alle Zellen Transportproteine für Glucose, die einen erleichterten Transport der Glucose mit dem Konzentrationsgradienten erlauben. Insgesamt gibt es 4 Glucosetransporter (GLUT1-4), die bevorzugt Glucose aufnehmen und deren Expression gewebespezifisch ist. GLUT1 kommt in fast allen Geweben vor und sichert auch im Skelettmuskel die basale Glucoseversorgung. GLUT4 kommt nur im Skelettmuskel, Herz und

Fettgewebe vor und ist hauptverantwortlich für die insulinstimulierte Glucoseaufnahme (Bell et al., 1990; Scheepers et al., 2004). Im Skelettmuskel wird GLUT4 zu 90% vesikulär im Zytosol gespeichert, bei Stimulation durch Insulin, körperliche Anstrengung oder Hypoxie findet eine Translokation zur Membran statt (Kristiansen et al., 1996; Ryder et al., 2000). Dabei handelt es sich um eine verstärkte Exozytose, während sich die Geschwindigkeit der Endozytose nicht verändert (Klip, 2009).

Das Akt-Substrat 160 (AS160) ist an der insulininduzierten GLUT4-Translokation beteiligt. Es gibt 5 putative Akt-spezifische Phosphorylierungstellen, von denen S588 und T642 das AS160 gesichert inaktivieren. Bei AS160 handelt es sich um ein GTPase-aktivierendes-Protein (GAP). Diese aktiven Rab-GTPasen wiederum unterdrücken die Translokation GLUT4-beladener Vesikel zur Plasmalembran. Wird AS160 inaktiviert, kann GTP die Rab-GTPasen inhibieren, so dass die Translokation der Vesikel stattfinden und verstärkt Glucose in die Zellen aufgenommen werden kann (Sano et al., 2003). Ein weiterer Regulator der GLUT4-Translokation ist TBC1D1, das 50% sequenzhomolog zu AS160 ist. Es ist ebenfalls ein Akt-Substrat und fungiert auch als regulatorisches GAP (Taylor et al., 2008). Neben der Regulation der GLUT4-Vesikel-Fusion durch die Akt, wird die insulinabhängige Glucoseaufnahme durch GLUT4 auch durch die atypischen Proteinkinase C-Isoformen  $\xi/\lambda$  (aPKC) vermittelt. In einem Knockout-Modell der aPKC $\lambda$  wurde eine verminderte Glucoseaufnahme und Insulinresistenz im Skelettmuskel festgestellt, während die Phosphorylierung der Akt und AS160 nicht durch den Knockout beeinflusst wurden (Farese et al., 2007).

Auch die Aktivität des GLUT4 kann reguliert werden. Durch die, je nach Substratlage, reversible Bindung zweier Enzyme aus der Glycolyse, die Glycerinaldehydphosphat-dehydrogenase und die Hexokinase, an den GLUT4-Transporter wird dessen Aktivität reguliert (Zaid et al., 2009).

Analog zu IGF-1 führt Insulin zur Differenzierung von Myoblasten. Außerdem wirkt Insulin der atrophierenden Wirkung von Myostatin in Skelettmuskelzellen entgegen und führt bei langfristiger Exposition über die Aktivierung des PI3K/mTOR-Weges zu einer Hypertrophie des Skelettmuskels (Sharples and Stewart, 2011). Die Differenzierung wird in Teilen über das Akt-Substrat FoxO1a vermittelt. Damit diese stattfinden kann, muss FoxO1a aus dem Zellkern translozieren, ein konstitutives aktives FoxO1a kann die Differenzierung inhibieren (Hribal et al 2003). Allerdings wurde in einem Skelettmuskelzellenmodell auch beobachtet, dass durch die Translokation von FoxO1 die myogene Differenzierung inhibiert wurde (Hakuno et al., 2011).

### 1.4.2 Insulinresistenz im Skelettmuskel

Findet postprandial trotz Ausschüttung von Insulin keine schnelle Normalisierung des Blutglucosewerts statt, liegt der Zustand der Insulinresistenz vor. Kompensatorisch wird von den  $\beta$ -Zellen zunächst die Insulinausschüttung erhöht. Ein Ausbleiben dieser kompensatorischen Reaktion aufgrund pathologischer Prozesse führt zur Entwicklung von Typ 2 Diabetes. Hyperglykämie, Hyperlipidämie, die Notwendigkeit zur verstärkten Insulinsekretion sowie die damit verbundene Bildung von Amylin-Ablagerungen im Pancreas tragen zur Dysfunktion der  $\beta$ -Zellen und damit zur Pathogenese des Typ 2 Diabetes bei. Obwohl genetische Prädispositionen für Typ 2 Diabetes bekannt sind, handelt es sich hauptsächlich um eine chronische Krankheit, die durch Übergewicht und mangelnde körperliche Bewegung ausgelöst wird (DeFronzo, 2009). Besonders in den Wohlstandsgesellschaften der westlichen Welt ist Typ 2 Diabetes verbreitet und führt vor allem aufgrund renaler Komplikationen und erhöhter kardiovaskulärer Risiken zu einer gesteigerten Mortalität und einer enormen Kostensteigerung im Gesundheitswesen (Ali et al., 2010).

Die Insulinresistenz ist systemisch durch eine merklich reduzierte Glucoseaufnahme charakterisiert (DeFronzo et al., 1981), die von einer gestörten Insulinsignaltransduktion herrührt. So sind bei Patienten mit Insulinresistenz im Skelettmuskel die Tyrosinphosphorylierung an IRS1 und die PI3K-Aktivität verringert, sowie das Signaling der MAP-Kinase Erk1/2 verstärkt (Goodyear et al., 1995; Bjornholm et al., 1997; Cusi et al., 2000). Als Folge der verringerten IRS1-Phosphorylierung zeigen die Mediatoren der Insulinwirkung  $\alpha$ PKC (Kim et al., 2003) und Akt eine verringerte Aktivität (Krook et al., 1998; Kim et al., 1999). Das kann dann zu einer verringerten Translokation und Aktivität der GLUT4 führen (Shepherd und Kahn, 1999). Weitere Kinasen, deren Aktivität bei Insulinresistenz verändert ist, sind die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und die p38. In einem Leptin-defizienten Maussystem (*Ob/Ob*-Maus) war die durch Insulin ausgelöste Phosphorylierung dieser MAP-Kinasen verringert (Leng et al., 2004).

Ein wichtiges Akt-Substrat, das in Skelettmuskel exprimiert wird und Einfluss auf die Insulinresistenz hat, ist der Transkriptionsfaktor FoxO1a. So war eine muskelspezifische Überexpression von FoxO1a im Mausmodell durch eine schlechte glykämische Kontrolle, reduzierte Muskelmasse und eine verringerte Anzahl an *low-twitch* Muskelfasern (rote Muskelfasern) charakterisiert (Kamei et al., 2004). Mechanistisch konnten die beobachteten Effekte durch Expression von FoxO1a-Mutanten im C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Skelettmuskelzellmodell erklärt

werden. In C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen ist FoxO1a an der Differenzierung beteiligt. Die Expression von FoxO1a wird während der Differenzierung vermindert. In differenzierten Myotuben wird FoxO1a phosphoryliert und aus dem Nukleus transloziert. Die Expression einer konstitutiv aktiven Form inhibiert die Differenzierung, während ein dominant negatives FoxO1a die Inhibition der Differenzierung durch den PI3K-Inhibitor Wortmannin aufheben kann. Durch *Knockdown* von FoxO1a wird zusätzlich die Myosin-Expression erhöht (Hribal et al., 2003). Außerdem stehen die Atrophie-Gene Atrogin-1 und MuRF1 unter der Kontrolle von FoxO-Transkriptionsfaktoren, die durch den PI3K/Akt-Weg inhibiert werden (Stitt et al., 2004). Der atrophischen Wirkung von FoxO3 wird durch PGC-1 $\alpha$  entgegengewirkt, das die Expression der Atrophie-Gene unterdrückt (Sandri et al., 2006). Auch auf transkriptioneller Ebene nimmt FoxO1a Einfluss auf den Insulinsignalweg. So wird die Expression von Insulin-Rezeptor, IRS und des translationalen Repressors 4E-BP1 durch FoxO1a in Abhängigkeit von verfügbaren Nährstoffen reguliert (Puig et al., 2003). Außerdem wurde gezeigt, dass die Transkription der InsR-mRNA unter direkter Kontrolle von FoxO1 steht und eine Inaktivierung von FoxO1 durch Phosphorylierung zur Insulinresistenz über Verminderung der InsR-Expression beitragen kann (Puig und Tijan, 2005). Ein weiterer regulatorischer Einfluss auf FoxO erfolgt über JNK. Diese Kinase inhibiert die Insulinwirkung auf FoxO und sorgt unabhängig von PI3K/Akt für seine Relokalisation in den Zellkern (Wang et al., 2005). Gleichzeitig wird die Aktivität von JNK durch ROS induziert (Shen und Liu, 2006). JNK könnte also eine wichtige Schnittstelle zwischen ROS und Insulinsignalweg sein. Eine erhöhte zelluläre ROS-Produktion wird mit einem Fortschreiten der Insulinresistenz in Verbindung gebracht (Houstis et al., 2006; Erol, 2007). Weiterhin ist insulinresistentes Muskelgewebe durch eine verringerte Mitochondriengröße (Kelley et al., 2002) sowie eine verringerte Genexpression der an der oxidativen Phosphorylierung beteiligten Proteine charakterisiert (Mootha et al., 2003; Patti et al., 2003). Außerdem wurden eine geringere mitochondriale ATP-Produktion und eine langsamere Citratzyklus-Flussrate festgestellt (Stump et al., 2003). PGC-1 $\alpha$  ist ein transkriptioneller Koaktivator, der die Biogenese von Mitochondrien und die Genexpression der oxidativen Gene im Skelettmuskel kontrolliert und somit auch die metabolische Flexibilität des Skelettmuskels steuert. Metabolische Flexibilität bezeichnet die Fähigkeit des Skelettmuskels, von Glucose auf Fettsäuren als primär genutzte Energiequelle umzuschalten. Das kann den durch ein Überangebot an Lipiden induzierten Zustand der Insulinresistenz entscheidend mitbeeinflussen (Ukropcova et al., 2005). Bei Insulinresistenz wird PGC-1 $\alpha$  im Skelettmuskel vermindert exprimiert, was einen homöostatischen Mechanismus darstellen könnte, um der erhöhten ROS-Produktion der Mitochondrien bei Fettsäureoxidation zu

begegnen (Mootha et al., 2003; Benton et al., 2008b). PGC-1 $\alpha$  mediiert auch die Effekte der Muskeladaptation durch Bewegung. Für seine optimale Expression wird eine ausreichende Menge ROS benötigt. Eine Abweichung davon führt zu einer erhöhten oder verminderten Expression von PGC-1 $\alpha$  (Irrcher et al., 2009). Generell scheint die Wirkung von ROS im Skelettmuskel dem Konzept der Hormesis zu folgen. Wenig reaktive Sauerstoffspezies sind für die Funktion und Adaptation der Skelettmuskulatur nötig. Bei erhöhten Konzentrationen tritt eine Schädigung der Muskulatur ein (Calabrese und Baldwin, 2001; Powers et al., 2011). Bei Kontraktion der Skelettmuskulatur werden zusätzlich größere Mengen intrazelluläres ROS erzeugt (Jackson, 2008). Gleichzeitig wird durch körperliche Bewegung die Insulinsensitivität für einige Stunden verbessert (Maarbjerg et al., 2011). Ein Zusammenhang zwischen ROS und verbesserter Insulinsensitivität wird derzeit diskutiert. Zur Überprüfung dieses Konzepts wurde folgendes Experiment durchgeführt: Eine Gruppe gesunder Männer wurde einem 4-wöchigen Fitnesstraining unterzogen. Dies führte zu einer ROS-induzierten Steigerung der Genexpression bei PGC-1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$  (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor  $\gamma$ ), Superoxiddismutase 1 und 2 (SOD) sowie GPx1 im Skelettmuskel. Ein Teil dieser Männer erhielt zusätzlich eine tägliche Supplementation mit den Antioxidantien Vitamin C (500 mg) und Vitamin E (400 IU), die die erhöhte Genexpression unterdrückte (Ristow et al., 2009). Ähnliche Beobachtungen wurden bereits zuvor durch eine weitere Forschergruppe bei Menschen und im Rattenmodell gemacht (Gomez-Cabrera et al., 2005; Gomez-Cabrera et al., 2008). Weiterhin konnte in einem Skelettmuskelzellmodell durch das Antioxidans N-Acetylcystein die durch IGF-1 induzierte Signaltransduktion unterdrückt werden (Handayaningsih et al., 2011). Diese Ergebnisse legen nahe, dass nicht nur zuviel sondern auch zu wenig ROS eine verschlechterte Insulinsignaltransduktion bedeuten können und eine Akkumulation von Antioxidantien einen durchaus schädlichen Einfluss auf den Skelettmuskel haben können..

### **1.5 Selen und Selenoproteine in der Skelettmuskulatur**

In der Skelettmuskulatur befinden sich ca. 50% des im menschlichen Körper gebundenen Selens, was am großen Anteil des Skelettmuskels am Gesamtkörpergewicht liegt, obwohl die Selenkonzentration vergleichsweise niedrig ist. So werden im Skelettmuskel, bei Serumselenswert von ca. 70 ng/g, ca. 100 ng/g Selen gespeichert, während in der Niere ca. 700 ng/g und in Leber und Hoden ca. 300 ng/g vorhanden sind (Oster et al., 1988). Nichtsdestotrotz scheint der Skelettmuskel am stärksten von Selendefizienz betroffen zu sein, da sich diese besonders in Myopathien und Muskeldefekten niederschlägt. So zeigte sich in

verschiedenen Nutztieren eine ernährungsbedingte muskuläre Dystrophie, auch *White Muscle Disease* (WMD) genannt, bei der eine morphologische Veränderung und die Kalzifikation der Herz und Skelettmuskelfasern beobachtet wurde. Diese Symptome konnten auf Selendefizienz zurückgeführt und durch Selensupplementation aufgehoben werden (Schubert et al., 1961; Cantor et al., 1982). Beim Menschen kennt man mit der Keshan-Krankheit ein ähnliches Krankheitsbild, bei welchem es zu Kardiomyopathien und Kalzifikationen im Muskelgewebe kommt. Die Keshan-Krankheit tritt hauptsächlich in Regionen Chinas mit extrem niedrigem Selengehalt in den Ackerböden auf. Zum Ausbruch der Krankheit kommt es durch eine Infektion mit dem Cocksackie-Enterovirus, der nur im selendefizienten Status virulent wird. Ein breit angelegtes Selensupplementationsprogramm in den betroffenen Regionen Chinas konnte die Krankheit größtenteils eindämmen (Beck et al., 2003). Auch andere virus- und pathogeninduzierte Myopathien sind mit einer Abnahme der Muskelselenkonzentration und einer Zunahme an oxidativen Schäden assoziiert (Ward und Peters, 1992; Chariot et al., 1997). Patienten, die über einen längeren Zeitraum parenteral ernährt wurden, zeigten im Muskel eine verringerte GPx-Aktivität, was als Parameter eines selendefizienten Status angesehen wird. Zusätzlich wurden bei ihnen Muskelschwäche und Muskelschmerzen diagnostiziert. Auch hier wurde nach Gabe von Selen eine Linderung der Symptome beobachtet (Baptista et al., 1984).

Am stärksten ist eine Selendefizienz in Verbindung mit einer zusätzlichen  $\alpha$ -Tocopheroldefizienz (Vitamin E) ausgeprägt. So konnte eine Studie mit Meerschweinchen als Versuchsmodell zeigen, dass nur bei vollständiger Selen- und  $\alpha$ -Tocopheroldefizienz eine Myopathie auftrat, die mit verminderter Lipidperoxidation und Glutathionperoxidaseaktivität assoziiert war, wobei der molekulare Mechanismus nicht geklärt werden konnte (Hill et al., 2001).

Die Versorgung des Skelettmuskels mit Selen ist nicht vollständig aufgeklärt. So wurde der Selengehalt in der Skelettmuskulatur von SelP-KO-Mäusen nur um 35% gesenkt, während der Knockout des ApoER2-Rezeptor, der die Endozytose von Selenoprotein P vermittelt, zu keiner nennenswerten Reduktion des Selengehaltes der Muskulatur führte (Burk und Hill, 2009). Das lässt auf eine nicht nur von Selenoprotein P abhängige Selenversorgung sowie auf eine ApoER2 unabhängige Aufnahme von Selenoprotein P in der Skelettmuskulatur schließen.

Im Skelettmuskel ist im Vergleich zu anderen Geweben die Expression von zwei Selenoproteinen besonders hervorzuheben. Selenoprotein W (SelW) wurde als erstes muskelrelevantes Selenoprotein identifiziert und mit WMD assoziiert, da eine verringerte

Expression von SelW im Skelettmuskel vorgefunden wurde (zusammengefasst in Whanger, 2000). Die physiologische Funktion des SelW ist immer noch unklar. Durch Kernresonanzspektroskopie konnte seine Struktur allerdings aufgeklärt werden. Gemeinsam mit 5 anderen strukturverwandten Selenoproteinen (SelM, Sep15, SelV, SelT, SelH) wurde es in die Klasse der Rdx-Proteine eingeordnet. Diese Proteine besitzen eine dem Thioredoxin ähnliche Struktur und verfügen entweder über ein redoxaktives CxxC- oder UxxC-Motiv, welches mit dem reaktiven Zentrum der Thioredoxine vergleichbar ist (Aachmann et al., 2007). Über dieses kann es mit dem Cystein von Glutathion (Beilstein et al., 1996) oder 14-3-3 interagieren (Aachmann et al., 2007). In Ratten-Myoblasten wird SelW stark exprimiert, genauso wie in embryonalem Gewebe (Beilstein et al., 1996; Loflin et al., 2006). Bei der Differenzierung zu Myotuben findet eine allmähliche Verringerung der Selenoprotein W-Expression statt (Yeh et al., 1997). Eine moderate Regulation durch muskelspezifische Transkriptionsfaktoren wurde nachgewiesen (Noh et al., 2010). In *in vitro*-Systemen vermittelt Selenoprotein W einen glutathionabhängigen Schutz gegenüber oxidativem Stress (Jeong et al., 2002; Kim et al., 2005; Loflin et al., 2006). Aufgrund seiner stark selenabhängigen Regulation und seiner niedrigen Position in der Selenoproteinhierarchie wurde die Expression des SelW als Marker für den Selenstatus verschiedener Gewebe vorgeschlagen (Sunde, 2010).

Im Jahre 1999 wurde über einen bioinformatischen Ansatz das ebenfalls im Muskel hoch exprimierte Selenoprotein N (SelN) identifiziert (Lescure et al., 1999). SelN ist ein in zwei verschiedenen Spleiß-Varianten vorkommendes glycosyliertes ER-Protein, das mit verschiedenen Erkrankungen der Muskulatur in Verbindung gebracht wird. So wurden bei einer Form der kongenitalen Muskeldystrophie (*rigid spine*), der *Multicore*-Myopathie, sowie bei einer Desminopathie Mutationen im SelN-Gen (SEPN1) gefunden (zusammengefasst in Arbogast und Ferreira, 2010). Während in Myoblasten und fötalem Gewebe eine hohe Expression an SelN vorliegt, verringert sie sich drastisch in adultem Gewebe und Myotuben (Petit et al., 2003). Zur Funktion des Selenoprotein N wurde eine Studie in Zebrafischen durchgeführt. In dieser Studie zeigte sich, dass SelN mit Ryanodin-Rezeptoren (RyR) interagiert und über RyR Kalziumströme moduliert (Juryneć et al., 2008). Eine redoxaktive Regulation dieser Interaktion wird für möglich gehalten, da RyR bis zu 400 Cysteine enthalten können, und SelN ein CXXS-Motiv mit putativer Oxidoreduktase-Aktivität besitzt (Fomenko und Gladyshev, 2002).

Weitere Selenoproteine, deren Proteinexpression sich im Skelettmuskel zeigen, sind die Glutathionperoxidase 1 (Loh et al, 2009), die Thioredoxinreduktasen 1 und 2 (Kiermayer et al., 2007), sowie die Deiodinasen 2 und 3 (Ramadan et al., 2011). Selenoprotein K und Selenoprotein T sind ebenfalls an der Kalziumhomöostase im Skelettmuskel beteiligt (Lescure et al., 2009).

## **1.6 Molekulare Mechanismen der pro- und antidiabetischen Wirkungen von Selen**

In Abbildung 1.6 sind mögliche Interferenzpunkte von Selenverbindungen und Selenoproteinen mit der Insulinsignalkaskade dargestellt, die nachfolgend im Text genauer erläutert werden.

Die ersten Untersuchungen zum Einfluss von Selen auf die Insulinsignaltransduktion wurden in Adipozyten durchgeführt (Ezaki, 1990). Selenat in den Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  bis 100 mM zeigte eine verstärkte Tyrosinphosphorylierung an verschiedenen Proteinen der Insulinsignalkaskade und eine erhöhte Glucoseaufnahme. Daraufhin wurde im Skelettmuskel die Glucoseaufnahme bei Stimulation mit hohen Konzentrationen von Selenit und Selenat untersucht. Selenat im millimolaren Konzentrationsbereich induzierte eine Stimulation des Glucosetransports, Selenit steigerte in 30  $\mu\text{M}$  Konzentration die Glucoseaufnahme mit wesentlich geringerer Amplitude (Fürnsinn et al., 1996). In DU-145 Prostatakrebszellen wurde unter Einfluss von mikromolaren Konzentrationen von Selenit eine erhöhte Aktivität der PTEN festgestellt, die in einer verminderten Phosphorylierung der Akt resultierte (Berggren M et al., 2009). Auch Methylseleninsäure (MSeA) konnte in DU-145-Zellen die Phosphorylierung der Akt und von MAP-Kinasen vermindern (Jiang et al., 2002).

Eine Selensupplementation von Tiermodellen zeigte anfänglich antidiabetische Effekte. So führte die Supplementation mit supraphysiologischen millimolaren Konzentrationen an Selenat in diabetischen *db/db*-Mäusen und Streptozotocin-behandelten Ratten zu einer verbesserten Insulinsensitivität und Glucosehomöostase (McNeill et al., 1991; Becker et al., 1996). Streptozotocin führt zu einem Typ 1 Diabetes-ähnlichen Zustand durch RNS-induzierte Nekrose der  $\beta$ -Zellen. Die positiven Effekte des Selenats wurden auf eine Regulation glycolytischer und Gluconeogenese-Gene in der Leber zurückgeführt (Becker et al., 1996). Die eingesetzten hohen Konzentrationen können im Tiermodell aber auch toxische Effekte hervorrufen (Fürnsinn et al., 1995). Eine Supplementation mit anderen Selenverbindungen wie Selenit, Selenomethionin oder Methylselenocystein kann aufgrund von Toxizität und begrenzter Löslichkeit nicht in denselben Konzentrationen wie mit Selenat durchgeführt werden. Bei niedriger Dosierung von Selenverbindungen waren die im Tiermodell erzielten Ergebnisse nicht eindeutig. So führte eine Selensupplementation nicht immer zu einer Verbesserung des diabetischen Status, häufig traten auch prodiabetische Effekte auf (zusammengefasst in Mueller et al., 2009b).

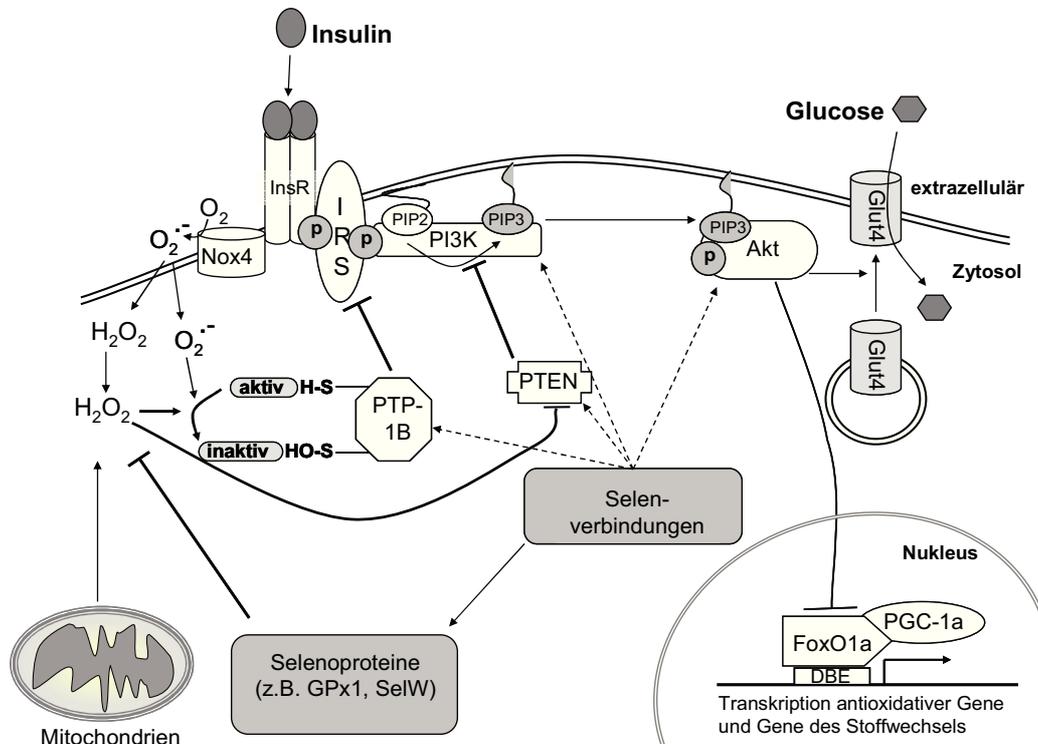
In einem *in vivo*-Modell wurde eine verminderte PTP-Aktivität unter Selenateinfluss festgestellt, während Selenit die PTP-Aktivität nicht veränderte (Mueller und Pallauf, 2006). Auch die Glutathionylierung der PTP1B wurde durch Selenat und Selenit unterschiedlich reguliert. *In vivo* führte Selenat zu einer stärkeren Inhibition der Glutathionylierung, *in vitro* wurde der Effekt umgekehrt und Selenit führte zur stärkeren Inhibition der PTP1B (Mueller et al., 2009a). Durch

diese Manipulation der Phosphataseaktivität wurde auch die Transkription beeinflusst. So erhöhte sich die Expression von Regulatoren der Fettsäuresynthese, wie des Transkriptionsfaktors SREBP1c (*sterol regulatory element-binding protein*) und des Enzyms FAS (*Fatty acid synthase*) (Mueller et al., 2008).

Verschiedene Studien zeigten *in vitro* eine Verringerung der reaktiven Sauerstoffspezies durch Selenit (Saito et al., 2003; Kim et al., 2004). Eine weitere Einflussmöglichkeit besteht in der seleninduzierten Biosynthese von zellulären Selenoproteinen, von denen die meisten ROS *in vivo* vermindern können (Reeves und Hoffmann, 2009). In einem transgenen Mausmodell mit systemischer Überexpression der GPx1 zeigte sich ein Phänotyp, der einem ausgeprägten Typ 2 Diabetes ähnlich war. Dabei war in Leber und Skelettmuskel die Phosphorylierung der Akt bei Insulinstimulation vermindert, was konsistent mit einer Insulinresistenz ist (McClung et al., 2004). Umgekehrt resultierte der *Knockdown* von GPx1 im Mausmodell in einer erhöhten Insulinsensitivität. Extrahierte embryonale Fibroblasten aus diesen Mäusen zeigten erhöhte intrazelluläre ROS-Spiegel sowie verstärkte PTEN-Oxidation und Akt-Phosphorylierung (Loh et al., 2009). Auch in MCF7-Mammakarzinomzellen war es möglich durch Selensupplementation GPx1 zu induzieren und dadurch die Phosphorylierung der p70S6-Kinase zu verringern, die durch mTOR aktiviert wird (Nasr et al., 2004). Nicht nur intrazelluläre Selenoproteine können die Insulinwirkung beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass Selenoprotein P in hohen Konzentrationen zu Insulinresistenz im peripheren Gewebe eines Mausmodells führen konnte. Zusätzlich konnte eine Korrelation zwischen Typ 2 Diabetes und Serumniveaus von Selenoprotein P hergestellt werden (Misu et al., 2010). Allerdings kann nicht nur eine Überexpression, sondern auch die verringerte Expression von Selenoproteinen, Symptome hervorrufen, die einen Typ 2 Diabetes ähneln. So führte die verminderte Expression eines Sets an hierarchisch niedriger Selenoproteine bei Mäusen zu Glucoseintoleranz, Hyperglykämie und Hyperinsulinämie (Labunsky et al. 2011).

Beim Menschen werden Selenpräparate unter anderem zur Krebsprävention eingesetzt. Im Rahmen der NPC-Studie (*National Prevention of Cancer*) wurden 200 µg Selen/Tag in Hefeform über 13 Jahre an die Teilnehmer verabreicht. Es zeigte sich eine geringe Verbesserung in der Krebsmortalität bei Lungen-, Darm- und Prostatakrebs (Clark et al., 1996). Durch eine nachträgliche durchgeführte Analyse wurde allerdings ein signifikant erhöhtes Diabetesrisiko in der Selensupplementationsgruppe festgestellt (Stranges et al., 2007). Besonders bei einem hohen Serumselewert von mehr als 121.6 µg/mL (oberes Tertil) war das Diabetesrisiko um das 2,4-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Eine

weitere großangelegte Studie zur Krebsprävention durch Selen und Vitamin E (*SELECT = Selenium und Vitamin E Cancer Prevention Trial*) führte zu keinem positiven präventiven Effekt und wurde vorzeitig abgebrochen. Hier zeigte eine Analyse des Diabetesrisikos eine Tendenz zu höherem Risiko für Typ 2 Diabetes in der Selensupplementationsgruppe (Lippman et al., 2009).



**Abbildung 1.6: Angriffspunkte von Selenverbindungen und Selenoproteine in der Insulinsignalkaskade (nach Steinbrenner et al., 2011).**

Weitere epidemiologische Studien konnten hohe Plasmaselenwerte ebenfalls mit Typ 2 Diabetes-assoziierten Parametern, wie erhöhten Plasma-*non*-HDL-Cholesterinwerten korrelieren (Stranges et al., 2010a; Stranges et al., 2010d). Andererseits zeigte sich in einigen epidemiologische Studien keine Korrelation zwischen Selensupplementation und Typ 2 Diabetes (Czernichow, 2006). Die Mehrheit der derzeit publizierten Studien deutet aber darauf hin, dass Selensupplementation ein Risikofaktor bei der Entwicklung eines Typ 2 Diabetes sein kann. Um Empfehlungen für eine optimale Selenversorgung festlegen zu können besteht ein großes Interesse, die den potentiell adversen Effekten von Selen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zu identifizieren.

## 2 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte für die Skelettmuskulatur untersucht werden, wie die Insulinsignalkaskade und der Glucosestoffwechsel in einem Insulinzielgewebe bei Supplementation mit Selenverbindungen beeinflusst werden.

Mehrere epidemiologische Studien wie auch diverse Tierversuche haben Hinweise geliefert, dass supraphysiologische wenngleich nicht-toxische Selendosen, sowie die erhöhte Expression von Selenoproteinen, das Risiko für Typ 2 Diabetes erhöhen oder metabolische Parameter beeinflussen, die mit der Entwicklung von Typ 2 Diabetes assoziiert sind (Stranges et al., 2007, Mueller et al., 2009, Labunsky et al., 2011). Die molekularen Mechanismen, die einer potentiell adversen Wirkung von supraphysiologischen Selendosen zugrunde liegen, sind bisher nur unzureichend verstanden.

Eine Validierung des Selenstatus der untersuchten Modellorganismen sollte durch Bestimmung der Genexpression, Proteinexpression und Enzymaktivität der Selenoproteine erfolgen.

1) Das L6.C11 Skelettmuskelzellmodell wurde für die Bearbeitung grundlegender Fragestellungen herangezogen. Es sollte geklärt werden, in wie weit diverse, bei Human- und Tierstudien eingesetzte, organische und anorganische Selenverbindungen einen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus der Akt sowie weiterer Proteine der Insulinsignalkaskade haben. Zusätzlich sollten insulinabhängige Parameter, wie die Glucoseaufnahme, untersucht werden. Durch Selenverbindungen kann auf zellulärer Ebene das Niveau der reaktiven Sauerstoffspezies beeinflusst werden, welche wiederum an der Signalübertragung von Insulin beteiligt sind (Goldstein et al., 2005). Deshalb sollte die zelluläre Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies untersucht werden.

2) Anhand primärer humaner Muskelzellen sollte dann analysiert werden, ob Selenoprotein P, das wichtigste Selentransportprotein, molekulare Effekte hervorrufen kann, die mit einer Insulinresistenz assoziiert sind.

3) Die Auswirkungen einer Ernährung mit erhöhtem Selenanteil, wie er in den epidemiologischen Studien eingesetzt wurde, sollte durch eine Suppletionsstudie in *Sus Scrofa* nachgestellt werden, da der Schweinemetabolismus dem menschlichen sehr ähnlich ist. Hierbei sollten neben dem Skelettmuskel, auch Fettgewebe und Leber, als weitere Insulinzielgewebe, auf die Insulinsignaltransduktion und Genexpression untersucht werden.

## 3 Material und Methoden

Allgemeine Laborchemikalien wurden von Sigma und Roth bezogen, falls es im Text nicht anders erwähnt wird. Kleingeräte, die zur allgemeinen Grundausstattung für molekularbiologische und zellbiologische Labore gehören, entsprachen dem allgemeinen Standard und werden hier nicht aufgeführt. Methodenspezifische Geräte finden sich mit ihrer jeweiligen Typenbezeichnung unter der Beschreibung der entsprechenden Methode aufgeführt. Verbrauchsmaterialien aus Plastik wurden, falls im Text nicht anders erwähnt, von Greiner (Frickenhausen, Deutschland) geliefert. Zum Ansetzen der Puffer und Lösungen wurde Wasser in Millipore-Qualität verwendet.

### 3.1 Materialien

#### 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 I: 5 % (w/v) Trockenmilchpulver in TBST

Blockierlösung II: 5% (w/v) Bovines Serum Albumin in TBST

Gel-Ladungspuffer für Proteine (4x): 300 mM Tris-HCl pH 6.8; 8 % SDS; 40 % Glycerin; 400 mM  $\beta$ - 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<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4)

Polyacrylamidgel (für SDS-PAGE)

5 % Sammelgel: 720  $\mu$ l Rotiphorese Gel 40 (37,5:1); 650  $\mu$ l Tris 1 M, pH 6,8;

3.5 ml Wasser; 50  $\mu$ l SDS 10% (w/v); 50  $\mu$ l APS 10% (w/v); 5  $\mu$ l 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  $\mu$ l SDS 10% (w/v); 100  $\mu$ l APS 10% (w/v); 5  $\mu$ l TEMED

17% Trenngel. 4.25 ml Rotiphorese Gel 40 (37,5:1); 2.5 ml 1,5 M Tris, pH 8,8;

2.0 ml Wasser; 100  $\mu$ l SDS 10% (w/v); 100  $\mu$ l APS 10% (w/v); 5  $\mu$ l TEMED

RIPA-Puffer : 150mM NaCl, 1% Igepal CA 630, 0.5% DOC (Deoxycholsäure), 0.1% SDS, 50mM Tris pH 8.0

TAE : 40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA (pH 8.0)

TBST: 5 mM Tris-HCl (pH 7.5); 15 mM NaCl; 0.01 % (v/v) Tween-20

#### 3.1.2 Kits und Hilfsmaterialien

Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega, Madison, Wisconsin, USA)

Proteinbestimmung nach Lowry : DC Assay Kit ( Biorad, München)

GeneJet Plasmid Minipräp Kit (Fermentas, St Leon-Rot)

High Fidelity PCR System (Invitrogen, Karlsruhe)

LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Reaction Mix (Roche, Mannheim)

NE-PER Nuclear und Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific, Bonn)

Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden)

Qiaquick PCR purification Kit (Qiagen, Hilden)

RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden)

SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, Bonn)

Gel DNA Recovery Kit (Fermentas, St Leon-Rot)

Akt-Activity Kit (Promokine, Heidelberg)

#### 3.1.3 Antikörper

##### Primäre Antikörper

**Tabelle 3.1: Eingesetzte primäre Antikörper**

<i>Antigen</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Artikelnr.</i>	<i>Donor</i>
Akt pan	Cell Signaling	4685	Kaninchen
AMPK $\alpha$ (23A3)	Cell Signaling	2603	Kaninchen
$\beta$ -Aktin (13E5)	Cell Signaling	4970	Kaninchen
Desmin	Cell Signaling	4024S	Kaninchen
FAK (total)	Cell Signaling	3285	Kaninchen
FoxO1a	Cell Signaling	9454S	Kaninchen
FoxO3	Upstate	07-702	Kaninchen
GPx1	Epitomics	3120-1	Kaninchen

<b>Antigen</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnr.</b>	<b>Donor</b>
P38	New England Biolabs (NEB)	9212	Kaninchen
PGC-1	Santa Cruz	sc-13067	Kaninchen
Phospho -Akt(T308)	Cell Signaling	2965	Kaninchen
Phospho -Akt(S473)	Cell Signaling	9271S	Kaninchen
Phospho -FoxO1a(Thr24)/ Phospho -FOXO3(T32)	Cell Signaling	9464S	Kaninchen
Phospho-AMPK1 $\alpha$ (T172)	Cell Signaling	2535	Kaninchen
Phospho-Erk1/2	Cell Signaling	4376	Kaninchen
Phospho-FAK (Tyr397)	Cell Signaling	3283	Kaninchen
Phospho-GSK3 $\alpha/\beta$ (Ser21/9)	Cell Signaling	9327	Kaninchen
Phospho-JNK (Thr183/Tyr185)	Cell Signaling	9251	Kaninchen
Phospho-P38(T180/Y182)	Cell Signaling	9211S	Kaninchen
Phospho-STAT3(Tyr705)	Cell Signaling	9135	Kaninchen
PTEN	Epitomics	1539-1	Kaninchen
Selenoprotein N	Santa Cruz	sc-98960	Kaninchen
Selenoprotein P	Santa Cruz	sc-22639	Ziege
Selenoprotein P, human	Eurogentec	s.u.*	Kaninchen
Selenoprotein W	Rockland	600-400-A29	Kaninchen
Thioredoxin reductase	Santa Cruz	sc-28321	Maus

\*Selenoprotein P human. Der polyklonale Antikörper wurde nach Mostert et al. (1998) mittels Affinitätschromatographie aus dem Serum von Kaninchen gewonnen, die mit einem an KLH (*keyhole limpet haemocyanin*) gebundenen Epitop des humanen SeP-Proteins (AS 244-258) immunisiert worden waren.

## Sekundäre Antikörper

**Tabelle 3.2: Eingesetzte sekundäre Antikörper**

<i>Antigen</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Artikelnr.</i>	<i>Donor</i>
goat IgG HRP	Santa Cruz	Sc-2020	Esel
mouse IgG_HRP	Pierce	32230	Ziege
rabbit IgG (H+L)-HRP	Dianova	111-035-144	Ziege

### 3.1.3 Verwendete niedermolekulare Selenverbindungen

Die in Abbildung 3.1 dargestellten Selenverbindungen wurden von Sigma-Aldrich als Feststoffe bezogen und für die Zellkulturversuche in H<sub>2</sub>O gelöst. SeMet wurde als 10 mM Stammlösung angesetzt und bis zur Anwendung bei -20°C gelagert. Selenit und Selenat wurden in 100 mM Stammlösungen angesetzt und ebenfalls bei -20°C gelagert. MSeA wurde für jedes Zellkulturexperiment in 100 mM Konzentration neu gelöst, um eine vorzeitige Hydrolyse und Freisetzung von Methylselenol zu verhindern. Diese vier Verbindungen wurden in Konzentrationen von 20 nM bis 100 µM in L6.C11-Zellen zur Supplementation eingesetzt. Außerdem wurden SeMet und Selenit als Vergleichsverbindungen für Selenoprotein P eingesetzt. Selenocystin wurde ebenfalls als Vergleichsverbindung für SeLP eingesetzt, konnte 10 mM (bei pH 9) gelöst werden und wurde bei -20°C gelagert.

SeMet, Selenit und Selenat sind Verbindungen die zur Nahrungsergänzung im Mensch und Tieren in der EU freigegeben sind (Rayman et al., 2008). MSeA wurde als mögliches Krebstherapeutikum gehandhabt (Berggren M et al., 2009).

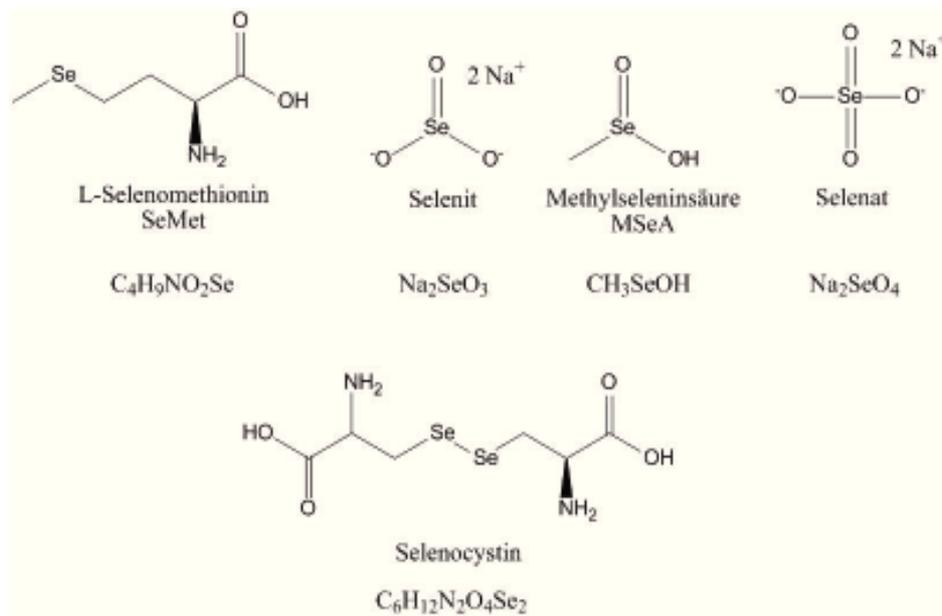


Abbildung 3.1: In der Zellkultur eingesetzte Selenverbindungen

## 3.2 Zellkultur

### 3.2.1 Zellen

#### HepG2

HepG2 Zellen stellen eine humane Hepatomzelllinie dar, die aus dem Leberkarzinom eines 15 Jahre alten männlichen Individuums mitteleuropäischer Herkunft etabliert wurde. Die Zellen wachsen adherent und sind ein geeigneter *in-vitro* Donor für humanes Selenoprotein P (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 35 Passagen in Kultur gehalten.

#### Primäre Rattenhepatozyten

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

#### L6.C11

Es handelt sich dabei um eine myogene Zelllinie, die aus der Leistenskelettmuskulatur einer Wistar Ratte isoliert wurde (Yaffe, 1968). Diese Zelllinie kann zu Myotuben, also der

kleinsten Einheit der Muskelfasern ausdifferenziert werden. Die L6.C11 wurden von der European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, Wiltshire, UK) bezogen. Die Differenzierung zu Myotuben wurde durch 6-tägige Inkubation der Zellen in Differenzierungsmedium herbeigeführt.

#### **HSKMC**

Primäre humane Skelettmuskelzellen (HSKMC) wurden von der Firma Provitro (Berlin) bezogen. Diese wurden unter den ethischen Standards der Charité Berlin freiwilligen Spendern entnommen. Diese Zellen können aufgrund ihrer begrenzten Anzahl an möglichen Zellteilungen, nur für wenige Wochen für Experimente genutzt werden. Zur Kultivierung und Passage wurde ebenfalls von Provitro *human skeletal muscle cells growth medium with supplement* und *primary cells passage kit 2* bezogen. Zur Differenzierung wurden die HSKMC für 4 Tage in *skeletal muscle cell differentiation medium with supplements* inkubiert. Auf Antibiotika im Kultur-, Differenzierungs- und Versuchsmedium wurde verzichtet um negative Effekte auf die Proliferation auszuschliessen.

#### **3.2.2 Zellkulturmedien**

##### **HepG2 Kulturmedium**

10% fötales Kälberserum (FKS) (PAA, Pasching, Österreich)

RPMI-1640 (Sigma-Aldrich)

2 mM L-Alanyl-L-Glutamin („Glutamax“, Invitrogen)

Pen/Strep 1x (100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin, PAA)

##### **HepG2 Versuchsmedium**

RPMI-1640

2 mM L-Alanyl-L-Glutamin („Glutamax“)

Pen/Strep 1x (100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin)

##### **Kulturmedium für primäre Rattenhepatocyten**

Williams' Medium E (Invitrogen, No.: 22551-022)

2 mM L-Alanyl-L-Glutamin („Glutamax“)

Pen/Strep 1x (100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin)

5 % (v/v) fötales Rinderserum  
100 nM Insulin; 100 nM Dexamethason

### **Versuchsmedium für primäre Rattenhepatozyten**

Williams' Medium E (Invitrogen, No.: 22551-022)  
2 mM L-Alanyl-L-Glutamin („Glutamax“)  
Pen/Strep 1x (100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin)

### **L6.C11 Kulturmedium**

10% FKS  
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)  
2 mM L-Alanyl-Glutamin („Glutamax“)  
Pen/Strep 1x (100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin)

### **L6.C11 Differenzierungsmedium**

2% Pferdeserum  
Dulbecco's modified eagle medium  
2 mM L-Alanyl-Glutamin („Glutamax“)  
Pen/Strep 1x (100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin)

### **L6.C11 Versuchsmedium**

Dulbecco's modified eagle medium  
2 mM L-Alanyl-L-Glutamin („Glutamax“)  
Pen/Strep 1x (100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin)

## **HSKMC Provitro Medien und Supplemente**

### **Skeletal muscle cell growth medium**

500 ml Medium mit Supplementen beinhalten:  
5 % FKS  
50.00 µg / ml Fetuin,  
10.00 ng / ml EGF (*epidermal growth factor*),  
1.00 ng / ml bFGF (*basic fibroblast growth factor*),

10.00 µg / ml Insulin

400.00 ng / ml Dexamethason

#### **Skeletal muscle cell differentiation medium**

500 ml Medium mit Supplementen beinhalten:

10.00 µg / ml Insulin

#### **3.2.3 Kultivierung von Zellen aus Mensch und Ratte**

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einem Sterilarbeitsplatz durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank (Binder) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert, Zellkulturmedien waren, wenn nicht anders beschrieben auf 37°C vorgewärmt. 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 5 min 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 für 5 min bei 250-500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet je nach Zelldichte in 4-10 ml Medium resuspendiert. Die Zellen wurden manuell (Neubauer-Zählkammer, Brand, Wertheim) oder automatisch (Countess Automated Cell Counter, Invitrogen) gezählt und in definierter Zellzahl für Versuche und Kulturpassagen ausgesät. Für die Cryokonservierung wurde ähnlich verfahren, nach Pelletierung wurden die Zellen in Gefriermedium (Kulturmedium mit 20% FCS und 10% DMSO) resuspendiert, auf mind. 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt und vorsichtig in Cryoröhrchen pipettiert. Dann wurden die Zellen bei -80°C bzw. bei -196°C aufbewahrt. Das Auftauen von Cryokulturen erfolgte im 37°C Wasserbad, anschließend wurde die Cryokultur innerhalb von 2 min mit 5 ml Kulturmedium versetzt. Die Zellsuspension wurde bei 250-500 g für 5 min zentrifugiert um sie von DMSO zu befreien. Das Zellpellet wurde in einer kleinen Menge Kulturmedium resuspendiert und auf eine mit vorgewärmtem Kulturmedium vorbereitete 75 cm<sup>2</sup> oder 175 cm<sup>2</sup> Filterdeckel-Zellkulturflasche (Greiner BioOne, Solingen, Deutschland) gesetzt. In regelmäßigen Abständen wurden die Kulturen mit dem VenorGem-Kit (Minerva Biolabs) auf Mykoplasmenkontamination überprüft.

### 3.2.4 Bakterienzellkultur

Plasmide wurden in *E.coli*-Bakterien (Stamm K-12, Fusion-blue competent cells, Clontech, St-Germain-en-Laye, Frankreich) 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 Ampicillin (50 µg/ml) oder Kanamycin (30 µg/ml), welche durch die Expression eines auf dem jeweiligen Plasmid codierenden Proteins inaktiviert wurden.

### 3.2.5 Gewinnung von angereichertem Selenoprotein P

Die HepG2 Zelllinie sezerniert bei Gabe eines geeigneten Selendonors große Mengen an Selenoprotein P, das aus den Überständen isoliert bzw. angereichert werden kann. HepG2 Zellen wurden bis ca. 80% Konfluenz in 175 cm<sup>2</sup> Kulturmedium gezüchtet. Dann wurde die HepG2 Kultur in Versuchsmedium mit 100 nM Selenit 8-16 h inkubiert und anschließend das Medium verworfen. Neues Versuchsmedium mit 100 nM Selenit wurde für 48 h auf die Zellen gegeben. Danach wurde das Medium in sterile 50 ml Röhrchen überführt und einmal bei 5000 rpm 10 min lang zentrifugiert. Überstände wurden ohne Zelltrümmer in neue Röhrchen überführt. Die Kontrollüberstände wurden ohne Gabe von Selenit gesammelt. In Vivaspin 15R Konzentratorsäulen (Sartorius, Aubagne, Frankreich) wurden die Überstände ca. 50fach aufkonzentriert, anschließend erfolgte eine Selenbestimmung mit 2,3-Diaminonaphthalin (s. unten).

## 3.3 Selensupplementationsmodell *Sus Scrofa*

### 3.3.1 Tierhaltung

Insgesamt 12 männliche Mastschweine, 13-14 Wochen alt, erhielten 16 Wochen lang eine selenadäquate bzw. eine selenreiche Ernährung (je n = 6), um ihren finalen Se-Status einzustellen. Die Schweine wurden an der landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Reading (Großbritannien) unter der Aufsicht von Dr. Darren Juniper gezüchtet und in zwei Gruppen aufgeteilt: Die Selen adäquaten Tiere erhielten eine Kohlenhydrat-Diät (vor allem Weizen und Soja), die einen Se-Gehalt von 0,17 mg/kg TS (Trockensubstanz) hatte. Die Schweine mit der Se-reichen Ernährung erhielten die gleiche Basaldiät angereichert mit Selenhefe (Sel-Plex, Alltech, USA), welche zum Zeitpunkt der Herstellung zugesetzt wurde, und zu einer Konzentration von 0,5 mg Se/kg TS führte. Allen Schweinen wurde ad libitum Zugang zu Wasser gewährt, die Nahrungsaufnahme war für beide Gruppen anfangs auf 1,5

kg/Tag und Schwein begrenzt und wurde während des Wachstums auf 2.5 kg/Tag angehoben. Vor der Schlachtung wurde das Gewicht der Tiere bestimmt.

### 3.3.2 Sammeln von Blut- und Gewebeproben

Den Schweinen wurde 24 h Stunden vor Schlachtung keine Nahrung mehr zugeführt. Das Blut wurde bei der Schlachtung aus der Halsschlagader entnommen, Serum wurde durch Koagulation bei RT und anschließender Zentrifugation erzeugt. Plasmaproben wurden direkt zentrifugiert. Ebenfalls zum Zeitpunkt der Schlachtung wurden Proben von Leber (linker Leberlappen), Skelettmuskel (*m. gluteus superficialis*) und viszeralem Fettgewebe mit Skalpellen aus der gekühlten Tierleiche entfernt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80°C gelagert. Blutanalysen wurden an der Universität von Surrey (Guildford, England) von Mert Sanil erstellt. Die Gewebeproben wurden auf Trockeneis nach Düsseldorf transportiert. Die Gewebe wurden unter Stickstoff und auf Trockeneis gemörsert, und im für die Methode entsprechenden Puffer aufgenommen und homogenisiert.

### 3.3.3 Ethische Bestimmungen

Die Behandlung und Tötung der Tiere wurden unter Einhaltung des *Animals Scientific Procedures Act 1986 UK* durchgeführt und von der Ethikabteilung der Universität Surrey genehmigt. Da es sich bei dieser Pilotstudie nicht um einen Tierversuch im Sinne des Gesetzes handelte, wurden alle Proben nur nach Tötung der Tiere entnommen und als Organentnahme gehandhabt.

## 3.4 Biochemische Methoden

### 3.4.1 Western Blot

SDS-PAGE-Gele wurden mit 10% oder 17% Acrylamid-Gehalt hergestellt und mit einem 5%igen Sammelgel ausgestattet.

Zellen wurden mit RIPA-Buffer versehen und mit einem Zellschaber auf Eis lysiert, Gewebeproben wurden mit *Proteojet Mammalian Tissue Extraction Buffer* aufgeschlossen, beiden Puffern wurden Proteaseinhibitor und Phosphataseinhibitor zugesetzt. Der Proteingehalt der Lysate wurde mit dem DC-Assay Kit aus der Absorption bei 750 nm Wellenlänge nach Lowry bestimmt. 30-50 µg Lysat wurden mit 4x Laemmli-Puffer versetzt und auf 95°C erhitzt. Nach Erkalten wurden die Proben auf 10% bzw. 17%ige SDS-PAGE-Gele gemeinsam mit Pageruler™, einem vorgefärbten Proteinmarker (Thermo Scientific-

Fermentas), aufgetragen und elektrophoretisch unter konstanten Strom (0.04 Ampere/Gel) nach dem Molekulargewicht der Proteine aufgetrennt. Nach erfolgter Auftrennung wurden die Proteine in einer Semi-Dry-Blotapparatur unter Anlegen von  $1.5 \text{ mA/cm}^2$  für 75-90 min auf eine PVDF-Membran (Hybond-P, General Electrics Healthcare, München) transferiert. Die Übertragung der Proteine wurde mit einer Ponceau S-Lösung (Sigma-Aldrich) überprüft, die durch wiederholtes Waschen mit TBST wieder entfernt wurde. Anschließend wurden die Membranen für 1 Stunde in Blockierlösung I inkubiert und danach mit TBST gewaschen. Der primäre Antikörper (s. Tabelle 3.1) wurde je nach Angabe des Herstellers in Blockierlösung I oder II auf 1:300 bis 1:1000 verdünnt und unter ständiger Bewegung bei  $4^\circ\text{C}$  über Nacht inkubiert. Nach  $3 \times 15 \text{ min}$  Waschen in TBST wurden die Membranen bei RT mit Sekundär-Antikörper (s. Tabelle 3.2) in einer Konzentration von 1:5000 - 1:20000 für 1-2 Stunden versehen. Zum Einsatz kamen mit Meerrettichperoxidase konjugierte Antikörper, diese wurden zum Nachweis der Proteine durch Chemilumineszenz benötigt. Dazu wurde die Membran für 5 min mit SuperSignal West Pico oder Femto Chemilumineszenz Substraten, die Luminol und ein Hydroperoxid enthalten, versehen. Danach wurde die Membran unter Dunkelraumbedingungen mit einem lichtsensitiven Film (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) belegt, auf welchem die spezifische Immunreaktion auf die untersuchten Proteine durch emittierte Lichtquanten nach Entwicklung als Schwärzung sichtbar wurde.

### 3.4.2 Bestimmung des Selengehaltes mit 2,3-Diaminonaphthalin

Der Selengehalt wurde in Anlehnung an (Sheehan und Gao, 1990)

In ein Reagenzglas (Brandt) wurden  $100 \mu\text{l}$  Serum, Zellkulturüberstandkonzentrat oder Zellysate gegeben. Dazu wurden  $500 \mu\text{l}$  Säuremischung ( $\text{HNO}_3$  65%/  $\text{HClO}_4$  70% 3:2) hinzugefügt und der Ansatz bei  $190^\circ \text{C}$  90-120 min erhitzt. Das Reaktionsgefäß wurde abgekühlt und durch Zugabe von  $500 \mu\text{L}$  konzentrierter  $\text{HCl}$  wurden entstandene nitrose Verbindungen für 30 min bei  $150^\circ \text{C}$  zersetzt. Nach erneuten Abkühlen wurden 2 ml EDTA (2,5 mM pH 8.0) und  $500 \mu\text{L}$  2,3-Diaminonaphthalin (DAN) (6,3 mM in 0,1 M  $\text{HCl}$ ) und 3 ml Cyclohexan hinzugeben. Nach Zuschrauben der Reagenzgläser wurden diese 30 min bei  $60^\circ \text{C}$  erhitzt. Danach wurden die Reagenzgläser 15 min geschüttelt und anschließend stehend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Cyclohexanphase wurde in Eppendorf-tubes überführt und in einer Quarzküvette wurde die Fluoreszenz des gebildeten Se-DAN bestimmt. Dazu wurde ein Emissionsspektrum von 490-580 nm Wellenlänge bei 366 nm Anregungswellenlänge aufgenommen. Aus den Emissionsmaxima bei 520 nm wurde, durch Erstellen einer Kalibriergeraden aus Selenitstandards, der Selengehalt der Probe bestimmt. Die Konzentration der Überstände ergab Selenkonzentrationen ca. 750-800 nM. In der

Zellkultur wurden Konzentrationen von 200 nM SelP eingesetzt, so musste nur ca. ein  $\frac{1}{4}$  des Inkubationsmediums mit Selenoprotein P angereichertem HepG2-Überständen ersetzt werden

#### 3.4.3 GPx-Aktivitätsbestimmung in Zellkultur- und Gewebelysaten

Die GPx-Aktivität wird durch einen gekoppeltenoptischen Test gemessen. Die Umsetzung des Glutathion zu GSSG durch GPx wird durch eine zweite gekoppelte Reaktion bestimmt. Die Regeneration von GSSG durch die Glutathionreduktase unter Verbrauch von NADPH zu NADP<sup>+</sup> wird photometrisch verfolgt.

**Tabelle 3.3: GPx-Assay-Puffer**

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>
Tris	100 mM
EDTA	5 mM
NaN <sub>3</sub>	1 mM
Triton-X100	0,1% (v/v)

pH 7,6 mit HCl einstellen

Zellkulturproben wurden einmal mit PBS gewaschen, dann mit einem Zellschaber in 1 ml PBS abgekratzt und in ein Eppendorfröhrchen überführt und 5 min bei 500 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 150  $\mu$ L GPx-Assay-Puffer lysiert und anschließend 10-15 Sekunden mit Ultraschall aufgeschlossen. Es wurde bei 6000g 5 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf überführt. Gewebeproben wurden im Proteojet Mammalian Tissue Extraction Buffer (Fermentas) aufgenommen und ebenfalls nur die Überstände verwendet. In 940  $\mu$ l GPx-Assay-Puffer wurden 650 mU/ml Glutathionreduktase (Sigma-Aldrich), 3 mM GSH, und 250  $\mu$ M NADPH vorgelegt und anschließend 50  $\mu$ L Lysat hinzugefügt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10  $\mu$ l *tert*-BuOOH (5 mM, finale Konzentration 50  $\mu$ M) gestartet. Die Aktivität der GPx wurde durch Messung der Abnahme der Absorption bei 340 nm ( $\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,2 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bei 340 nm) mit einem Perkin-Elmer Lambda 25 bestimmt. Die Messungen wurden für 4 min aufgezeichnet. Der Nullwert ohne Zugabe von Lysat aber mit *tert*-BuOOH dient als Basallinie. Vor dem Start der Messung wurde der Ansatz in der Quarzküvette mit einem Plastikspatel verrührt. Die Berechnung erfolgt als nmol NADPH/min\*mg (= mU/mg).

### 3.4.4 Thioredoxinreduktase-Aktivitätsmessung in Zellkultur- und Gewebelysaten

Leber- und Skelettmuskel von Schweinen wurde in Proteojet Mammalian Tissue Extraction Buffer (Thermo Scientific-Fermentas) homogenisiert. Die Thioredoxinreduktase-Aktivität in den Lysaten wurde über die Reduktion von DTNB (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure) zu 5'-Thio-2-nitrobenzoesäure (TNB) durch Beobachtung der Zunahme der Absorption bei 412 nm bei Raumtemperatur gemessen (Arnér und Holmgren, *Current Protocols in Toxicology* (2000) 7.4.1-7.4.14). In einer 96-Well Platte wurden 25 µl Homogenat zu 200 µl 100 mM Phosphatpuffer pH 7.0 mit 2 mM EDTA, 9 mM DTNB und 0.4 mM NADPH mit oder ohne 25 µM Auranofin hinzugegeben. Der Anstieg der Absorption bei 412 nm wurde mit einem BioTek KC4 plate reader (Biotek, Winooski, Vermont, USA) 10 min aufgezeichnet.

Aufgrund der niedrigen Aktivität der Thioredoxinreduktase im Fettgewebe wurde hier eine Endpunktbestimmung der TrxR-Aktivität durchgeführt. Dazu wurden 200 µl 1M HEPES pH 7.6, 40µl 0.2 M EDTA, 40 µl 40 mM NADPH und 500 µl Insulin (10 mg/ml) in einem Reaktionsgefäß zusammengegeben. Zum Start der Reaktion wurden 10 µl Thioredoxin (60 µM) und 70 µl Fettgewebekomogenat zugegeben und der Ansatz für 20 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 500µl 1 mM DTNB/ 6 M Guanidiniumhydrochlorid in 0.2 M Tris/HCl pH 8.0 wurde die Reaktion gestoppt und die Absorption bei 412 nm aufgezeichnet.

### 3.4.5 Akt-Aktivitätsmessung

Zur Bestimmung der Akt-Aktivität wurde ein Kit von Promokine verwendet. Dazu wurden  $4 \times 10^6$  HSKMC pelletiert und in 200 µl eiskaltem Kinaseextraktionspuffer 5 min lang lysiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 12000 g entfernt. Mit den Überständen wurde eine Immunpräzipitation mit einem Akt-spezifischen Antikörper durchgeführt, der an Protein A Sepharosebeads gebunden war. Die Sepharosebeads wurden dann mit dem Aktsubstrat GSK3α und mit ATP 2,5 h bei 30°C inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden zentrifugiert und die Überstände wurden der Western Blot Prozedur (3.7.1) unterzogen. Phosphoryliertes GSK3α wurde durch einen spezifischen anti-phospho-GSK3α (Ser21) Antikörper bei 37kDa Molekulargewicht per Chemilumineszenz nachgewiesen.

### 3.4.6 Alanin-Aminotransferase Aktivität

Alanin-Aminotransferase (ALT) Aktivität in Plasmaproben der Schweine wurde mit dem Fluitest® ALT Assay (Analyticon, Lichtenfels) bestimmt. Die Assayreagenzien R1 und R2 wurden 1:5 gemischt und ergaben einen Reaktionsmix mit 100 mM Tris pH 7.8, 500 mM L-Alanin, 1200 U/L Lactat Dehydrogenase (LDH), 0.18 mM NADH und 15 mM 2-Oxoglutarat. Zu einem 1 ml der Reaktionsmischung wurden 200 µl of Schweineplasma addiert und gerührt. Anschließend wurde 30 s inkubiert und danach die Oxidation von NADH durch LDH durch die Abnahme der Absorption bei 340 nm über einen Zeitraum von 4 Minuten gemessen. Die Aktivität wurde aus  $\Delta A/\text{min}$  als  $\mu\text{mol NADH}/(\text{min} \cdot \text{L})$  (= U/L) bestimmt. Zur Validierung des Assays wurde die ALT-Aktivität eines standardisierten humanen Kontrollserums (Precinorm U, Roche Diagnostics) bestimmt, dessen Wert innerhalb  $1\sigma$  lag.

### 3.4.7 Bestimmung des Glycogengehalts aus Gewebe

Zur Bestimmung des Glycogengehalts aus Skelettmuskel und Leberproben der Schweine wurde ein fluorometrischer Assay von Biovision (Mountain View, CA, USA) verwendet. 10 mg Gewebe wurde in 200 µl H<sub>2</sub>O homogenisiert und 5 min 95° C inaktiviert. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert und 50 µl der Probe wurden weiterbenutzt. Zu der Probe wurden 50 µl Hydrolysepuffer und 1 µl Hydrolyseenzymmikx zugegeben, welcher innerhalb von 30 min bei Raumtemperatur das Glycogen zu Glucose spaltet. Nach der enzymatischen Spaltreaktion wurde. Ein weiterer Enzymmix zugegeben, der Glucose-Oxidase und den Fluoreszenzfarbstoff Oxiredprobe enthielt. Bei der Umsetzung der Glucose durch Glucose-Oxidase entsteht H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welches durch Oxiredprobe detektiert wird. Durch gleichzeitige Umsetzung eines Glycogenstandards und Erstellung einer Kalibriergerade kann die Menge an Glycogen per mg Protein des Gewebes bestimmt werden. Gemessen wurde die emittierte Fluoreszenz bei 535 nm Excitation und 590 nm Emissionswellenlänge.

## 3.5 Zellbiologische Methoden

### 3.5.1 Insulinabhängige Glucoseaufnahme

L6.C11-Zellen wurden in 6-Well Platten ausgesät und differenziert. Nachdem die Myotuben 24 h lang mit Selenverbindungen in DMEM/0.1% BSA behandelt wurden, wurden sie weitere 4 h in glucosefreiem DMEM/0.1% BSA (Invitrogen) mit oder ohne Selenverbindungen inkubiert. Nach einem Waschschrift mit DMEM/0.1% BSA, wurden die Zellen 30 min lang mit 100 nM Insulin stimuliert. Unspezifische Glucoseaufnahme wurde durch Zugabe von 20

$\mu\text{M}$  Cytochalasin B (Sigma-Aldrich) zu Kontroll-Wells ermittelt. Anschließend wurde glucosefreies DMEM mit 2-deoxy-1- $^3\text{H}$ -D-Glucose (1.0  $\mu\text{Ci/ml}$ ) (Hartmann Analytic; Braunschweig, Germany) und 100  $\mu\text{M}$  2-deoxy-D-Glucose für 15 min zu den Zellen hinzugefügt. Die Glucoseaufnahme wurde durch dreimaliges Waschen mit eiskaltem PBS gestoppt. Die Zellen wurden in 500  $\mu\text{l}$  1% SDS und 0.2 N NaOH 30 min lang bei 70°C lysiert. Nach Zugabe von 1,5 ml Rotiszint Szintillationsflüssigkeit (Roth) zu den Lysaten wurde die Radioaktivität als counts per minute (CPM) in einem TriLux scintillation counter (Perkin Elmer Wallac; Waltham, MA) gemessen und auf den Proteingehalt als CPM/mg Protein normiert.

### **3.5.2 Lokalisation von EGFP-FoxO1a in Myoblasten per Fluoreszenz-Mikroskopie**

L6.C11-Zellen wurden mit Fugene HD (Roche/Promega) transfiziert. Myoblasten auf 35 mM Coverslips wurden 24 h lang mit 8  $\mu\text{l}$  Fugene HD und 2 $\mu\text{g}$  EGFP-FoxO1a-C1-Plasmid in OptiMEM mit 10% FKS inkubiert. Nach 24h Inkubation mit Selenverbindungen in Kulturmedium, wurden die Zellen 2 h mit Versuchmedium behandelt. Dann wurde die Zellen in einer 37°C warmen Inkubationskammer mit Wärmezirkulation gesetzt und anschließend mit 100 nM Insulin (Sigma, I6634) in HBSS in 0,1% BSA 30 min lang stimuliert. Per Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 100TV, Hamamatsu C4742-95 Digitalkamera und AquaCosmos Software (Hamamatsu, Herrsching)) wurde durch Anregung bei 450 bis 490 nm die Emission bei 515-565 nm detektiert und die Lokalisation des fluoreszierenden EGFP-FoxO1a ermittelt.

### **3.5.3 Promotoraktivitätsbestimmung durch Luziferaseassay**

L6-Myotubes in einer 12-Well-Platte wurden mit 0.7 $\mu\text{g}$  Firefly Luziferase-Promotorkonstrukt (rGLUT4-Prom-pG13), 0.1  $\mu\text{g}$  Renilla Luziferasekontrollvektor pRL-SV40 unter Verwendung von 3  $\mu\text{l}$  Fugene HD in OptiMEM kotransfiziert. 24h nach der Transfektion wurde das Medium durch Versuchsmittel erneuert, und nach weiteren 20 h 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 Luciferase oxidiert Luciferin zu einem chemilumineszenten Produkt, das proportional zur Aktivität des Promotors ist und per Luminometer (VICTOR Plate reader, Wallac, Turku, Finnland) gemessen werden kann. Die

Aktivität der Firefly Luziferase wurde auf die Aktivität der Renilla Luziferase normiert und diese Werte zu der basalen Kontrolle in Relation gesetzt.

#### **3.5.4 Nachweis intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies durch 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat**

L6.C11 oder HSKMC Zellen wurden auf schwarze 96-Well Platten mit fluoreszenzdurchlässigem Boden ausgesät und mind. 24 h inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation mit Selen für 6 oder 24 h Stunden. Danach wurde für 30 min eine 30  $\mu\text{M}$  2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat ( $\text{DCFH}_2\text{-DA}$ , Merck, Darmstadt) in HBSS appliziert, welches in Zellen durch Esterasen und Reaktion mit ROS in das fluoreszierende 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) umgewandelt wird. Überschüssiges  $\text{DCFH}_2\text{-DA}$  wurde entfernt und hiernach folgte eine 30 min Stimulation mit 100 nM Insulin in HBSS. Kontrollen wurden nur mit HBSS behandelt. Anschließend wurde über einen Zeitraum von 30 min der Anstieg an Fluoreszenz mit einem Fluostar Maxima (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) bei 37°C gemessen (Excitation: 485 nm Emission: 520 nm).

#### **3.5.5 Nachweis von intrazellulärem Superoxid mit Dihydroethidium**

L6.C11 wurden auf schwarze 96-Well Platten mit fluoreszenzdurchlässigen Boden ausgesät und mind. 24 h inkubiert. Dihydroethidium (DHE, Sigma) wird 25  $\mu\text{M}$  für 30 min bei 37°C in HBSS zu den Zellen gegeben. Ohne das DHE zu entfernen wurden 100 nM Insulin oder HBSS zu den Wells hinzugefügt und für weitere 30 min inkubiert. Danach wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und die Fluoreszenz des entstandenen Oxyethidiums wurde bei 485 nm Anregung und 570 nm Emission 30 min lang gemessen.

Zur Kontrolle wurde für einige Proben der Oxyethidiumgehalt per HPLC nach Klaus et al. (2010) bestimmt. Dazu wurden  $1 \times 10^7$  Zellen in Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser ausgesät, differenziert und behandelt. Anschließend wurde für 40 min 25  $\mu\text{M}$  DHE zugegeben und dann mit -20°C kalten Methanol lysiert. Die Lysate wurden zentrifugiert das Pellet wurde zur Proteinbestimmung herangezogen und der Methanolüberstand wurde per RP-HPLC analysiert. Es wurden Standards von Ethidiumbromid, DHE und Oxyethidium hergestellt. Die Fluoreszenz der Methanolüberstände wurde auf einer Merck LaChrome HPLC Anlage mit einer Supelco pKb 100 Säule (250 mm x 4,6 mm) bei einer mobilen Phase von acetonitrile/ $\text{H}_2\text{O}$  (20/80 (v/v)) mit 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure bestimmt. Die Retentionszeit für das Superoxid spezifische Oxyethidium betrug 21.5 min.

### 3.5.6 Bestimmung der Zellviabilität mittels MTT oder Resazurin

#### Viabilitätstest

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 mitochondriale Dehydrogenasen zu einem violetten, unlöslichen Formazansalz reduziert. Nach Lösen des Niederschlags in DMSO wurde die Absorption bei 590 nm Wellenlänge gemessen. Im Vergleich mit kontrollbehandelten Zellen ist die Bildung des Formazansalzes ein Maß für die relative Zellviabilität. Bei Resazurin handelt es sich um einen Phenoxazinfarbstoff, der von lebenden Zellen zu wasserlöslichem fluoreszierendem Resorufin umgesetzt wird, welches durch Anregung bei 544 nm und Aufzeichnung der Emission bei 590 nm detektiert wurde.

## 3.6 Molekularbiologische Methoden

### 3.6.1 Enzyme

Superscript II RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen)

Kpn I, Dra III und Dra I (Fermentas)

Sma I und Hind III (Roche)

T4 DNA Ligase (New England Biolabs)

DNase I (Qiagen)

DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment (New England Biolabs)

Taq DNA Polymerase (Invitrogen)

Pfu Polymerase (Fermentas)

### 3.6.2 Klonierungsstrategie für die Umklonierung des Ratten-GLUT4

#### Promotors

Von Professor Pessin (Albert Einstein College, New York, USA) wurde uns freundlicherweise das Ratten-GLUT4-pluc-link Plasmid überlassen. Der Ratten GLUT4-Promotor sollte aus GLUT4-pluc-link (Richardson et al, 1993) in pGL3-basic kloniert werden. Ein Kontrollverdau mit Kpn I und Dra III verifizierte das Vorhandensein des Promotors. Der Ratten-GLUT4-Promotor konnte mit BamH1 und Kpn I aus GLUT4-pluc-

link geschnitten werden. Dazu wurde erst mit BamHI geschnitten. Das gebildete kohäsive Ende wurde durch den Einsatz von DNA-Polymerase I Klenow Fragment (NEB) aufgefüllt. Dann konnte mit Kpn I ein weiteres kohäsives Ende erzeugt werden. Das Fragment wurde über ein Agarosegel gereinigt. Der pG13-Basic-Vektor wurde mit Kpn I (kohäsiv) und Sma I (glatt) geschnitten und ebenfalls gereinigt. So konnte bei der Ligation eine korrekte Orientierung des Fragments erreicht werden. Eine Überprüfung des korrekten Einbaus erfolgte nach Transformation in E.coli durch Verdau des Plasmids mit den Restriktasen Kpn I und Dra I.

#### **3.6.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Die DNA-Fragmente wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und deren Größe aus dem Vergleich mit Markerbanden bekannter Basenpaarlängen über ein Geldokumentationssystem 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.

#### **3.6.4 Restriktionsverdau von DNA**

Die hydrolytische Spaltung der DNA erfolgte durch Typ II-Restriktionsendonukleasen, welche an eine spezifische Nukleotidsequenz binden und innerhalb dieser die DNA spalten. Für die hydrolytische Spaltung wurden die vom Hersteller empfohlenen Bedingungen mit dem jeweils optimalen Reaktionspuffer gewählt. Pro  $\mu\text{g}$  DNA wurden 5 bis 10 U der jeweiligen Restriktionsendonukleasen (Promega, Roche) verwendet und der Ansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert.

#### **3.6.5 Ligation von Plasmid und DNA-Fragmenten**

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Dieses Enzym katalysiert unter ATP-Verbrauch die Verknüpfung der 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden von benachbarten, doppelsträngigen DNA-Molekülen zu Phosphordiesterbindungen. In einem Reaktionsvolumen von 20  $\mu\text{l}$  wurde 1  $\mu\text{g}$  der Vektor-DNA nach Zugabe des T4-DNA-Ligasepuffers und von 3 U Ligase bei RT für 3 h inkubiert. Die restringierte DNA wurde

anschließend mit dem Qiaquick PCR purification Kit (Qiagen) gereinigt und mit H<sub>2</sub>O (PCR-Grad) eluiert.

### 3.6.6 Transformation von E.coli-Zellen

Für die Transformation wurden 2 µl des Ligationsansatzes zu 25 µl 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 µl 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 vereinzelt Kolonien heran, welche isoliert und in 5 ml LB-Flüssigmedium mit Antibiotikum über Nacht im Brutschrank vermehrt wurden.

### 3.6.7 Präparation von Plasmid-DNA aus E.coli und DNA-Sequenzierung

Die Bakterien in 5 ml Flüssigkulturen wurden durch Zentrifugation (5 min, 5000 x g) pelletiert. Die Plasmid-DNA wurde durch die Methode der alkalischen Lyse unter Verwendung des GeneJet Plasmid Minipräp Kit (Fermentas) isoliert. Plasmide wurden durch Restriktionsansätze auf Korrektheit überprüft. Die Sequenz der einklonierten cDNA wurde durch DNA-Sequenzierung nach der Sangermethode durch das Biologisch-Medizinische Forschungszentrum (BMFZ) der Universität Düsseldorf überprüft. Positive Klone mit korrekter Sequenz des Plasmid-inserts wurden in 200 ml Flüssigkulturen angezchtet, woraus unter Verwendung des Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) ca. 400 µg endotoxinfreie Plasmid-DNA isoliert wurde.

### 3.6.8 eingesetzte Plasmide

**Tabelle 3.4: Eingesetzte Plasmide**

<i>Rekombinantes Plasmid</i>	<i>Genetische Modifikation</i>	<i>Quelle</i>
EGFP-FoxO1a-C1 (Clontech)	codiert das fusionierte enhanced green fluorescent protein FoxO1a Konstrukt unter Kontrolle des CMV-Promotors Resistenzgene: Kanamycin, Neomycin	Kortylewski et al. (2003)

<i>Rekombinantes Plasmid</i>	<i>Genetische Modifikation</i>	<i>Quelle</i>
pGL3-basic (Promega)	codiert die Firefly-Luciferase aus <i>Photinus pyralis</i> ; Resistenzgen: Ampicillin	Kommerziell
pRL-SV40 (Promega)	codiert die Renilla Luciferase aus <i>Renilla reniformis</i> unter Kontrolle des SV40-Promotors; Resistenzgen: Ampicillin	Kommerziell
rGLUT4-prom-pluc-link	Codiert eine Luciferase unter Kontrolle des GLUT4-Ratten-promotors Resistenzgen: Ampicillin	Richardson et al (1993)
pGL3-rGLUT4-Prom	codiert die firefly-Luciferase unter Kontrolle des GLUT4-ratten-Promotors Resistenzgen: Ampicillin	Diese Arbeit

#### 3.6.9 RNA-Isolierung und reverse Transkription

Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen wurde unter Verwendung des RNeasy Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert. Für die Extraktion der Gesamt-RNA aus Skelettmuskel wurde das RNeasy Fibrous Tissue kit (Qiagen) benutzt, während für die Extraktion aus Fettgewebe das RNeasy Lipid Tissue kit (Qiagen) eingesetzt wurde. Gesamt-RNA aus dem Lebergewebe konnte ebenfalls mit dem RNeasy Kit gewonnen werden.

Dabei binden Nukleinsäuren in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen an eine Silicamembran, von welcher DNA, Proteinverunreinigungen und Salze in drei Waschschrritten entfernt werden. Abschließend wird RNA mit Wasser von der Matrix eluiert. Für alle Gewebe wurde ein DNase I-Verdau vor der reversen Transkription durchgeführt. Die Konzentration und die Reinheit der isolierten RNA wurden photometrisch durch Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt. Die Integrität der RNA wurde durch eine Ethidiumbromidfärbung der ribosomalen RNA auf einem 1,5%igen Agarosegel überprüft. 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  $\mu$ l dNTP-Mix (je 10 mM)

2.5  $\mu$ l Wasser

0.5  $\mu$ l Superscript II Reverse Transkriptase (200 U/ $\mu$ l)

Die reverse Transkription erfolgte in einem Thermocycler für 1 h bei 42°C und wurde darauf durch Inaktivierung des Enzyms bei 72°C (5 min) beendet. Die so erhaltene cDNA wurde mit Wasser im Verhältnis 1:5 verdünnt und dann für die Real-Time PCR verwendet.

### 3.6.10 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 MgCl<sub>2</sub>, forward und reverse Primer (je 0.5  $\mu$ M), 2  $\mu$ l 10-fach Reaktionspuffer (LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I) und 4  $\mu$ l im Verhältnis 1:5 verdünnter cDNA in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l. Die PCR wurde in Glaskapillaren im LightCycler 2.0 mit folgendem Temperatur- und Zeitprofil durchgeführt: Initiale Denaturierung der DNA für 10 min bei 95°C, zyklische Wiederholung der Schritte Denaturierung (10 s bei 95°C), Primer-Anlagerung (10 s bei einer primerspezifischen Temperatur) und Elongation (primerspezifische Elongationszeit bei 72°C).

Die Sequenzen der für die Real-Time PCR verwendeten Primerpaare sind im Anhang 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 die Größe des PCR-Amplikons auf einem 3%igen Agarosegel überprüft.

### 3.6.11 Primerdesign für Real-Time PCR

Die Primersequenzen für humane und Ratten Primer wurden mit dem Universal Probe Library Assay Design Center festgelegt ([http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=uplct\\_030000](http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=uplct_030000)). Für das Design der *sus scrofa* spezifischen Primer wurde das NCBI Portal Primer-Blast verwendet ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)). Beide Primerdesigner nutzen Primer3 als Berechnungsserver. Die Oligonucleotide wurden über Invitrogen bezogen. Die Sequenzen sind im Appendix 8.1 aufgeführt.

## **4 Ergebnisse**

### ***4.1 Einfluss von niedermolekularen Selenverbindungen auf die Insulinsignaltransduktion in L6 Muskelzellen***

#### **4.1.1 Etablierung des L6.C11 Skelettmuskelzellsystems**

Die Etablierung des L6.C11-Zellsystems (im weiteren Verlauf nur noch L6 genannt) fand zu Beginn dieser Arbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie I statt. Dazu wurden zunächst Differenzierungsbedingungen der Zellen ermittelt. Undifferenzierte Myoblasten besitzen Fibroblastenmorphologie und können zu Myotuben ausdifferenziert werden. Um dies zu erreichen, wurden die Myoblasten über 6 Tage mit Differenzierungsmedium, welches 2%iges Pferdeserum beinhaltet, inkubiert. Durch diese Serumdeprivation wird die Fusion der Myoblasten zu Myotuben ausgelöst. Wie in Abbildung 4.1A-C dargestellt, wurde die zeitabhängige Differenzierung zu Myotuben im Lichtmikroskop verfolgt. Weiterhin wurden die morphologischen Änderungen im Zuge der Differenzierung auch auf molekularer Ebene untersucht. Die Expression des Intermediärfilaments und Differenzierungsmarkers Desmin steigt mit der Ausprägung zu Myotuben an, und erreicht seine höchste Expression bei erfolgter Ausdifferenzierung (Li et al, 1994). Als Intermediärfilament verbindet Desmin die Z-Disk der Sarkomere mit dem Zytoskelett (Capetanaki et al., 2007). Der Anstieg der Desmin-Expression konnte per Real-Time PCR und auf Proteinebene beobachtet werden. Der Anstieg des Desmins auf Transkriptebene entsprach einer 18-fach verstärkten Expression an Tag 6, verglichen mit Tag 0 der Differenzierung (Abbildung 4.1D). In Myoblasten konnte Desmin auf Proteinebene nicht detektiert werden. Nach 3 und 6 Tagen war ein starker Anstieg der Desmin-Expression zu registrieren (Abbildung 4.1E). Eine Veränderung der Desmin-Expression durch die verschiedenen Selenverbindungen wurde nicht beobachtet. In Übereinstimmung mit Yeh et al. (1997) nahm die Genexpression von Selenoprotein W (SelW) während der Differenzierung deutlich ab (Abbildung 4.1F).

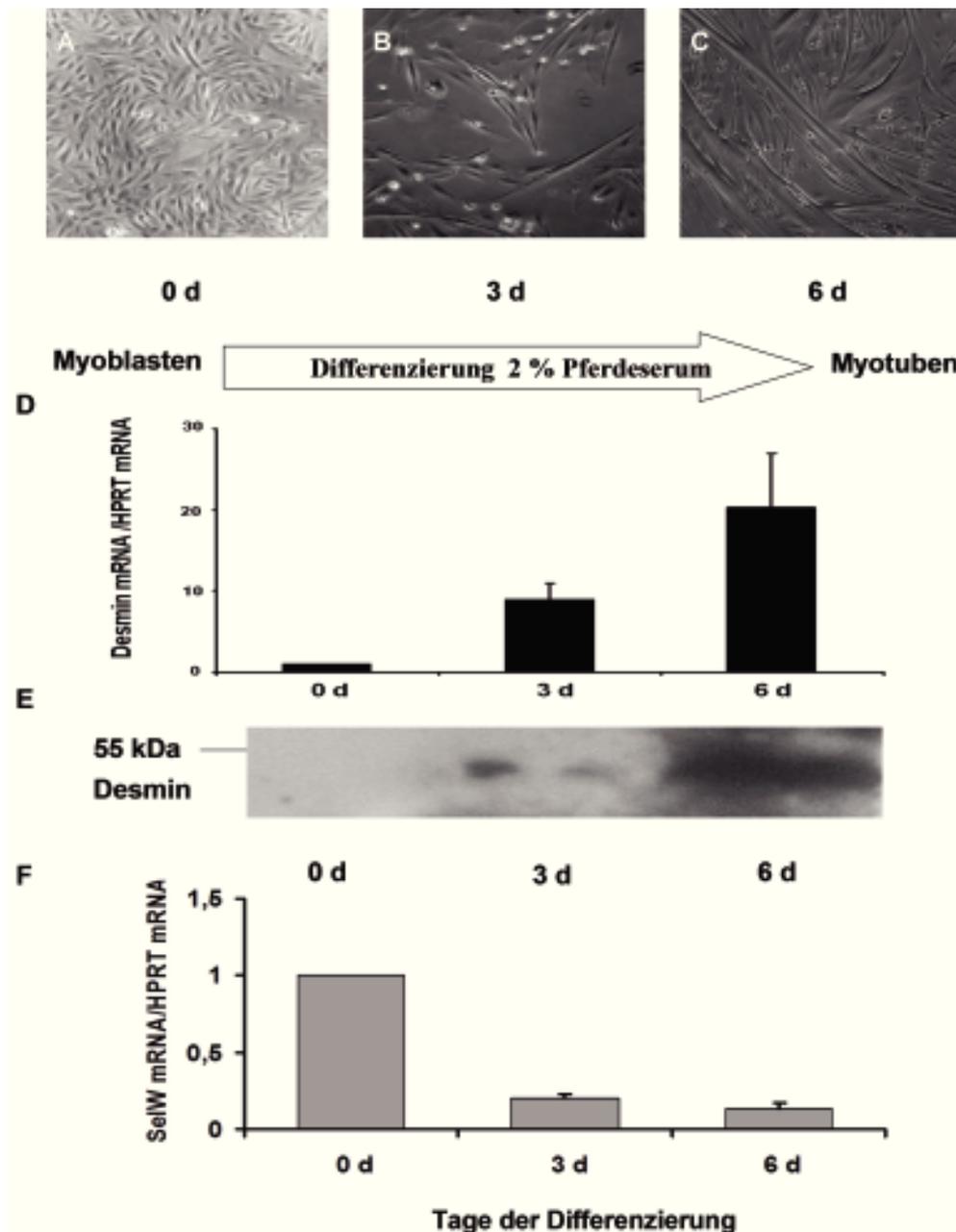


Abbildung 4.1: Differenzierung von L6-Myoblasten zu Myotuben. Die Morphologie der Myoblasten ändert sich im Verlauf der Inkubation mit Differenzierungsmedium zu Myotuben (Tage in Differenzierungsmedium: A = 0, B = 3, C = 6.) Die Expression von Desmin (D u. E) und SelW (F) nach 0, 3 und 6 Tagen in Differenzierungsmedium auf mRNA (D u. F) und Proteinebene (E). Die Werte in D und F sind Mittelwerte + SEM (n = 3).

Während der Differenzierung verändert sich der Gehalt an intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Muskelzellen.

Der Farbstoff 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (DCFH<sub>2</sub>-DA) kann verschiedene reaktive Sauerstoffspezies detektieren. DCFH<sub>2</sub>-DA wurde in differenzierten L6-Myotuben, normiert auf den Proteingehalt, verstärkt in das fluoreszierende Produkt DCF umgewandelt, was auf einen erhöhten ROS-Gehalt in den differenzierten Muskelzellen hindeutet (Abbildung 4.2) (Malinska et al., 2011).

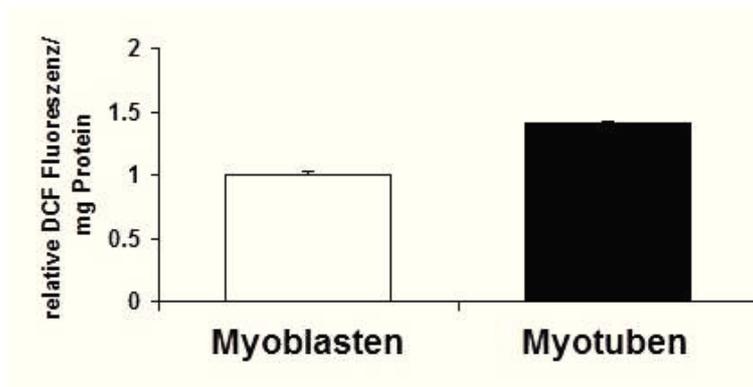


Abbildung 4.2: ROS-Nachweis mit DCF in L6-Myoblasten und Myotuben. Im 96 Well-Format wurde die DCF-Fluoreszenz pro mg Protein bestimmt. Die Werte sind als Mittelwerte + SEM dargestellt (n = 8).

Da L-Selenomethionin (SeMet), Selenit, Methylseleninsäure (MSeA) und Selenat zur Supplementation eingesetzt wurden, sollte ihr Einfluss auf die Viabilität der L6-Zellen untersucht werden, weil diese Selenverbindungen dafür bekannt sind, in verschiedenen Zellsystemen unterschiedlich toxisch zu sein. Die Verbindungen SeMet, Selenit, MSeA und Selenat wurden 24 h lang in den Konzentrationen von 0,1 bis 1000  $\mu\text{M}$  zu L6-Myoblasten oder Myotuben hinzugegeben. Zum Nachweis der Viabilität wurde der Farbstoff MTT benutzt, der von lebenden Zellen zu einem gefärbten Formazanprodukt metabolisiert wird.

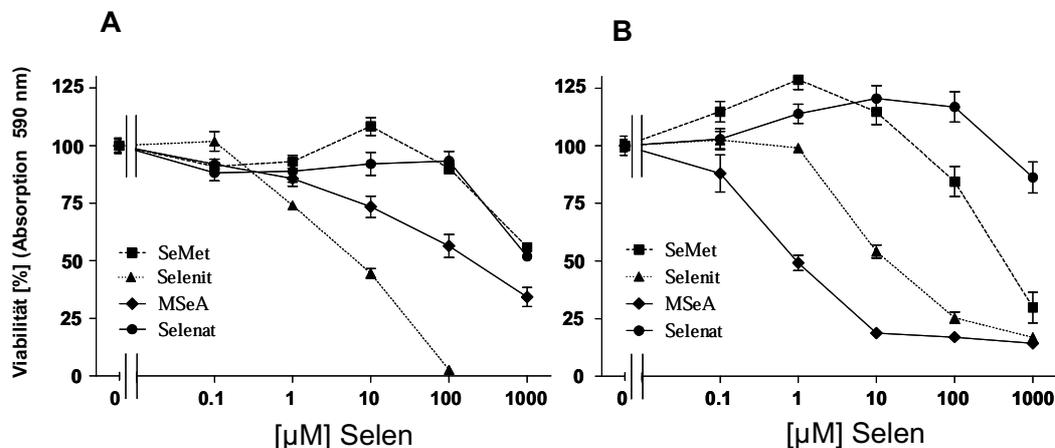


Abbildung 4.3: Wirkung von Selenverbindungen auf die Viabilität von L6-Myoblasten (A) und Myotuben (B). 0-1000  $\mu\text{M}$  L-Selenomethionin (SeMet), Selenit, Methylseleninsäure (MSeA) und Selenat wurden 24 h zu Myoblasten mit 2% Pferdeserum gegeben. Die gleichen Verbindungen wurden in Versuchsmedium zu Myotuben gegeben. Die Absorption des MTT wurde bei 590 nm als Maß für die Viabilität gemessen. Die Daten sind als Mittelwerte + SEM dargestellt der relativen Absorption dargestellt (n = 4-6).

Bei den Myoblasten erniedrigte Selenit ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  die Viabilität auf ca. 45%, alle anderen Selenverbindungen zeigten erst ab 100  $\mu\text{M}$  (MSeA, 56 %) oder bei 1 mM (SeMet, 52% und Selenat, 54%) eine deutliche Verringerung der Viabilität. Bei den Myotuben verringerte MSeA in 1  $\mu\text{M}$  Konzentration die Viabilität auf 50%, Selenit zeigte erst ab 10  $\mu\text{M}$  eine toxische Wirkung. SeMet war ähnlich wie bei den Myoblasten ab 1 mM

toxisch. Selenat war in den eingesetzten Konzentrationen für Myotuben nicht toxisch. Selenit und MSeA sind deutlich toxischer als SeMet und Selenat. Je nach Differenzierung ist also die Viabilität entweder durch Selenit oder MSeA stärker reduziert, was an einer Änderung der metabolischen Aktivität im Verlauf des Differenzierungsprozesses liegen könnte.

#### 4.1.2 Induktion der Selenoproteine durch Selensupplementation

Die Supplementation mit den Selenverbindungen wurde in 1  $\mu$ M Konzentration durchgeführt, da die Viabilität für alle vier Verbindungen im tolerablen Bereich lag und so gleichzeitig eine supraphysiologische Versorgung mit Selen erreicht wurde. Die Selenoproteine SelW und GPx1 sollten auf ihre Expression untersucht werden, da diese Selenoproteine durch Selengabe induzierbar sind (Gu et al., 2002). Beide Proteine könnten die Insulinsensitivität beeinflussen (McClung et al., 2004; Loh et al., 2009; Aachmann et al., 2007). L6-Myotuben wurden für 24 h mit 1  $\mu$ M SeMet, Selenit, MSeA oder Selenat in Versuchsmedium inkubiert. Mit spezifischen Primern für Selenoprotein W und Glutathionperoxidase 1 (GPx1) wurde die Genexpression der Selenoproteine im Vergleich zum konstant exprimierten Housekeeping-Gen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT1) bestimmt. Alle Selenverbindungen konnten nach 24 h die mRNA-Expression von GPx1 und SelW um ein Vielfaches induzieren (Abbildung 4.4A). Die wirksamste Induktion der Selenoprotein-Genexpression erfolgte bei beiden Selenoproteinen durch Selenit, während SeMet die geringste Steigerung der Expression zeigte. Mit einem Antikörper gegen Selenoprotein W (SelW) wurde zusätzlich die Proteinexpression von SelW nachgewiesen. Die enzymatische Aktivität der GPx1, die Fähigkeit Hydroperoxide zu reduzieren, wurde durch einen biochemischen Assay gemessen (Flohé und Günzler, 1984). Die Proteinexpression von SelW konnte in nicht supplementierten Zellen nicht detektiert werden, die 1  $\mu$ M Selzufuhr führte bei allen Selenverbindungen zu einer deutlichen Signalsteigerung im Western-Blot (Abbildung 4.4B). Die GPx-Aktivität wurde ebenfalls durch alle Selenverbindungen mehrfach stimuliert. Selenit und MSeA zeigten eine etwas stärkere Induktion der GPx-Aktivität als SeMet und MSeA. Die GPx-Aktivitätsbestimmung misst prinzipiell alle vorhandenen Glutathionperoxidasen. Durch das gewählte Substrat *tert*-Butylhydroperoxid kann davon ausgegangen werden, dass es sich hauptsächlich um die GPx1 handelt, da diese die größte Spezifität für dieses Substrat besitzt (Flohé und Günzler, 1984).

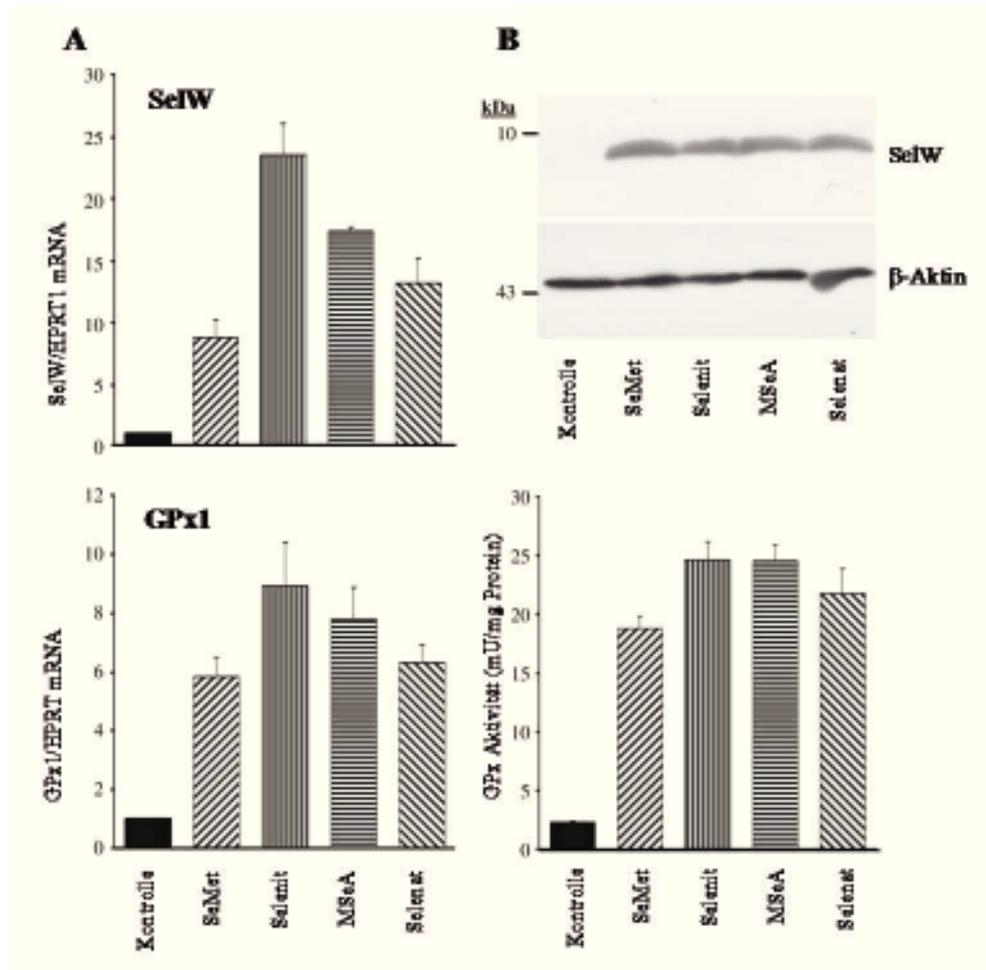


Abbildung 4.4: Expression von SelW und GPx1 bei Selensupplementation in L6-Myotuben. (A) L6-Myotuben wurden 24 h lang mit 1 $\mu$ M SeMet, Selenit, MSeA oder Selenat in Versuchsmedium inkubiert. Die aus extrahierter RNA gewonnene cDNA der Proben wurde auf HPRT normalisiert. (B) Die Proteinexpression von SelW im Western-Blot mit  $\beta$ -Aktin als Ladungskontrolle ist oben dargestellt. Die Aktivität der GPx wurde photometrisch aus der Oxidation von NADPH bestimmt und als mU (= nmol/mg\*min) angegeben (unten).

Zusammenfassend scheint es, dass die untersuchten Selenoproteine SelW und GPx1 durch Selenit und MSeA in der verwendeten Konzentration am stärksten induziert werden. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen aus verschiedenen Zellsystemen, in denen gezeigt wurde, dass Selenit gegenüber anderen Selenverbindungen die Expression von Selenoproteinen effizienter stimuliert (Brigelius-Flohé et al., 1995-1996; Hoefig et al., 2010).

Selenoprotein N (SelN), ein mit Myopathien assoziiertes Selenoprotein (Arbogast et al., 2009), wurde ebenfalls auf seine Genexpression untersucht. Die Selenoprotein N-Expression konnte durch Inkubation der Myotuben mit jeder der vier Selenverbindungen stimuliert werden (Abbildung 4.5). Allerdings betrug die Stimulation für alle Verbindungen ca. das 1,2-fache des Kontrollwertes und war damit vergleichsweise gering, was darauf hindeutet, dass die Selenoprotein N-Expression nur zum Teil vom zellulären Selenspiegel kontrolliert wird.

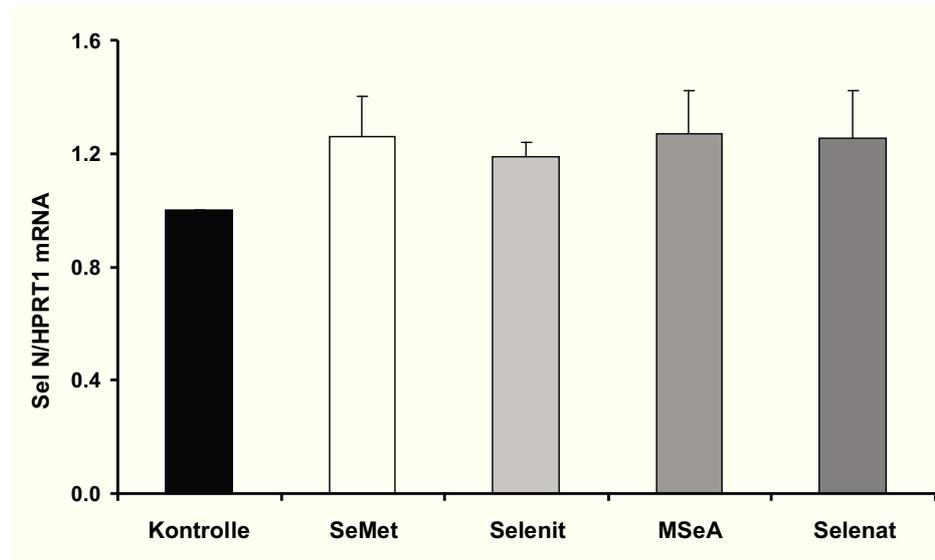


Abbildung 4.5: Genexpression von Selenoprotein N. L6-Myotuben wurden 24 h lang mit 1  $\mu$ M SeMet, Selenit, MSeA oder Selenat in Versuchsmedium inkubiert. Die für SelN erhaltenen Werte wurden auf HPRT1 normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM

Die Proteinexpression des SelW wurde ebenfalls in Abhängigkeit von der Selenitkonzentration untersucht. Die SelW-Proteinexpression stieg bei 0.02 bis 1  $\mu$ M Selenit konzentrationsabhängig an und erreichte bei 1  $\mu$ M auch ihr Maximum.. Die Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD) ist ein weiterer wichtiger Bestandteil der antioxidativen Abwehr des Skelettmuskels. Vor allem für die Entgiftung des in der mitochondrialen Atmungskette frei werdenden Superoxids ist die MnSOD in Skelettmuskel unerlässlich. Ein Einfluss von Selenit auf den mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-porenkomplex und die Expression der mitochondrial lokalisierten Superoxiddismutase (MnSOD) ist bekannt (Guan et al., 2009; Shilo et al., 2003; Shilo et al., 2005). Deshalb wurde die Expression der MnSOD in Abhängigkeit von der Selenitkonzentration untersucht. Die Proteinkonzentration der MnSOD konnte durch Konzentrationen von bis zu 100  $\mu$ M Selenit nicht beeinflusst werden (Abbildung 4.6A). Bei einem starken Anstieg intrazellulärer ROS wäre eine Induktion der MnSOD zu erwarten gewesen.

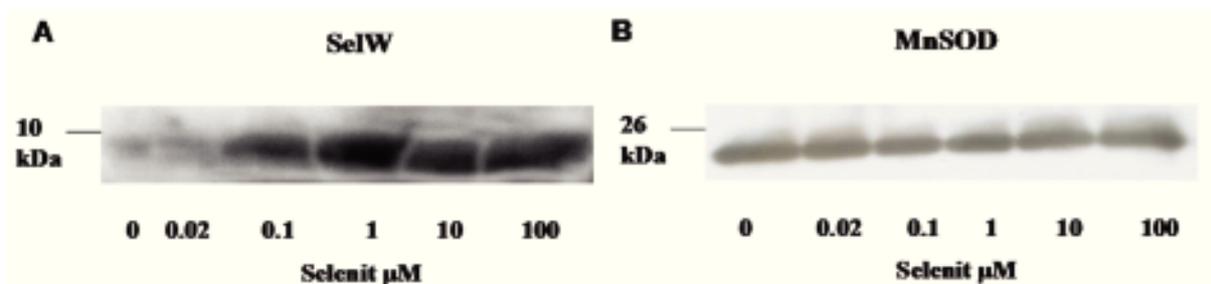


Abbildung 4.6 Proteinexpression von SelW (A) und und MnSOD (B) bei Supplementation mit 0-100  $\mu$ M Selenit

### 4.1.3 Phosphorylierung der Akt in Myoblasten bei Supplementation mit Selenverbindungen

Zunächst sollte eine Untersuchung der Akt bei Selensupplementation Aufschluss über den insulinunabhängigen Status der Akt-Aktivierung geben. Außerdem sollte untersucht werden, ob die eingesetzten Selenverbindungen selbst in der Lage sind, in höheren Konzentrationen den Phosphorylierungszustand der Akt zu beeinflussen. Dazu wurde die Phosphorylierung des Serins an Position 473 in der Aminosäuresequenz der Akt mit einem Phospho-Serin<sup>473</sup>-Akt-Antikörper per Western-Blot untersucht. Wie bei der Untersuchung der Viabilität wurden Myoblasten 24 h lang mit den Selenverbindungen in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Zur besseren Einschätzbarkeit der Phosphorylierungssignale wurde eine Ladungskontrolle mit einem gegen die gesamte intrazellulär vorhandene Akt (Akt (pan)) gerichteten Antikörper durchgeführt.

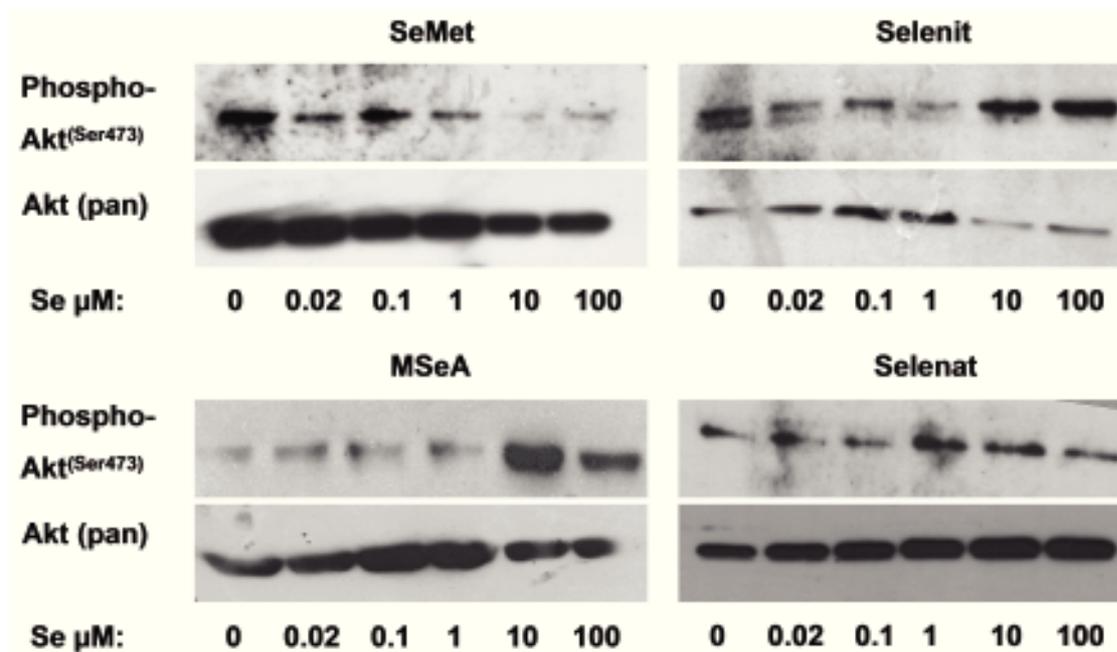


Abbildung 4.7: Phosphorylierung des Ser<sup>473</sup> der Akt in L6-Myoblasten bei Selenbehandlung. 0-100 µM L-Selenomethionin (SeMet), Selenit, Methylseleninsäure (MSeA) und Selenat wurden 24 h zu Myoblasten mit 2% Pferdeserum gegeben. Die Chemilumineszenzsignale sind ein Maß für die Stärke der Phosphorylierung. Zur Kontrolle wurden dieselben Proben ebenfalls mit einem Antikörper gegen die gesamte in Lysat vorhandene Akt (pan) behandelt.

L-Selenomethionin führte im Konzentrationsbereich von 0,02 µM bis 100 µM zu einer konzentrationsabhängigen Verminderung der basalen Phosphorylierung der Akt an Serin 473 (Abbildung 4.7A). Bei der Inkubation mit Selenit war die basale Phosphorylierung der Akt im Bereich 0,02 µM bis 1 µM verringert. Ähnliche Effekte durch 30 nM Selenit konnten Nasr et al. (2004) bei der basalen Phosphorylierung der p70<sup>S6K</sup> in MCF7-Zellen beobachten. Durch eine Erhöhung der Selenitkonzentration auf 10 und 100 µM wurde die Phosphorylierung des Serins verstärkt. Durch Inkubation mit MSeA zeigten die L6-Myoblasten bis 1 µM keine

Veränderung in der Serinphosphorylierung. Wurde die Konzentration auf 10  $\mu\text{M}$  bzw. 100  $\mu\text{M}$  erhöht, zeigte sich ähnlich wie bei der Inkubation mit Selenit eine deutliche Verstärkung der basalen Phosphorylierung der Akt. Akt wirkt antiapoptotisch, ihre Aktivierung könnte daher durch die zytotoxischen Effekte von Selenit und MSeA (siehe Abbildung 4.3) ausgelöst worden sein. Selenat zeigte in den eingesetzten Konzentrationen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keine wesentlichen Unterschiede in der Phosphorylierung der Akt. Mit Myotuben wurden ebenfalls analoge Experimente durchgeführt, die insulinunabhängige Phosphorylierung der Akt war in differenzierten L6-Zellen zu gering, um aussagekräftige Ergebnisse bei der Inkubation mit Selenverbindungen zu erhalten.

#### 4.1.4 Insulinabhängige Phosphorylierung der Akt in Myotuben unter Einfluss von Selenverbindungen

Auf die insulinabhängige Akt-Phosphorylierung sollte nun der Einfluss der vier Selenverbindungen untersucht werden. Dazu wurden differenzierte L6-Myotuben für 24 h mit 1  $\mu\text{M}$  SeMet, Selenit, MSeA oder Selenat in Versuchsmedium inkubiert. Anschließend wurde für 2, 5, 15 oder 30 min 100 nM Insulin hinzugefügt. Die Insulinkonzentration und der Zeitraum der Insulinstimulation wurden entsprechend der physiologischen postprandialen Ausschüttung von Insulin gewählt (Ahmad, 2004). Auch hier wurde die Phosphorylierung des Ser<sup>473</sup> der Akt und der Gesamtgehalt der Akt in den Lysaten bestimmt (Abbildung 4.8). Durch Insulin wurde die Phosphorylierung der Akt schon nach 2 min merklich gesteigert und konnte im zeitlichen Verlauf bis 30 min weiter gesteigert werden. Nach 45 min wurde das Maximum erreicht, die Steigerung gegenüber 30 min war aber unwesentlich.

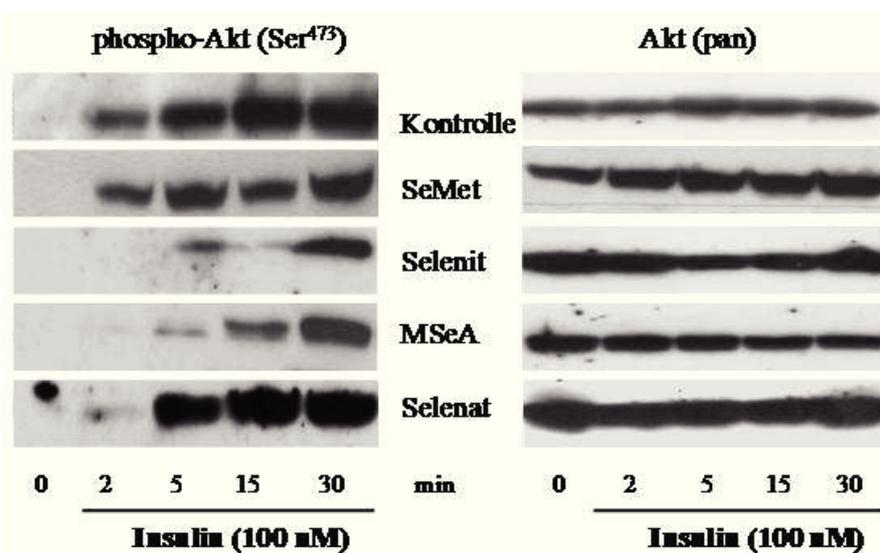


Abbildung 4.8: Insulinabhängige Phosphorylierung der Akt an Ser<sup>473</sup> in L6-Myotuben. Nach 24 stündiger Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  SeMet, Selenit, MSeA oder Selenat in Versuchsmedium wurde für 2-30 min mit 100 nM Insulin stimuliert. Als Kontrolle dienten nicht mit Selen behandelte Myotuben. Der Nachweis aus Zelllysaten erfolgte gegen Phospho-Akt (Ser 473) und Akt (pan).

Eine Inkubation mit SeMet und Selenat führte zu keinen nennenswerten Änderungen in der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung. Bei Inkubation mit Selenit und MSeA zeigte sich eine Verringerung der Phosphorylierung im Zeitraum von 2-15 min. Eine densitometrische und statistische Auswertung der belichteten Filme ergab eine signifikante Verringerung der Phosphorylierung nach Insulinstimulation für Selenit und MSeA (Abbildung 4.9). Die Verzögerung der Insulinwirkung fiel für Selenit stärker aus als für MSeA, da sich für Selenit auch nach 15 min eine deutliche Verringerung der Akt-Phosphorylierung zeigte. Nach 45 Min waren keine Unterschiede in der Akt-Phosphorylierung zwischen der Kontrolle und den Selenverbindungen messbar, so dass es sich um eine Verzögerung der Insulinwirkung durch Selenit und MSeA handelt.

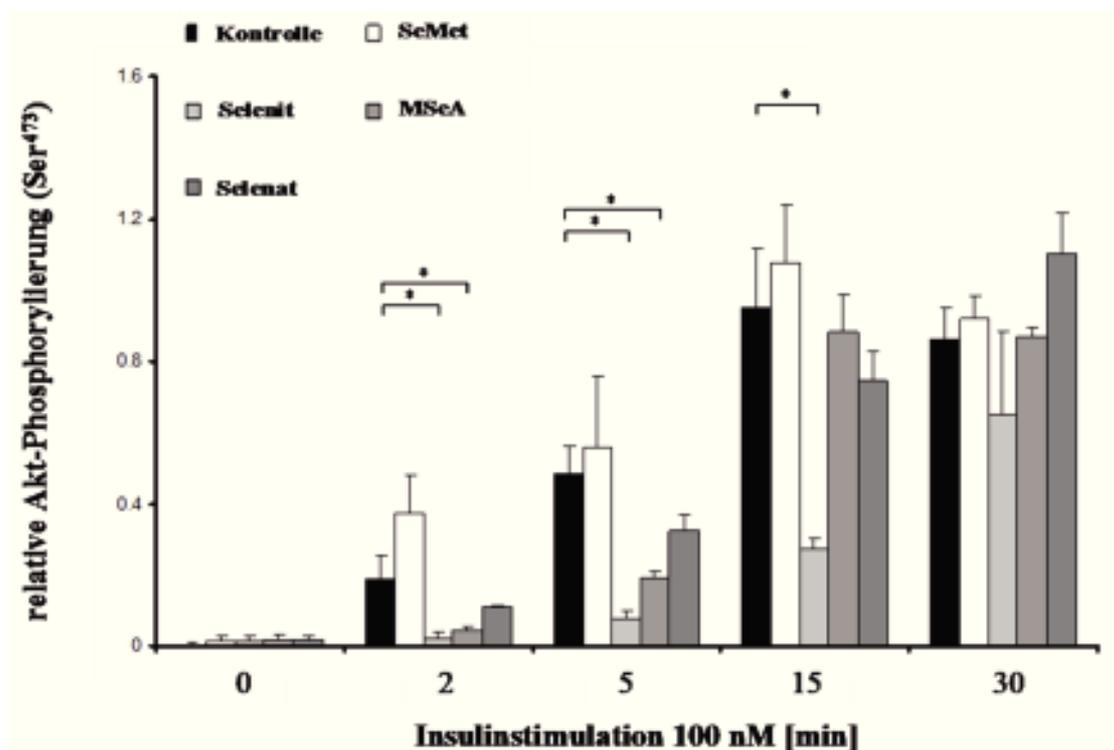


Abbildung 4.9: Densitometrische Auswertung der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung (Ser<sup>473</sup>) im Vergleich zur total vorhandenen Akt. Der Grauwert der Chemilumineszenzsignale wurde mit ImageJ gemessen und auf 45 min Insulinstimulation normiert. Die Signifikanz ( $P < 0,05$ ) wurde durch einen ungepaarten zweiseitigen Student's T-test ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM ( $n = 3-4$ ).

Weiterhin wurde untersucht, ob höhere oder niedrigere Selenkonzentrationen ebenfalls die Phosphorylierung der Akt bei Insulinstimulation beeinflussen (Abbildung 4.10). Dazu wurden die L6-Myotuben 24 h mit verschiedenen Konzentrationen der Selenverbindungen inkubiert und anschließend 5 min lang mit Insulin 100 nM stimuliert.

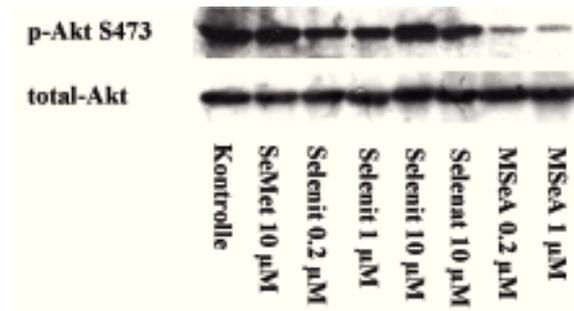


Abbildung 4.10: Immunoblot der Akt-Phosphorylierung (Ser<sup>473</sup>) nach 5 min Insulinstimulation und 24 h Inkubation mit Selenverbindungen mit verschiedenen Selenkonzentrationen. Als Kontrolle ist die total vorhandene Akt gezeigt.

Dabei zeigte sich, dass Selenit und MSeA auch bei 200 nM Konzentrationen die insulinabhängige Phosphorylierung der Akt vermindern können, während 10 µM Selenit, ähnlich wie bei den insulinunabhängigen Myoblasten-Experimenten in Abbildung 4.7, auch zu einer Verstärkung der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung führt. Dagegen beeinflussten 10 µM Konzentrationen von SeMet und Selenat die Akt-Phosphorylierung nicht.

#### 4.1.4.1 Aufhebung der Inhibierung der Akt-Phosphorylierung durch Glutathiondepletion

Eine Beeinflussung der Insulinsignaltransduktion ist auch über den zellulären Glutathionpool möglich, so konnte über eine Depletion des Glutathions die Insulinsensitivität erhöht werden (Findeisen et al., 2011b). Deshalb wurden differenzierte L6-Zellen mit dem  $\gamma$ -Glutamylcysteinsynthetase-Inhibitor L-Buthioninsulfoximin (BSO, 1 mM) inkubiert, der den ersten Schritt der Glutathionsynthese hemmt. Anschließend wurden die Zellen zusätzlich für die in Abbildung 4.11 angegebenen Zeitraum mit 1 µM Selenit inkubiert und mit Insulin stimuliert.

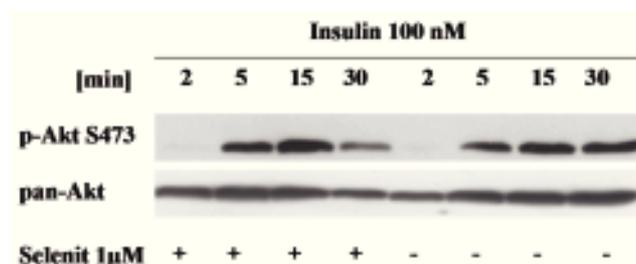


Abbildung 4.11: BSO hebt die Inhibierung der Akt-Phosphorylierung durch Selenit auf. Nach 4 h Vorinkubation mit BSO 1 mM und fortgesetzter Inkubation mit BSO bei gleichzeitiger Selenitzugabe von 1 µM für 24 h wurden L6-Myotuben mit 100 nM Insulin stimuliert.

Durch die Glutathiondepletion führte Selenit 1 µM nicht mehr zu einer nennenswerten Änderung der Phosphorylierung der Akt bei Insulinstimulation. Ein Mangel an Glutathion

kann die Funktion der Glutathionperoxidase einschränken und so die durch Selenit induzierte Bildung von Selenodiglutathione und -triglutathione verringern oder verhindern, die reaktive Selenidverbindungen freisetzen können (Frenkel et al., 1991; Rigobello et al., 2011; Lu et al., 2009).

### 4.1.4.2 Oxidation der PTEN in Gegenwart von Selen in L6-Myotuben

Im Hinblick auf das Akt-Signaling ist die PTEN die wichtigste Phosphatase, da sie durch Dephosphorylierung von PIP3 zu PIP2 die Akt inhibiert (Leslie, 2006). Das katalytisch aktive Cystein (Cys71) der PTEN kann durch  $H_2O_2$ , aber auch durch Wachstumsfaktoren, wie z.B. Insulin, reversibel oxidiert werden (Lee et al., 2002; Kwon et al., 2004; Loh et al., 2009). Daher sollte der Oxidationsstatus der PTEN bei Inkubation von L6-Myotuben mit den Selenverbindungen und Insulin festgestellt werden. Differenzierte Zellen wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen in Phosphatpuffer mit 1% Triton-X100, 0,1% SDS und 50 mM N-Ethylmaleimid (NEM, pH 7.0) auf Eis 30 min lang lysiert. Anschließend wurden die Lysate einer SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen unterzogen und die reduzierte und oxidierte Form der PTEN nachgewiesen. Die oxidierte Form bildet eine Disulfidbrücke aus und verfügt über eine größere elektrophoretische Mobilität (Lee et al., 2002). In Abbildung 4.12 sind exemplarische Ergebnisse für eine Inkubation mit Selenit, Selenat,  $H_2O_2$  und Insulin dargestellt (für die Inkubationszeiten siehe Abbildung). Es zeigte sich, dass in dem verwendeten Modell nur  $H_2O_2$  zu einer Oxidation der Cysteine der PTEN führte, die durch den Mobilitätshift auf dem SDS-PAGE-Gel sichtbar wurde. Dabei mussten Konzentrationen von 500  $\mu M$   $H_2O_2$  angewendet werden, um eine teilweise Oxidation zu erreichen, und 10 mM um die Cysteine vollständig zu oxidieren. Insulin führte weder nach 30 min noch nach 24 h zu einer detektierbaren Oxidation in diesem experimentellen System. Auch keine der Selenverbindungen konnte in 1  $\mu M$  Konzentration unter diesen Bedingungen die Oxidation der PTEN-Cysteinreste herbeiführen. Eine Erklärung für die fehlende Detektion einer Oxidation der PTEN bei Stimulation mit Insulin könnte eine ungenügende Sensitivität des hier benutzten Testsystems sein. So kamen in vorangegangenen Studien NADPH-Oxidase überexprimierende Zellen oder Fibroblastensysteme zum Einsatz, die entweder mehr  $H_2O_2$  intrazellulär produzieren oder geringere intrazelluläre Mengen an Thioredoxin, Glutathion und Peroxiredoxinen besitzen als Muskelzellen (Kwon et al., 2004; Loh et al., 2009).

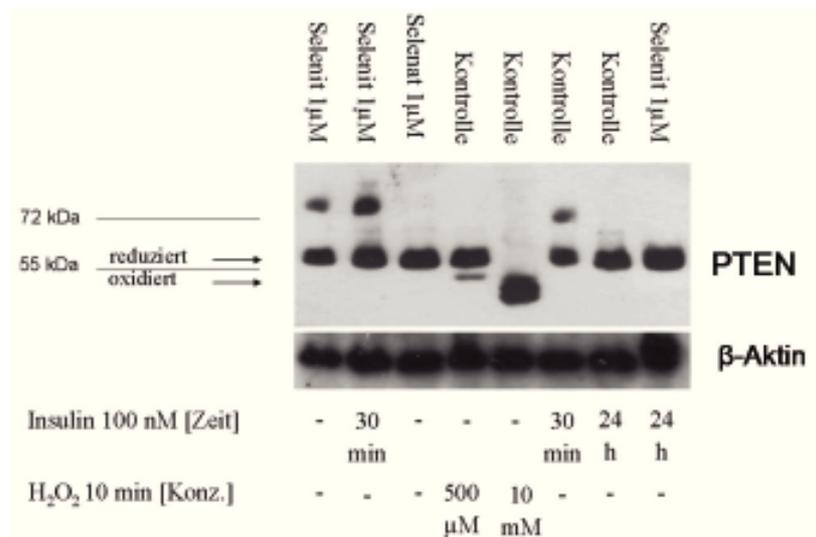


Abbildung 4.12: Darstellung des elektrophoretischen Mobilitätsshift der PTEN unter nicht-reduzierenden Bedingungen. L6-Myotuben wurden in Phosphatpuffer mit 1% Triton-X100, 0,1% SDS und 50 mM N-Ethylmaleimid (NEM, pH 7.0) auf Eis 30 min lysiert.

#### 4.1.5 Einfluss von Selenverbindungen auf FoxO1a/3 in L6-Muskelzellen

Es sollte festgestellt werden, ob sich die Auswirkungen der Selensupplementation auch auf die Phosphorylierung von FoxO1a und FoxO3 übertragen. Dazu wurde ein Antikörper verwendet, der die Phosphorylierung von FoxO1a an Threonin 24 und die Phosphorylierung von FoxO3 an Threonin 32 erkannte. Eine Normalisierung erfolgte gegen  $\beta$ -Aktin. Die Inkubation der L6-Myotuben mit Selenverbindungen und Insulin verlief in Analogie zu 4.1.3. Nur eine Inkubation mit 1  $\mu$ M Selenit konnte die Phosphorylierung von FoxO1a/3 verringern (Abbildung 4.13A). Dies zeigte sich auch bei der densitometrischen Auswertung der Western-Blots. Nur bei Behandlung mit Selenit war die Insulinwirkung nach 5, 15 und 30 min signifikant verringert (Abbildung 4.13B). Eine ähnliche Tendenz ergab sich auch bei der MSeA-Inkubation, die statistische Auswertung ergab allerdings keine Signifikanz.

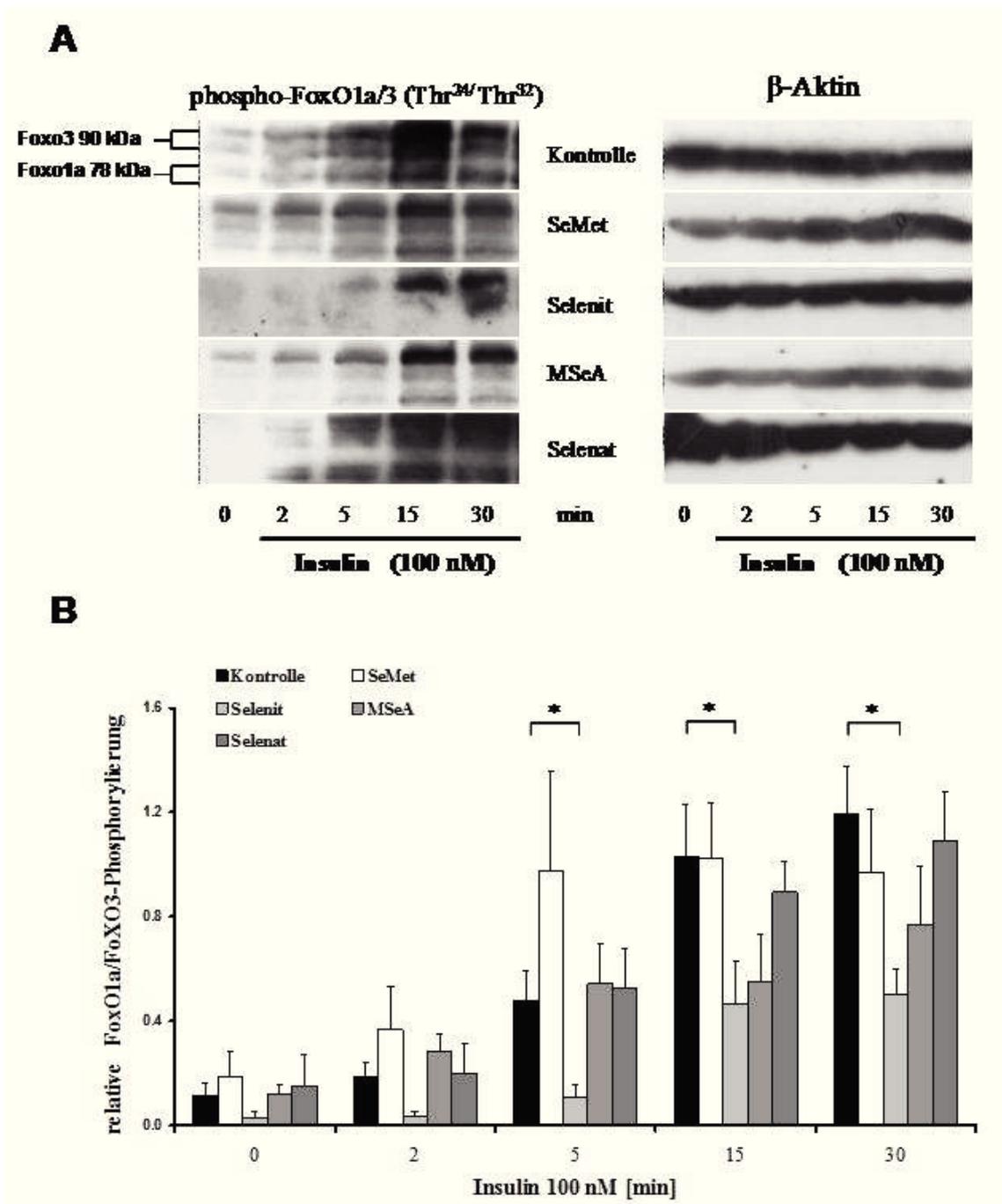


Abbildung 4.13: Phosphorylierung von FoxO1a/3. (A) Insulinabhängige Phosphorylierung von FoxO1a/3 an Thr<sup>32</sup>/Thr<sup>34</sup> in L6-Myotuben. Nach 24 stündiger Inkubation mit 1  $\mu$ M SeMet, Selenit, MSeA oder Selenat in Versuchsmedium wurde für 0-30 min mit 100 nM Insulin stimuliert. Der Nachweis aus Zellysat erfolgte gegen Phospho-FoxO1a/3 (Thr<sup>32</sup>/Thr<sup>34</sup>) und  $\beta$ -Aktin. (B) Densitometrische Auswertung der insulinabhängigen FoxO1a/3-Phosphorylierung (Thr<sup>32</sup>/Thr<sup>34</sup>). Der Grauwert der Chemilumineszenzsignale wurde mit ImageJ gemessen und auf 45 min Insulinstimulation normiert. Die Signifikanz ( $P < 0,05$ ) wurde durch einen ungepaarten zweiseitigen Student's T-test ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM ( $n = 3-4$ ).

Eine Supplementation mit SeMet oder Selenat zeigte keinen Einfluss in Hinsicht auf eine verstärkte oder abgeschwächte Phosphorylierung. Die bereits bei der Phosphorylierung der Akt ermittelten Einflüsse der Selenverbindungen setzten sich also für Selenit bei Foxo1a/3 fort, während sie für MSeA nur in abgeschwächter Form vorhanden waren. Eine Beeinflussung

der FoxO3-Proteinexpression durch die niedermolekularen Selenverbindungen fand nicht statt (Abbildung 4.14).

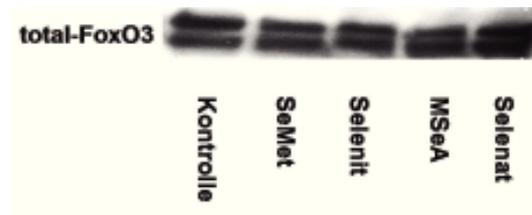


Abbildung 4.14: Proteinexpression von FoxO3 bei Inkubation mit 1  $\mu$ M niedermolekularen Selenverbindungen.

In einem weiteren Experiment sollte die Translokation aus dem Zellkern von FoxO1a in Skelettmuskelzellen untersucht werden, da diese u.a. durch Phosphorylierung an T24 bei FoxO1a ausgelöst wird, und die Stimulation der Transkription durch FoxO1a unterbindet. Es sollte also untersucht werden, ob Selenit die Translokation von FoxO1a im ähnlichen Maße wie die Phosphorylierung beeinflusst. Dazu wurden L6-Muskelzellen mit dem EGFP-FoxO1a-C1-Plasmid transfiziert und die Translokation per Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Aufnahme des Plasmids in die differenzierten Muskelzellen war problematisch, weil sie schwer zu transfizieren waren und vermehrter Zelltod auftrat, da FoxO1a die Differenzierung von Muskelzellen negativ reguliert (Kitamura und Kitamura, 2007). Deshalb wurden zur Transfektion Myoblasten eingesetzt, die 24 h lang mit 1  $\mu$ M Selenit in Differenzierungsmedium oder nur mit Differenzierungsmedium behandelt wurden. Es wurde nicht mit Insulin stimuliert, da sich zeigte, dass schon im basalen Zustand bei einer relativ großen Anzahl Zellen eine Translokation von EGFP-FoxO1a aus dem Zellkern stattgefunden hatte. Zusätzlich verstärkte eine Inkubation mit Selenit die Translokation von EGFP-FoxO1a weiter. In Abbildung 4.15A ist eine Translokation von EGFP-FoxO1a aus dem Zellkern einer Muskelzelle exemplarisch dargestellt.

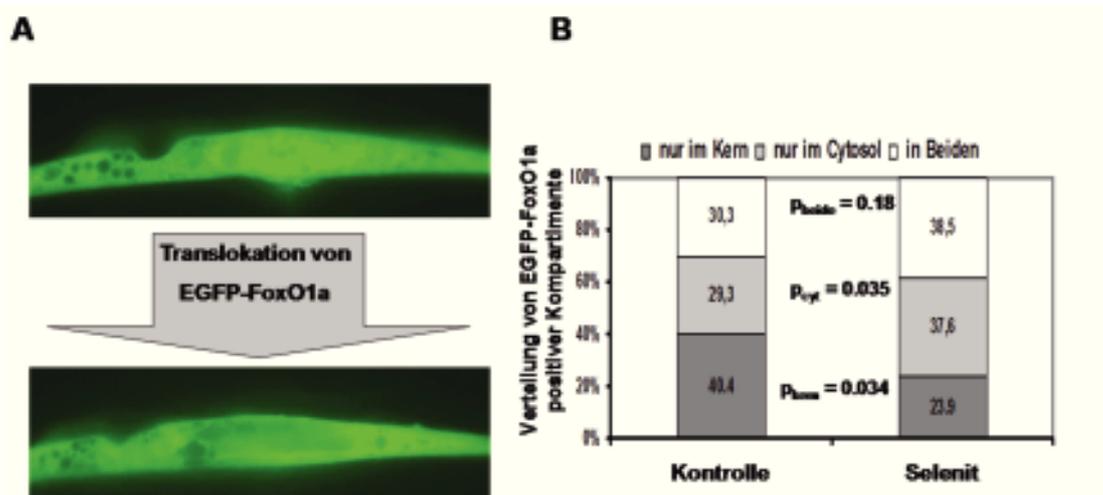


Abbildung 4.15: Translokation von EGFP-Foxo1a in L6-Myoblasten. 630fache Vergrößerung eines mit EGFP-FoxO1a-C1-Plasmid (Clontech) transfizierten L6-Myoblasten nach Insulin stimulierter Translokation (A). In (B) ist die Auswertung der Verteilung von EGFP-Foxo1a in Kontrollzellen und mit

1  $\mu\text{M}$  Selenit behandelte Zellen (24 h) dargestellt. Es wurden jeweils ca. 3 x 30 EGFP-FoxO1a transfizierte Zellen pro Gruppe gezählt. Myoblasten wurden mit Fugene HD (Roche) und Plasmid im Verhältnis 4:1 auf 35 mm Glas-Coverslips transfiziert. P-Werte wurden mit einem Student's T-test bestimmt.

In Abbildung 4.17B ist die Auswertung der Verteilung von EGFP-FoxO1a in den Kompartimenten von Myoblasten dargestellt. Bei Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Selenit hatten deutlich mehr Myoblasten FoxO1a im Cytosol oder in beiden Kompartimenten, während bei der Kontrolle eine nukleäre Lokalisation überwog. Eine Erhöhung der Translokation durch Selenit scheint nicht Akt-vermittelt stattgefunden zu haben, da sie mit den Western-Blot Ergebnissen zur FoxO1a/3-Phosphorylierung in 4.1.5 nicht übereinstimmt. Eine Beeinflussung der Insulinsignaltransduktion ist durch die verstärkte Translokation möglich, da FoxO-Transkriptionsfaktoren die insulinabhängige Genexpression direkt und über Rückkopplungsmechanismen kontrollieren können (Puig et al, 2005). Weitere Faktoren spielen bei der Translokation von FoxO-Transkriptionsfaktoren eine Rolle. So besitzen FoxO-Proteine weitere Phosphorylierungsstellen, die durch andere Kinasen, wie z.B. MAP-Kinasen aktiviert werden und die Translokation maßgeblich beeinflussen können (Zhao et al., 2004).

### 4.1.6 Glucoseaufnahme unter Einfluss von Selenverbindungen in Myotuben

Die basale und insulinstimulierte Glucoseaufnahme der L6-Myocyten wurde durch Inkubation der L6-Myotuben mit radioaktivem Glucoseanalogon 2-deoxy-1- $^3\text{H}$ -D-Glucose bestimmt. Der  $\beta$ -Zerfall des Tritiums wurde aus Zelllysaten quantitativ mit einem Szintillationsmessgerät bestimmt. Die Stimulation mit 100 nM Insulin ergab eine etwa 1,4-fache Steigerung der gemessenen Radioaktivität bei unbehandelten Zellen (Abbildung 4.16A-D). Selenit wurde in Konzentrationen von 1 und 5  $\mu\text{M}$  eingesetzt, wie in Abbildung 4.16A dargestellt ist. Die Supplementation mit 1  $\mu\text{M}$  Selenit führte zu einer leichten signifikanten Erhöhung der Glucoseaufnahme im basalen und auch im stimulierten Zustand. Wurde die Konzentration auf 5  $\mu\text{M}$  erhöht, wurde eine signifikante Abnahme der Glucoseaufnahme sowohl in Kontrollzellen als auch insulinstimulierten Zellen beobachtet. In Abbildung 4.16B ist der Einfluss der Supplementation mit 1  $\mu\text{M}$  MSeA dargestellt. Diese Verbindung führte bei Insulinstimulation zu einer signifikanten Verringerung der aufgenommenen Glucose. Im Gegensatz dazu konnte Selenat in Konzentrationen bis 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt werden, ohne zu einer signifikanten Änderung der gemessenen  $\beta$ -Zerfälle zu führen (Abbildung 4.16 C). SeMet (Abbildung 4.16D) änderte in 1 und 10  $\mu\text{M}$  Konzentrationen die Menge an

aufgenommener 2-deoxy-1- $^3\text{H}$ -D-Glucose nicht nennenswert. Nur die sehr hohe Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  steigerte die Glucoseaufnahme insulinunabhängig substantiell. Zusammenfassend bewertet waren nur Selenit und MSeA in der Lage die insulinabhängige Glucoseaufnahme in physiologisch relevanten Konzentrationen zu beeinflussen.

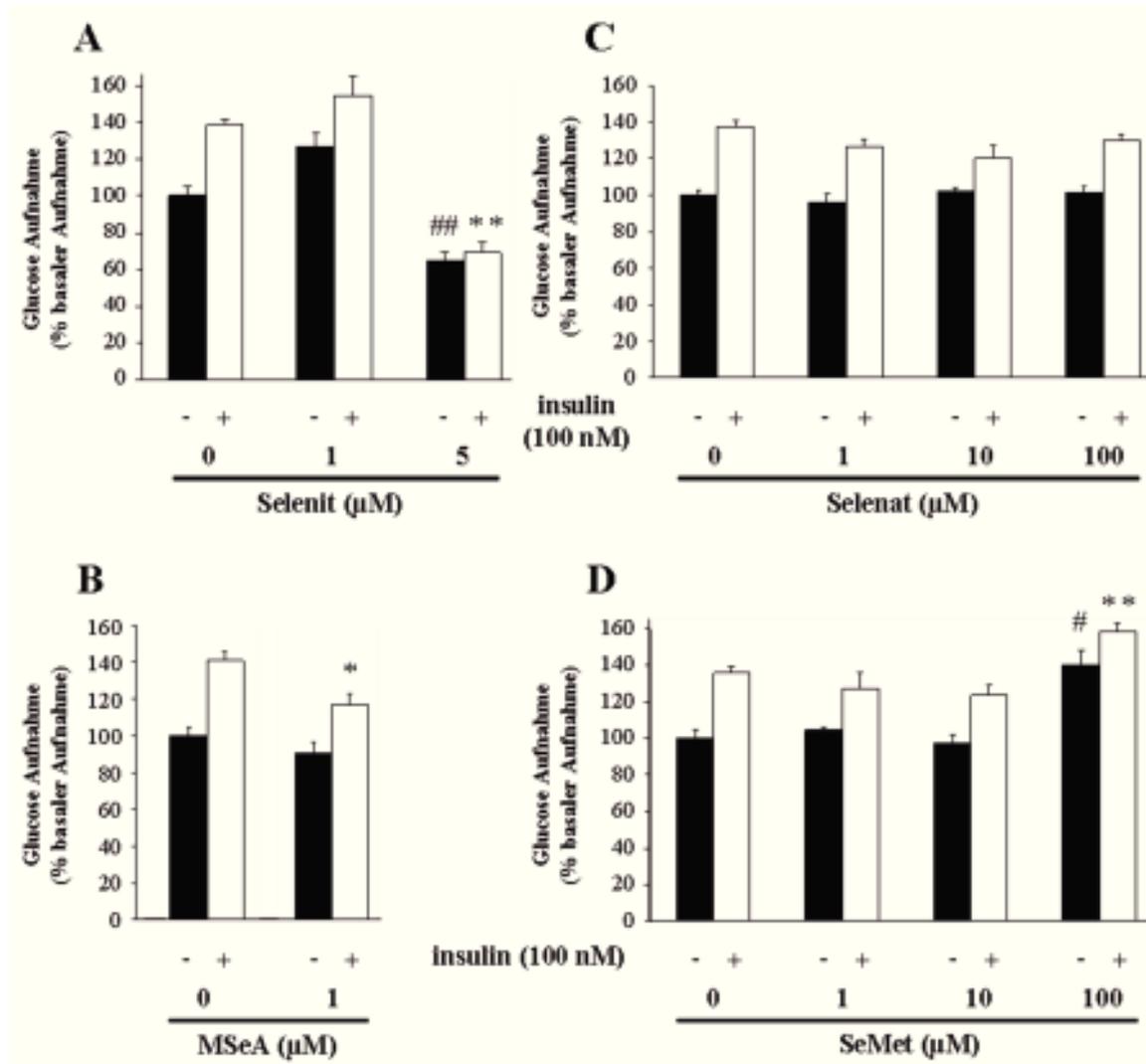


Abbildung 4.16: Insulinabhängige Glucoseaufnahme unter Einfluss von Selenverbindungen in L6-Myotuben. Nach basaler Inkubation oder Stimulation mit Insulin (100 nM) für 30 min wurde per Szintillationszähler die Aufnahme radioaktiver 2-deoxy-1- $^3\text{H}$ -D-Glucose (1.0  $\mu\text{Ci/ml}$ ) bestimmt. L6-Myotuben wurden 24 h lang mit Selenit (A), MSeA (B), Selenat (C) oder SeMet (D) in den angegebenen Konzentrationen in Glucose freiem DMEM/0,1% BSA inkubiert.

#### 4.1.7 Einfluss der Selenverbindungen auf die intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies

Die nach Insulinstimulation gemessenen ROS-Mengen können durch Gabe von Antioxidantien verringert werden (Goldstein et al., 2005; Ristow et al., 2009). Da Selen u.a. über antioxidative Selenoenzyme wirkt, sollte der Einfluss der eingesetzten Selenverbindungen auf die intrazelluläre ROS-Produktion untersucht werden. Dazu wurde der Farbstoff 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (DCFH<sub>2</sub>-DA) eingesetzt. Nach Inkubation

für 24 h mit den Selenverbindungen wurden die Zellen 30 min mit 100 nM Insulin oder Placebo inkubiert. In Abbildung 4.17 ist das zelluläre ROS-Niveau nach Insulinstimulation und Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der vier Selenverbindungen SeMet, Selenit, MSeA und Selenat dargestellt. Die Stimulation mit Insulin führte zu einem Anstieg der ROS. Dieser betrug bei den Kontrollen ca. 10-15%, was darauf hindeutet, dass ein Großteil der intrazellulär erzeugten ROS insulinunabhängig produziert wird (Rigoulet et al, 2011).

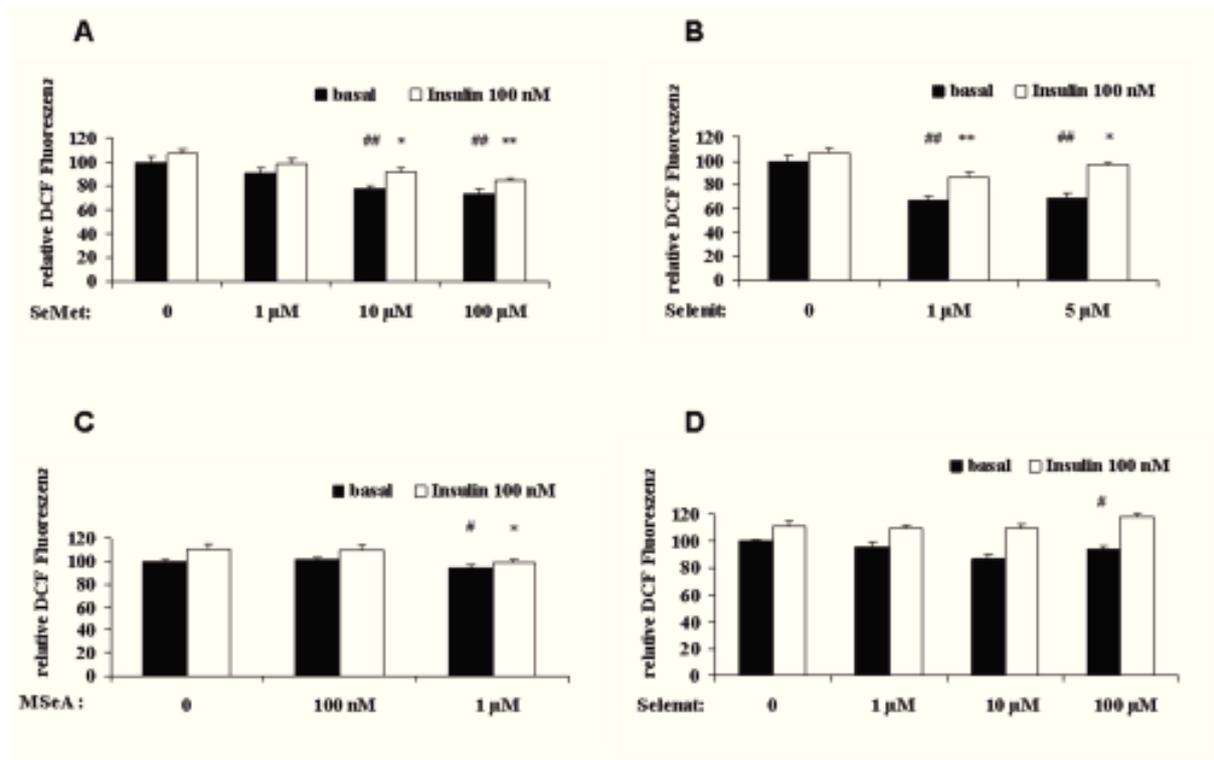


Abbildung 4.17: Einfluss von Selenverbindungen auf die basale und durch Insulinstimulation erzeugte ROS-Produktion in L6-Zellen. Auf einer Microtiterplatte wurden Myotuben differenziert und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen SeMet (A), Selenit (B), MSeA (C) oder Selenat (D) für 24 h inkubiert. Die Werte wurden auf die Proteinmenge normiert.

Auch wenn alle Selenverbindungen dazu in der Lage waren, die intrazelluläre ROS-Erzeugung zu senken, zeigten nur Selenit und MSeA eine signifikante Verminderung bei 1 µM Konzentration. In Abbildung 4.17A ist der Einfluss von SeMet auf das ROS-Niveau dargestellt. SeMet zeigte bei 10 und 100 µM SeMet eine deutliche Erniedrigung der intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies sowohl basal als auch bei Insulinstimulation. Bereits 1 µM Selenit führte zu einer eindeutigen Senkung der emittierten Fluoreszenz, bei 5 µM zeigten sich ähnliche Ergebnisse (Abbildung 4.17B). Auch 1 µM MSeA führte zu einer signifikanten Verringerung der ROS (Abbildung 4.17C). Eine Selenatinkubation zeigte kaum Auswirkungen auf die zellulären ROS. 100 µM Selenat konnten basal die ROS-Produktion senken. Selenit und MSeA induzierten am stärksten GPx1 und SelW (siehe Abbildung 4.4)

und könnten deshalb schon ab 1  $\mu\text{M}$  Konzentrationen zu einer Senkung der gemessenen ROS führen.

#### 4.1.8 Superoxidproduktion in Myotuben bei Selensupplementation

Superoxid ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) ist eines der wichtigsten biogenen Radikalprodukte, das in Redoxsignaling involviert ist (Fisher, 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dihydroethidium (DHE) eine Veränderung in der intrazellulären Superoxidproduktion festzustellen. Dazu wurden L6-Zellen in Anlehnung an (Peshavariya et al., 2007) im 96-Well Format ausgesät, differenziert und 24 h lang mit den Selenverbindungen behandelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.18A-D dargestellt. Die Signifikanz wurde mit einem 2-faktoriellen ANOVA überprüft. Die Faktoren richteten sich nach den Konzentrationen der eingesetzten Selenverbindung und dem Vergleich basaler Proben zu insulinstimulierter Proben. Nur bei Selenit zeigte sich eine signifikante Interaktion der beiden Faktoren mit  $P < 0.001$  (Abbildung 4.18B). Selenit führte zu einer Erhöhung der Oxyethidium-Fluoreszenz proportional zur Selenitkonzentration und auch die Produktion von Superoxid war bei Insulinstimulation erhöht. Dadurch ergibt sich ein Widerspruch zu der mit dem Farbstoff DCF gemessenen verringerten ROS-Produktion. Dieser wird in Kapitel 5 ausführlich diskutiert. SeMet (Abbildung 4.18A) zeigte einen leichten Anstieg der gemessenen DHE-Fluoreszenz im Konzentrationsbereich von 0.1-10  $\mu\text{M}$  während bei 100  $\mu\text{M}$  eine Abnahme der Fluoreszenz zu beobachten war. Die zusätzliche Superoxiderzeugung durch Insulin war hingegen gering. Bei MSeA (Abbildung 4.18C) zeigten sich ähnliche Tendenzen wie bei Selenit, aber es reichte nicht zu einer Signifikanz. Bei Selenat (Abbildung 4.18D) waren sowohl die selenatkonzentrationsabhängigen als auch die insulinabhängigen Unterschiede im Oxyethidium-Signal gering, so dass es zu keiner eindeutigen faktoriellen Differenz kam.

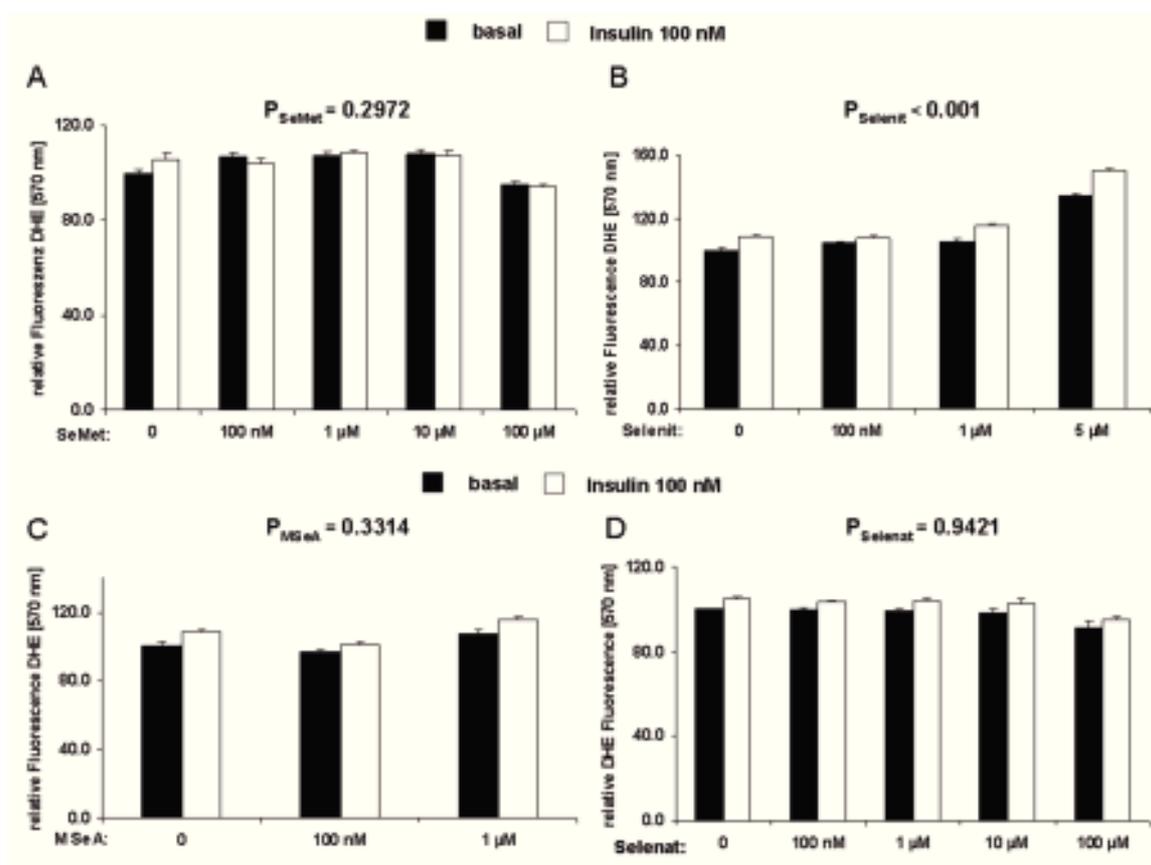


Abbildung 4.18: Detektion von Superoxid mittels DHE im 96-Well-Format. Die Auswirkungen von SeMet (A) 0-100  $\mu\text{M}$ , von Selenit (B) 0-5  $\mu\text{M}$ , MSeA (C) 0-1  $\mu\text{M}$  und Selenat (D), in Gegenwart oder Abwesenheit von Insulin 100 nM, auf die Superoxidproduktion wurde bei Anregung von 480 nm und Emission von 570 nm bestimmt. Die statistische Analyse (2-Way-Anova) wurde mit dem Microsoft Excel Plugin XL Toolbox durchgeführt ( $n=6$  für die einzelnen Gruppen).

Da DHE intrazellulär nicht nur zu Oxyethidium, sondern auch zu fluoreszierenden Nebenprodukten umgesetzt wird (Zielonka und Kalyanaraman, 2010), wurde mittels chromatographischer Auftrennung der Produkte nach Klaus et al. (2010) die Aussage der Messung im 96 Well-Format für einige Proben überprüft. So wurden Kontrollwerte, Werte für Selenit 1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  sowie ein Wert für SeMet 100  $\mu\text{M}$  bestimmt (siehe Abbildung 4.19). Dabei zeigte sich, dass die im 96-Well-Format erhaltenen Tendenzen für Selenit reproduziert werden konnten, aber bei der HPLC-Analyse deutlich höher ausfielen. Der für SeMet 100  $\mu\text{M}$  erhaltene Wert entsprach in der Tendenz nicht dem Wert aus dem 96-Well-Format. Der Widerspruch zur DCF-Messung konnte durch die HPLC-Methode nicht aufgehoben werden. Die Produktion von Superoxid durch Selenit *in vivo* und *in vitro* in ähnlichen Konzentrationsbereichen wurde bereits von Shen et al. (2001) und Chen et al. (2007) gezeigt und wird auf eine Oxidationsreaktion mit Glutathion zurückgeführt, während DCF neben reaktiven Sauerstoffspezies auch reduziertes Glutathion misst, und so eine Erklärung für die Diskrepanzen der beiden Farbstoffe sein könnte (Chen et al., 2010).

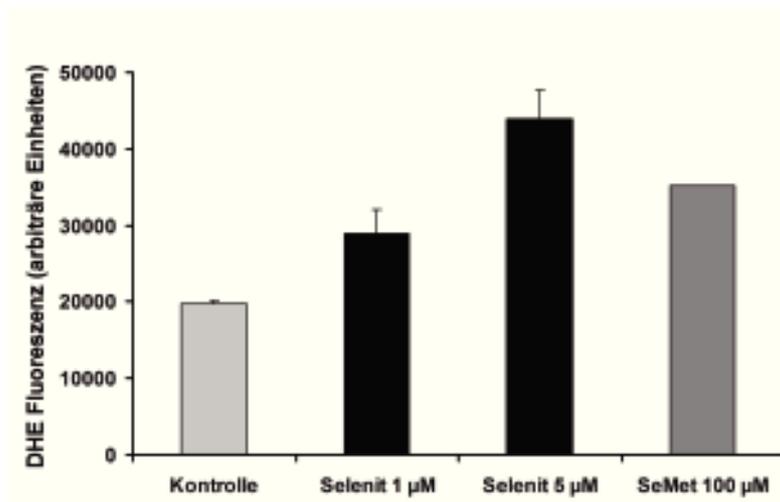


Abbildung 4.19: Bestimmung der spezifischen Oxyethidiumfluoreszenz mittels RP-HPLC aus Methanol-Zellysaten.  $10^7$  differenzierte L6 Zellen wurden 24 h lang mit Selenit (1  $\mu$ M und 5  $\mu$ M) und SeMet (100  $\mu$ M) behandelt und dann in Methanol lysiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz des Oxyethidiums bei einer Retentionszeit von 21.5 min bei 480 nm Excitation und 570 nm Emission detektiert. Kontrolle und Selenit wurden jeweils doppelt bestimmt.

#### 4.1.9 GLUT4-Genexpression bei Selenitinkubation

Die insulinabhängige Glucoseaufnahme wird im Skelettmuskel hauptsächlich durch den GLUT4-Transporter vermittelt. Da Selenit die Aufnahme von Glucose in L6 Muskelzellen beeinflussen konnte (Abschnitt 4.1.6), sollte auch die transkriptionelle Regulation des GLUT4-Transporters untersucht werden. Während Insulin die Glucoseaufnahme durch GLUT4 hauptsächlich über die Translokation des GLUT4 vermittelt, ist nicht eindeutig geklärt, ob Insulin auch die mRNA-Expression von GLUT4 im Skelettmuskel beeinflusst (Im et al., 2007). In Abbildung 4.20A ist die mRNA-Expression in Myotuben von GLUT4 nach Insulinstimulation und Selenitinkubation dargestellt. Selenit konnte die Induktion der Genexpression von GLUT4 durch Insulin nach 2 h und 4 h inhibieren. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Al-Khalili et al. (2005) war die Genexpression von GLUT4 nach Inkubation mit Insulin zeitabhängig nach 2 h und 4 h erhöht. In Abbildung 4.20B ist zum Vergleich die Genexpression von Atrogin, das ebenfalls durch Insulin reguliert wird, unter den gleichen Bedingungen aufgeführt (Al-Khalili et al., 2005). Atrogin ist ein Atrophiegen welches unter positiver Kontrolle von FoxO1/3 im Skelettmuskel steht (Moylan et al., 2008). Die Atroginexpression wurde durch Insulin verringert, Selenit verstärkte diesen Effekt. Um die Ergebnisse der GLUT4-Expression weiter zu untersuchen, wurde ein Ratten-GLUT4-Promotorplasmid (pGL3-rGLUT4-Prom) in L6-Myotuben transfiziert (Abbildung 4.20C). Die Luciferase-Aktivität bei Myotuben zeigte keine relevante Änderung der GLUT4-Promotor-Aktivität durch Insulinstimulation oder 1  $\mu$ M Selenit. Allerdings führte eine 5  $\mu$ M Inkubation mit Selenit zu einem starken Anstieg der Promotorstimulation. Ähnlich wie bei der

Glucoseaufnahme (Abbildung 4.16A) zeigte sich nur bei 5  $\mu\text{M}$  Selenit ein eindeutiger Einfluss auf die GLUT4-Expression. Eine mögliche Erklärung für die unveränderte Promotoraktivität bei Insulinstimulation und Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Selenit ist, dass die Neusynthese der GLUT4-mRNA nicht stimuliert wurde, während eine Beeinflussung der mRNA-Stabilität stattgefunden hat. Der Anstieg der Promotoraktivität bei 5  $\mu\text{M}$  Selenit könnte ein kompensatorischer Effekt zur verringerten Glucoseaufnahme sein (siehe Abbildungen 4.16A).

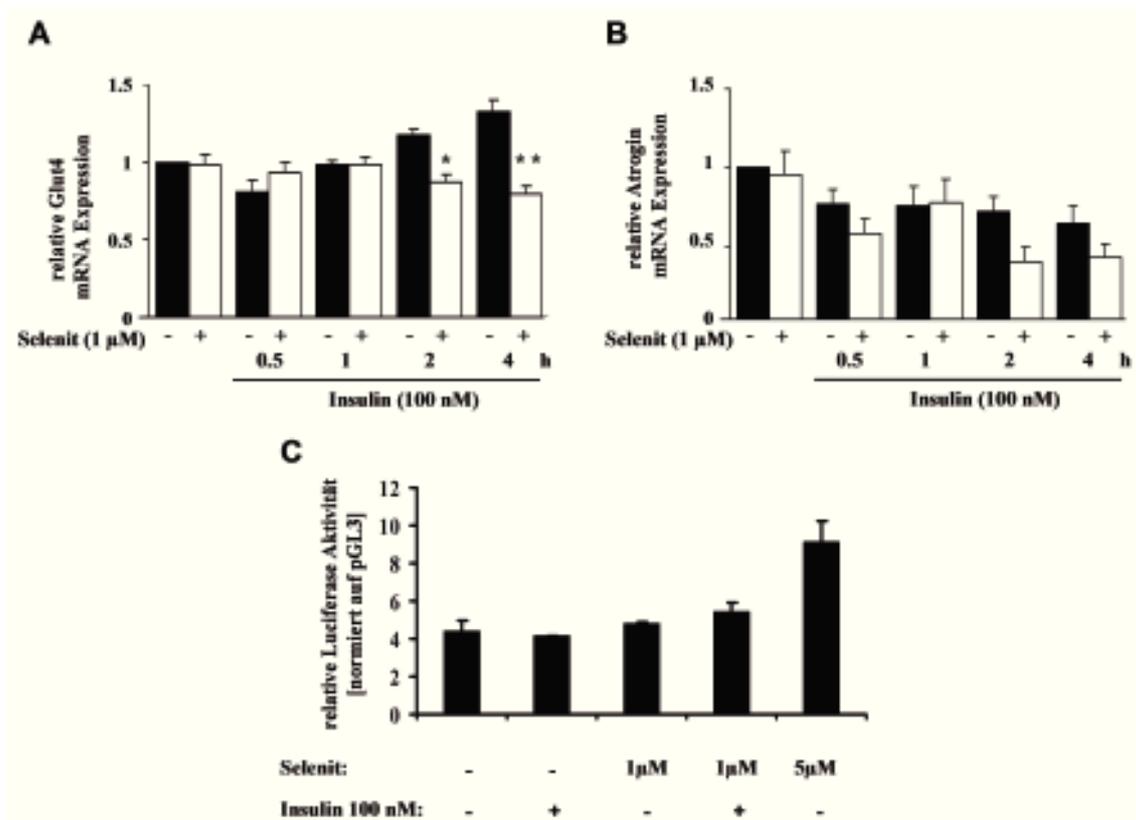


Abbildung 4.20: Darstellung der relativen GLUT4-Expression. GLUT4-Expression in Abhängigkeit von Insulin (1-4 h) und vorheriger 1  $\mu\text{M}$  Selenitinkubation (24 h, n = 4-5) (A). Zum Vergleich die Expression von Atrogin (B) unter gleichen Bedingungen wie in A (n=3). Die Luciferase-Aktivität von L6-Myotuben (C) transfiziert mit pGL3-rGLUT4-Prom-Plasmid nach 24 h Selenitinkubation und 6 h Stimulation mit Insulin 100 nM (jeweils n = 2).

#### 4.1.10 Einfluss von Selenverbindungen und Insulin auf weitere Kinasen des Energiestoffwechsels in Myotuben

Zwei wichtige Vertreter der MAP-Kinase (*Mitogen Activated Proteinkinase*) Familie sind die Erk1/2 und die P38. Diese Kinasen werden durch externe Stimuli wie z.B. oxidativen Stress aktiviert und sind ebenfalls an der Glucoseaufnahme im Skelettmuskel beteiligt (Ji, 2008; Chambers et al., 2009). Die Aktivität der beiden MAP-Kinasen kann durch Selenverbindungen moduliert werden (Plano et al., 2011).

In Abbildung 4.21A ist exemplarisch der Einfluss von Selenit und SeMet 1  $\mu\text{M}$  dargestellt. Beide führen zu einer erhöhten Phosphorylierung der P38 bis 5 min Insulinstimulation. Bei einer Insulinstimulation von 15 min oder länger war eine verstärkte Phosphorylierung durch Selenit oder SeMet nicht mehr vorhanden (nicht dargestellt). Bei der Erk1/2 kam es durch die Inkubation mit Selenit und SeMet nur ohne Insulinstimulation zu einer verminderten Phosphorylierung (Abbildung 4.21B). Bei Insulinstimulation verschwanden die inhibitorischen Effekte von Selenit und SeMet.

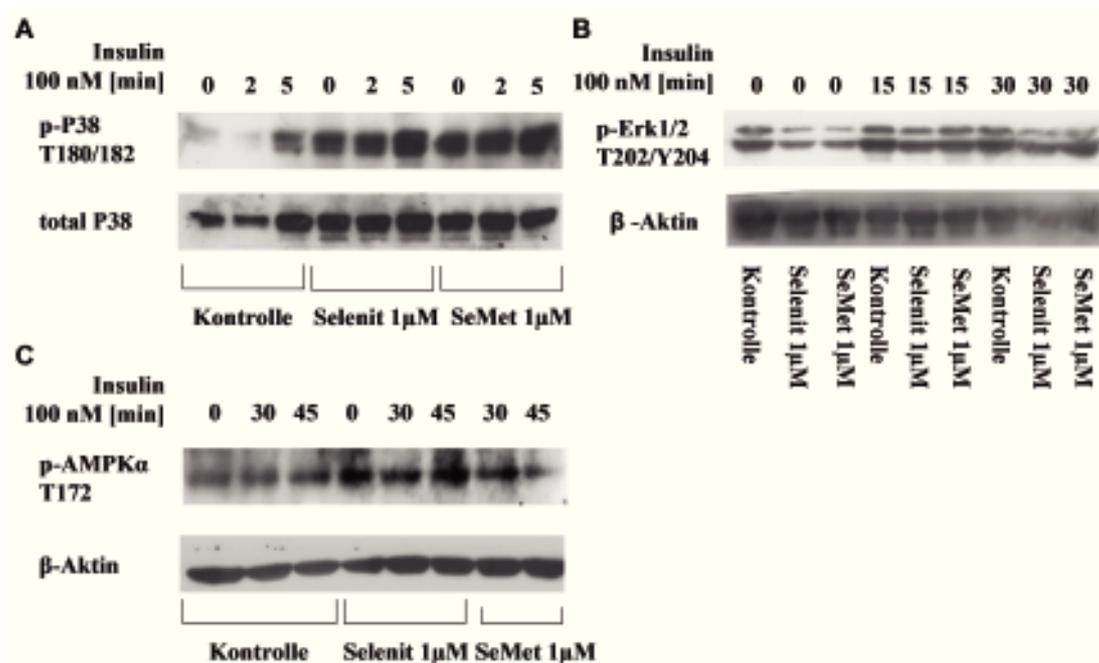


Abbildung 4.21: Selenit-abhängige Phosphorylierung der MAP-Kinasen P38 und Erk1/2 sowie der AMPK in L6. (A) Phosphorylierung der p-P38 an T180/182 nach 24 h Selenit bzw. SeMet 1  $\mu\text{M}$  und kurzer Insulinstimulation. (B) Phosphorylierung der Erk 1/2 an T202/Y204 nach 24 h Selenit bzw. SeMet 1  $\mu\text{M}$  und Insulinstimulation. (C) Phosphorylierung der AMPK an T172 nach 24 h Selenit bzw. SeMet 1  $\mu\text{M}$  und Insulinstimulation

Eine weitere wichtige Kinase, die den Energiestoffwechsel entscheidend mitbestimmt, ist die AMPK (Hardie, 2011). In Abbildung 4.21 C ist die Phosphorylierung der AMPK dargestellt. Insulin hat wenig Einfluss auf die Phosphorylierung der AMPK an T172 nach 30 bzw. 45 min. Allerdings zeigt sich bei Inkubation mit Selenit und SeMet eine leichte Erhöhung der Phosphorylierung.

Ein Einfluss auf den Zellmetabolismus erfolgt durch die Selenverbindungen, also nicht nur über die kanonische Insulinsignaltransduktion, sondern im geringen Umfang auch über andere Signalwege.

#### 4.1.11 Einfluss von Selenit auf die Expression von PGC-1 $\alpha$ in L6-Myotuben.

Die Adaptation des Skelettmuskels an physische Stimuli wird durch PGC-1 $\alpha$  mitkontrolliert, das für seine optimale Expression ein ausreichendes Maß an ROS benötigt (Irrcher et al., 2009)

Die Expression des Koaktivators der mitochondrialen Biogenese PGC-1 $\alpha$  wurde auf transkriptioneller Ebene bei 4-stündiger Insulinstimulation untersucht (St-Pierre et al., 2006; Choi et al., 2008) (Abbildung 4.20). Die Expression von PGC-1 $\alpha$  wird durch Insulin vermindert (Liang und Ward, 2006; Pagel-Langenickel et al., 2008). Selenit in 1 $\mu$ M Konzentration konnte alleine die PGC-1 $\alpha$ -mRNA-Expression nicht entscheidend regulieren. Eine Vorinkubation mit Selenit 1  $\mu$ M konnte die PGC-1 $\alpha$ -Genexpression signifikant vermindern und damit den Insulin Effekt verstärken.

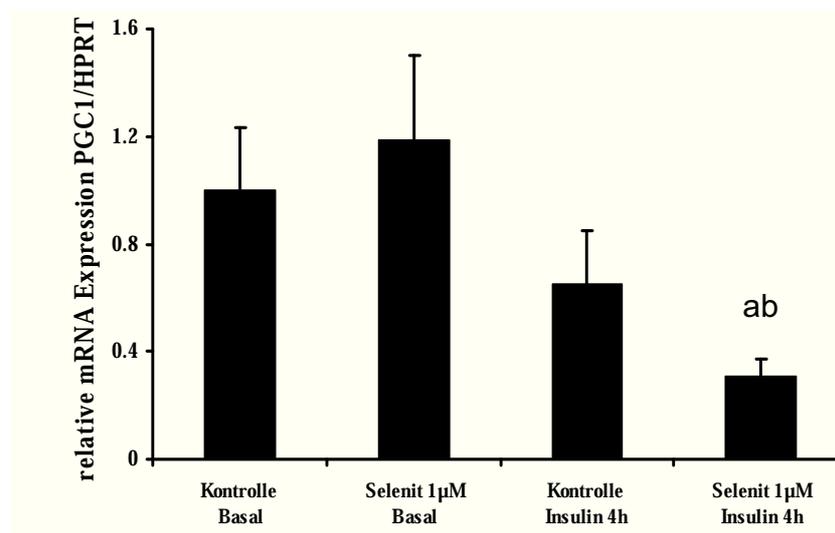


Abbildung 4.22: Einfluss von Selenit auf die Expression PGC-1 $\alpha$  in L6-Myotuben. Die mRNA-Expression von PGC-1 $\alpha$  bei 4 h Stimulation durch 100 nM Insulin und Vorinkubation mit 1  $\mu$ M Selenit für 24 h (a =  $p < 0.05$  gegenüber Kontrolle Basal, b =  $p < 0.05$  gegenüber Kontrolle Insulin 4h).

#### 4.1.12 Selenoprotein W-Induktion in L6-Myotuben durch Inkubation mit Selenoprotein P

Selenoprotein P, das physiologische Selentransportprotein im Plasma, sollte ein guter Selendonator auch für ausdifferenzierte Myotuben sein. Da die ausdifferenzierten Myotuben bei Serumdeprivation eine geringe Expression von Selenoprotein W aufweisen, und die Expression des Selenoprotein W durch Gabe von Selen induziert wird, kann die Bioverfügbarkeit von Selenverbindungen für Myotuben an der SelW-Expression gemessen

werden. Um zu bestimmen, welche Selenverbindung die beste Bioverfügbarkeit hatte, wurden ausdifferenzierte Myotuben mit 100 nM Selen in Form von Selenat, Selenit, SeMet, humanem Selenoprotein P und Ratten-Selenoprotein P 24 h lang inkubiert. Der Se-Gehalt der Selenoprotein P Präparationen wurde wie in Abschnitt 3.4.3 beschrieben bestimmt. Bei Selenoprotein P wurde aufgrund seiner Funktion als Selentransporter die höchste Induktion erwartet. Während die Kontrolle keine SelW-Expression zeigte, war bei den niedermolekularen Selenverbindungen die Proteinexpression bei Selenit am höchsten, wie es sich schon bei der GPx-Aktivität in Abschnitt 4.1.2 gezeigt hatte. Durch Selenoprotein P konnte die Expression noch weiter gesteigert werden, unabhängig davon, ob es sich um SelP aus Ratte oder Mensch handelte (Abbildung 4.23).

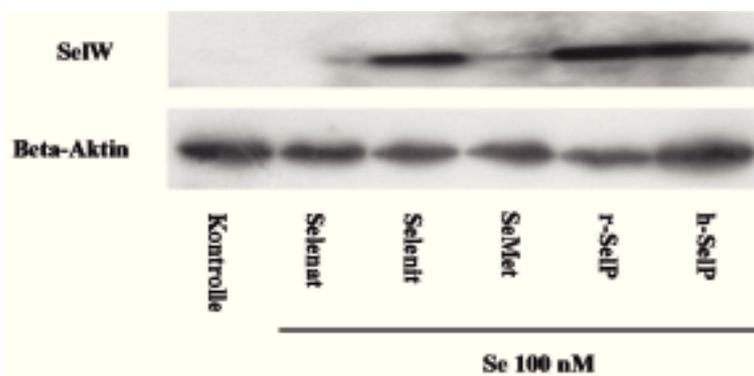


Abbildung 4.23: Nachweis der Induktion von SelW durch verschiedene niedermolekulare Selenverbindungen und Selenoprotein P in L6-Myotuben. Die Selenverbindungen Selenat, Selenit, SeMet, Selenoprotein P aus Ratte (r-SelP) und humanes Selenoprotein P (h-SelP) wurden in 100 nM Konzentrationen eingesetzt. Ausdifferenzierte L6-Myotuben wurden 24h mit Selenverbindungen inkubiert.

Selenoprotein P scheint also eine hervorragende Quelle für bioverfügbares Selen in Skelettmuskelzellen zu sein und effizienter in endogene Selenoproteine eingebaut zu werden als die niedermolekularen Verbindungen. Dies bestätigt die Annahme aus Burk und Hill (2009), dass Muskelzellen beide Arten von Selenquellen nutzen können.

#### 4.1.13 Einfluss von Selenoprotein P auf die Aktivierung der Akt in L6-Myotuben

Weiterhin sollte der Einfluss des SelP auf die Insulinsignaltransduktion untersucht werden. Dazu wurden L6-Myotuben für 6 h oder 24 h mit Selenoprotein P inkubiert und dann mit Insulin 100 nM stimuliert und auf Phosphorylierung der Akt untersucht. Zusätzlich zum 24 h Zeitpunkt wurde ein Zeitpunkt nach 6 h gewählt, um eine bereits extrazellulär durch Selenoprotein P vermittelte Signalwirkung detektieren zu können. Nach 6 h Inkubation mit Selenoprotein P war eine Inhibition der Akt-Phosphorylierung nach 15 min Insulinstimulation sichtbar. Eine Inkubation mit Selenit führte im Vergleich zur Kontrolle nach 6 h zu einer

leichten Steigerung der Akt-Phosphorylierung nach 15 min Insulinstimulation (Abbildung 4.24A). Nach 30 min Insulinstimulation zeigten sich kaum Unterschiede zur Kontrolle bei Inkubation durch Selenoprotein P, so dass von einer Verzögerung der Insulinwirkung gesprochen werden kann. Auch die Inkubation mit Selenit zeigte nach 30 min kaum Unterschiede zur Kontrolle.

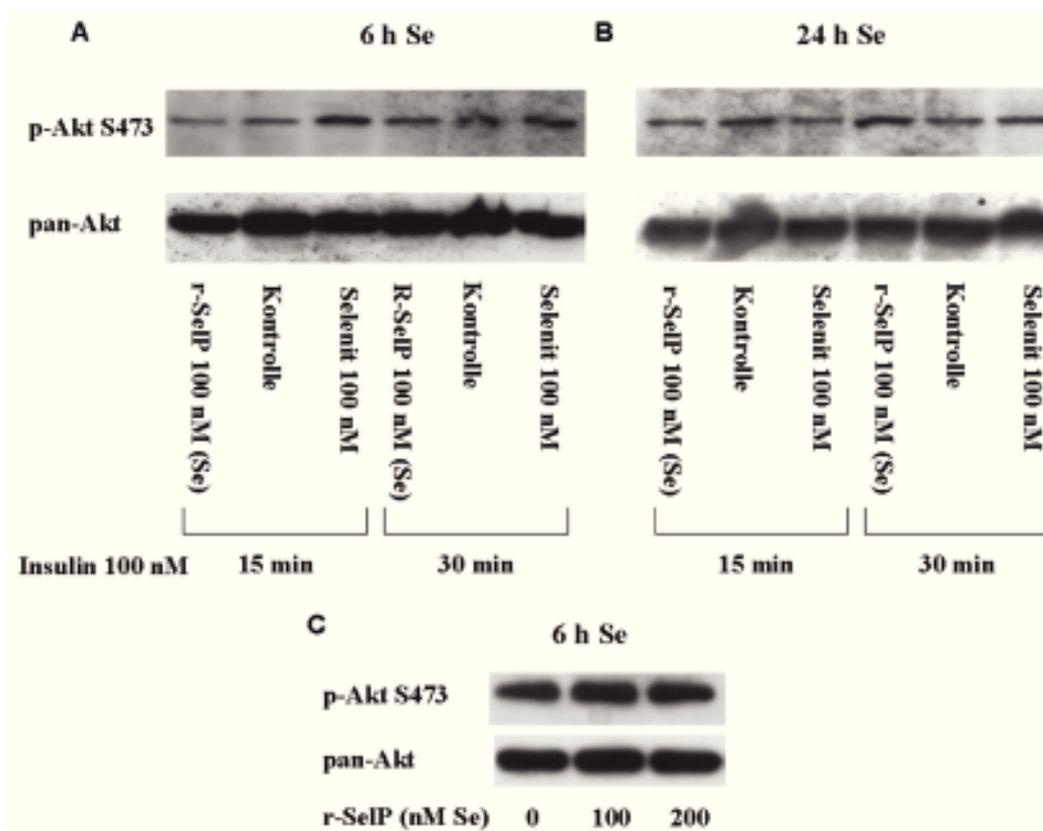


Abbildung 4.24: Einfluss von Selenoprotein P auf die Akt-Phosphorylierung in L6-Zellen. 100 nM Selenoprotein P oder Selenit wurden 6 h (A) oder 24 h (B) lang zu L6-Myotuben hinzugegeben. Anschließend wurden die Myotuben 15 oder 30 min lang mit Insulin 100 nM stimuliert. In (C) ist die Phosphorylierung in Myoblasten nach 15 min Inkubation mit 100 nM Insulin dargestellt (Konzentrationen sind auf Se-Gehalt bezogen).

Nach 24 h Inkubation und 15 min Insulinstimulation (Abbildung 4.24B) besaß Selenoprotein P noch eine leichte inhibierende Wirkung auf die Phosphorylierung der Akt. Bei 30 minütiger Insulinstimulation führte Selenoprotein P zu keiner verminderten Phosphorylierung der Akt. Selenit verminderte wie in Abbildung 4.8 gezeigt die Insulinwirkung bei 15 min. Eine vergleichbare Inhibition des Insulinsignalings durch Selenoprotein P bei Myoblasten nach 15 minütiger Stimulation mit 100 nM Insulin blieb auch bei einer Erhöhung der Konzentration auf 200 nM SeIP aus (Abbildung 4.24C). Der zeitabhängige Unterschied der Inhibition in den Myotuben kann an einer unterschiedlichen Metabolisierung zwischen Selenoprotein P und Selenit liegen.

## **4.2 Einfluss des Selentransportproteins Selenoprotein P auf die Insulinsignaltransduktion in humanen Skelettmuskelzellen**

Primäre humane Skelettmuskelzellen (HSKMC) wurden von der Firma Provitro bezogen und wie in Abschnitt 3.2 beschrieben kultiviert. Die Ausdifferenzierung zu Myotuben war bereits nach 4 Tagen zu beobachten, eine längere Differenzierung führte zu einer verringerten Zellzahl. Morphologisch verhielten sich die humanen Skelettmuskelzellen vergleichbar zu den L6-Zellen, nur ihr Zellvolumen schien etwas geringer zu sein, was sich am geringeren Kontrast unter dem Lichtmikroskop zeigte.

Ausgehend von einer Studie, in der *in vivo* und *in vitro* gezeigt wurde, dass hohe Konzentrationen an appliziertem Selenoprotein P eine Insulinresistenz in Muskel und Leber hervorrufen können (Misu et al., 2010), sollte nun der Einfluss von Selenoprotein P auf die Insulinsignaltransduktion in humanen Skelettmuskelzellen untersucht werden.

### **4.2.1 Beeinflussung der Akt Phosphorylierung durch humanes Selenoprotein P in HSKMC**

Ausdifferenzierte HSKMC wurden für 18 h in Differenzierungsmedium von allen Wachstumsfaktoren depriviert, und anschließend mit 200 nM Selenoprotein P (festgelegt auf den Se-Gehalt der Stammlösung, bestimmt nach Abschnitt 3.4.3) inkubiert, so dass man im physiologischen Bereich der Selenoprotein P-Plasmakonzentration blieb (Letsiou et al, 2010). Die sechsstündige Inkubationszeit der Muskelzellen wurde gewählt, da vermutet wurde, dass Selenoprotein P eine rezeptorvermittelte Wirkung haben könnte. Zusätzlich wurde auch die Phosphorylierung der PKB nach 24 h SelP-Inkubation untersucht. Nach Abschluss der SelP-Inkubation wurden die HSKMC 15 min einem 100 nM Insulinstimulus ausgesetzt. In Abbildung 4.25 sind die Ergebnisse der Phosphorylierung der Akt an S473 nach 6 h und 24 h Selenoprotein P-Behandlung dargestellt. Selenoprotein P verringerte nach 6 h deutlich die Insulinwirkung auf die Phosphorylierung der Akt, auch die basale Phosphorylierung war verringert. Es zeigte sich, dass durch die zusätzliche Inkubationszeit, unabhängig ob Selenoprotein P zugegeben wurde oder nicht, eine verstärkte Phosphorylierung der Akt vorlag. Die zeitabhängigen Unterschiede bei Inkubation mit SelP könnten durch einen Wechsel von extrazellulärer Signalwirkung des Selenoprotein P nach 6 h und zu einer intrazellulären Wirkung des Selenoprotein P nach 24 h durch Aufnahme und Metabolisierung herrühren.

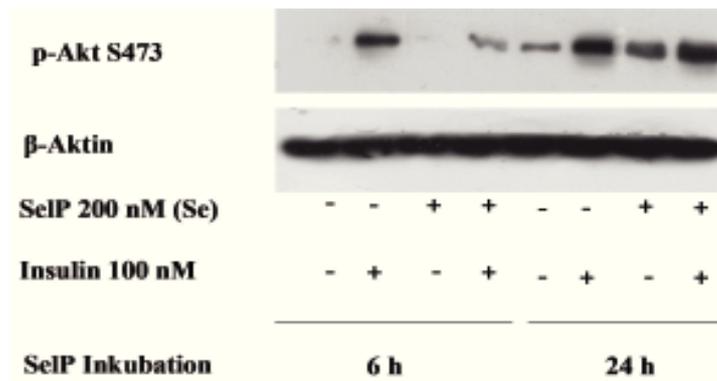


Abbildung 4.25: Phosphorylierung der Akt an Serin 473 nach 6 h oder 24 h Inkubation mit Selenoprotein P in HSKMC. Nach gleicher Wachstumsfaktorendeprivationszeit wurde 6 h oder 24 h mit Selenoprotein P 200 nM inkubiert und anschließend wurde 15 min mit 100 nM Insulin stimuliert. Als Kontrollen dienten Überstände nicht mit Selen kultivierter HepG2-Zellen. Es wurde auf  $\beta$ -Aktin normiert.

Eine densitometrische Auswertung der Phosphorylierung der Akt nach 6 h SelP-Inkubation zeigte eine signifikante Verminderung der Insulinstimulation um 60% (Abbildung 4.26). Die Proteinexpression der Akt (pan-Akt) wurde nicht beeinflusst.

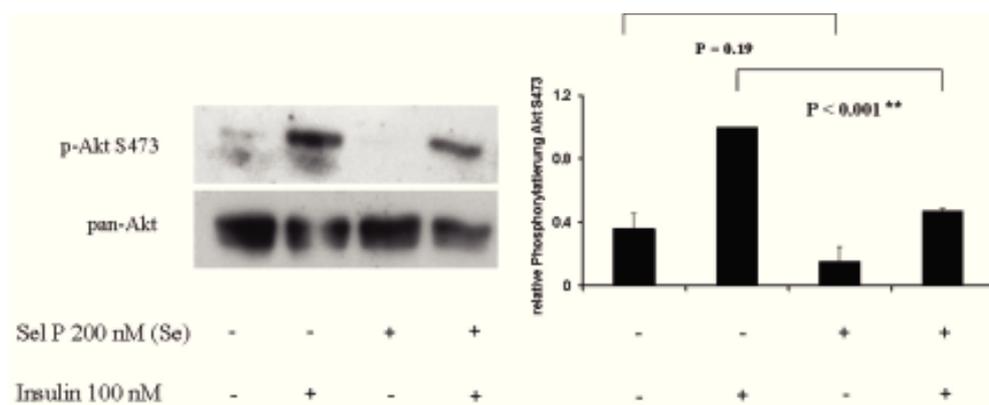


Abbildung 4.26: Selenoprotein P induzierte Inhibition der Akt-Phosphorylierung in HSKMC unter Insulinstimulation nach 6 h. Die Selenkonzentration der Überstände wurde, wie in 3.4.3 beschrieben, bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem T-test und zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 3).

Niedermolekulare Selenverbindungen, wie Selenit oder SeMet, konnten bei den HSKMC in der Konzentration von 200 nM keine vergleichbaren Veränderungen bei der Akt-Phosphorylierung an Serin 473 hervorrufen (Abbildung 4.27).

Die Wirkung von SelP auf den Phosphorylierungsstatus der Akt war nicht mit Veränderungen im zellulären ROS-Status korreliert, da eine Verringerung der ROS-Produktion durch Selenoprotein P nicht beobachtet wurde, während Selenit 200 nM das gemessene ROS-Niveau in HSKMC senken konnte (DCF-Messung nicht dargestellt).

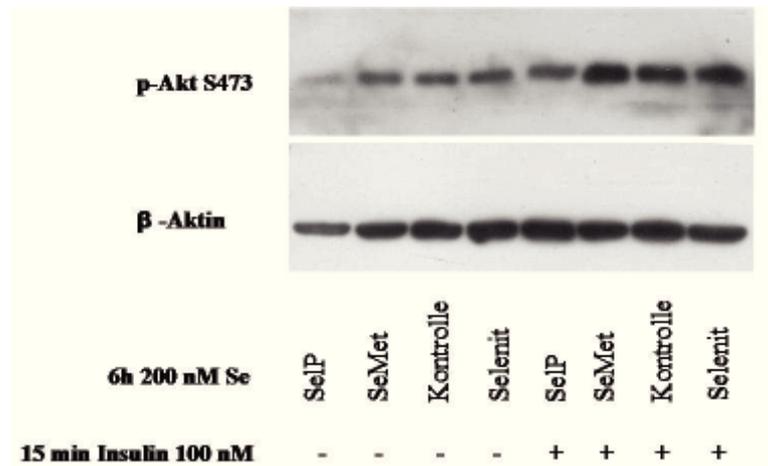


Abbildung 4.27: Einfluss niedermolekularer Selenverbindungen auf die Aktivierung der Akt. HSKMC wurden 6 h mit SeMet und Selenit in der gleichen Se-Konzentration von 200 nM wie SeLP inkubiert und anschließend mit 15 min Insulin stimuliert. Die niedermolekularen Selenverbindungen wurden in allen Experimenten anteilig wie die HepG2-Überstände in RPMI-Medium angesetzt, da der Glucosegehalt des RPMI-Mediums höher ist als der des HSKMC Mediums.

Um die Aktivierung der Akt durch Insulin und die Inhibition durch SeLP weiter zu validieren, wurde ein Akt-Aktivitäts-Assay durchgeführt. Dazu wurde ein System von Promokine (Heidelberg) benutzt, das die Akt-Aktivität über eine Immunopräzipitation (IP) der Akt nachweist. Die Akt phosphoryliert dann unter ATP-Verbrauch zugesetztes GSK3 $\alpha$ . Die Aktivität der Akt ist primär von der Phosphorylierung an S473 abhängig. Diese durch Insulin induzierte Phosphorylierung an S473 wurde durch Selenoprotein P-Präinkubation unterdrückt (siehe 4.2.1). Wie erwartet, wurde weniger GSK $\alpha$  phosphoryliert, wenn mit Selenoprotein P vorinkubiert wurde (Abbildung 4.28). Bei anschließender Insulinstimulation wurde eine signifikant verringerte GSK $\alpha$ -Phosphorylierung erreicht. Mit Selenit wurde kaum eine Veränderung in der Akt-Aktivität erzielt.

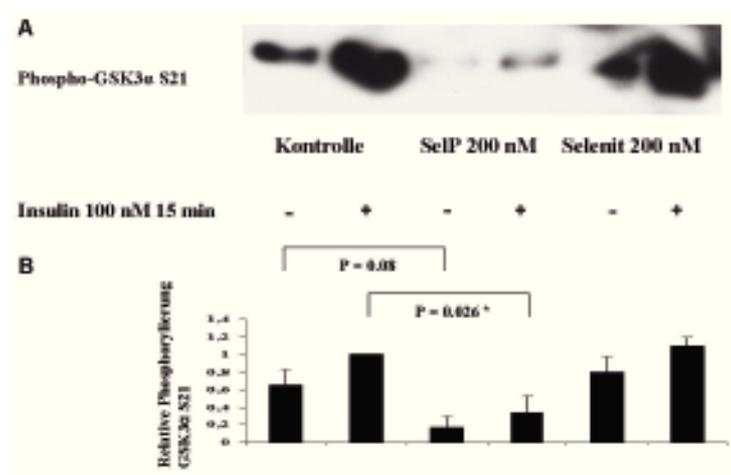


Abbildung 4.28: Akt-Aktivität nach Insulinstimulation und Inkubation mit Selenoprotein P. Nach 6 h Inkubation mit Selenoprotein P oder Selenit 200 nM wurde 15 min mit 100 nM Insulin stimuliert. Nach Immunopräzipitation der Akt und Durchführung der Substratreaktion wurde das Produkt Phospho-

GSK3 $\alpha$  per Immunoblot nachgewiesen (A). In B ist die densitometrische Auswertung unabhängiger Experimente mit Selenoprotein P (n = 3) und Selenit (n = 2) dargestellt.

Als direktes Akt-Substrat wurde weiterhin die Phosphorylierung von FoxO1a/3 bei gleichen Bedingungen untersucht. Insulin steigerte die Phosphorylierung von FoxO1a/3, Selenoprotein P wirkte dem Insulin entgegen und konnte die induzierte Phosphorylierung wieder senken; Nach Insulinstimulation wurde eine signifikante Verringerung erreicht (Abbildung 4.29). Diese Effekte sind analog zu den bei der Akt beobachteten Phosphorylierungen und könnten direkt auf die FoxO-Proteine übertragen worden sein, da sie Substrate der Akt sind (Gross et al., 2008).

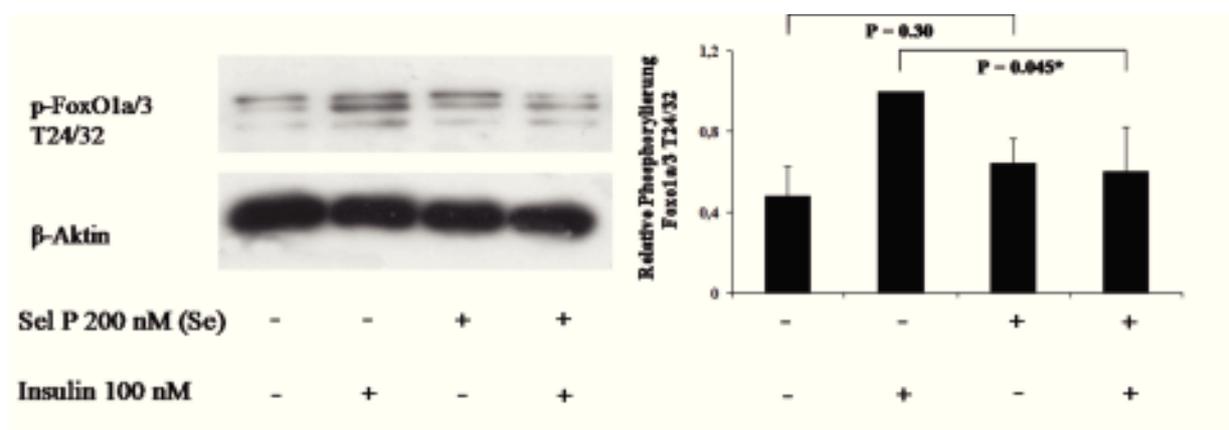


Abbildung 4.29: Phosphorylierung von FoxO1a/FoxO3 an T24/32 unter 6 h Selenoprotein P-Einfluss. Auf der rechten Seite ist jeweils die densitometrische Auswertung von 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. HSKMC wurden 6 h mit Selenoprotein P 200 nM oder HepG2-Kontrollüberständen behandelt und anschließend 15 min lang mit Insulin 100 nM stimuliert.

#### 4.2.2 Induktion der GPx1 durch Selenoprotein P in HSKMC

Die GPx1 wurde per Immunoblot mit einem monoklonalen Antikörper aus Kaninchen (Epitomics, CA, USA) bei 22 kDa nachgewiesen, wie in Abbildung 4.30A dargestellt. Die Expression der GPx1 wurde nach 6 h Selengabe in Form von Selenoprotein P oder Selenit bei gleicher Konzentration von 200 nM Se untersucht. Es erfolgte eine Induktion der GPx1 durch Selenoprotein P, während Selenit keine stärkere Expression hervorrief. Weiterhin wurde die GPX1-Genexpression untersucht. Es wurde ebenfalls für 6 h mit Selenoprotein P oder Selenit 200 nM inkubiert. In Abbildung 4.30B sind die Ergebnisse der Genexpression dargestellt. Die GPX1-Expression wurde durch Selenoprotein P nach 6 h Inkubation nur ca. 1,75-fach erhöht, Selenit konnte die Genexpression der GPX1 2,5-fach stimulieren. Selenoprotein P scheint also die Translation der GPx1 stärker zu stimulieren, während Selenit die Transkription der GPX1 stärker induziert. Eine mögliche Erklärung ist, dass Selenoprotein P schneller Selen für die Biosynthese der Selenoproteine zur Verfügung stellen kann. Die Stimulation der GPx1 könnte zur SelP-induzierten Unterdrückung der Akt-Phosphorylierung beigetragen haben.

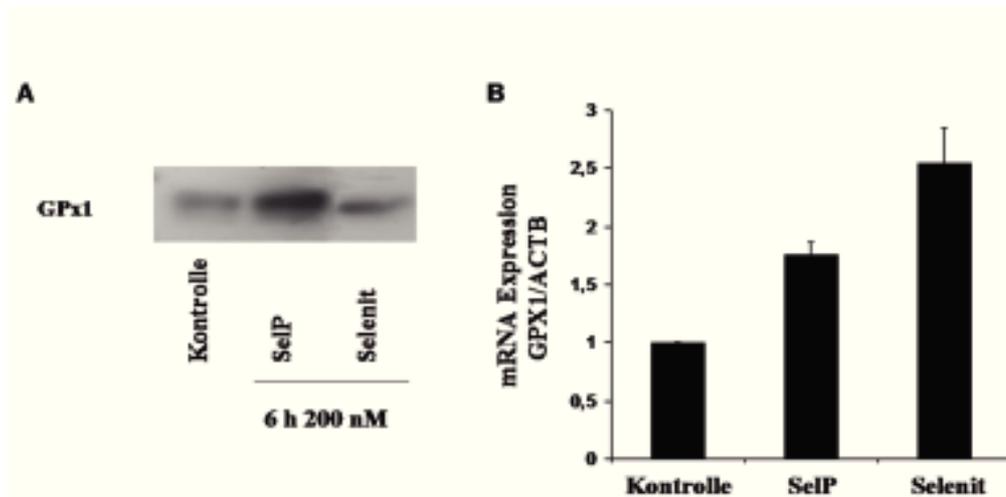


Abbildung 4.30: Protein und Genexpression der GPx1. (A) Proteinexpression nach 6 h Inkubation mit 200 nM Selenoprotein P oder Selenit. (B) Die GPX1-mRNA Niveaus nach 6 h Inkubation mit 200 nM Selenoprotein P oder Selenit.

Selenoprotein W konnte mit dem einzigen kommerziell erhältlichen Antikörper in den humanen Zellen nicht nachgewiesen werden, was für diesen Antikörper bereits in der Literatur berichtet wurde (Gu et al., 2000). Der Nachweis von SelW mittels Real-Time-PCR durch spezifische Primer zeigte trotz Anwendungen der Primer3-Algorithmen ein zweites Produkt. Deshalb wurde auf eine Darstellung der Ergebnisse verzichtet, es konnte aber ebenfalls keine starke Induktion der SelW-mRNA beobachtet werden. Das zweite Produkt könnte von einem Pseudogen SelW herrühren (SEPW1P), das bisher nur in Menschen bekannt ist und für *miRNA* kodieren könnte (Bellingham et al., 2003).

#### 4.2.3 Nachweis insulinabhängiger Phosphorylierung von Proteinen unter Einfluss von Selenoprotein P

Nach dem Nachweisen einer Inhibition der Insulinwirkung durch Selenoprotein P sollte untersucht werden, ob Selenoprotein P weitere insulinsensitive Phosphorylierungsstellen von Proteinen beeinflussen kann. Bei den hier dargestellten Kinasen und Proteinen handelt es sich um nicht-kanonische Mediatoren der Insulinsignalkwirkung, die in der Pathogenese der Insulinresistenz eine Rolle spielen können. (Hajdusch et al., 1998; Kortylewski et al., 2003; Bisht et al., 2007; Berdichevsky et al., 2010; Kim et al., 2011b).

Zunächst wurden die MAP-Kinasen untersucht. Die P38 und Erk1/2 wurden auf ihre insulinsensitiven Phosphorylierungsstellen (p-P38, T180/182; p-Erk1/2, T202/204) untersucht. In Abbildung 4.31 ist die Phosphorylierung der beiden Kinasen nach 6 h Inkubation mit 200 nM Selenoprotein P und 15 min Stimulation mit 100 nM Insulin

dargestellt. Nach 6 h Inkubation mit Selenoprotein P war die basale Phosphorylierung an T180/Y182 der P38 (Abbildung 4.31A) um 50% verringert. Die Stimulation mit Insulin hatte kaum einen Einfluss auf die Phosphorylierung der P38, unabhängig davon ob mit SelP inkubiert wurde oder nicht. In Abbildung 4.31B ist die Phosphorylierung der Erk1/2 an T202/Y204 zu sehen. Durch Zugabe von Selenoprotein P für 6 h konnte die Phosphorylierung etwas verringert werden. Allerdings konnte Selenoprotein P den Phosphorylierungsstatus weder basal noch unter Insulinstimulation signifikant ändern, es zeigte sich aber tendenziell eine Verringerung der Phosphorylierung.

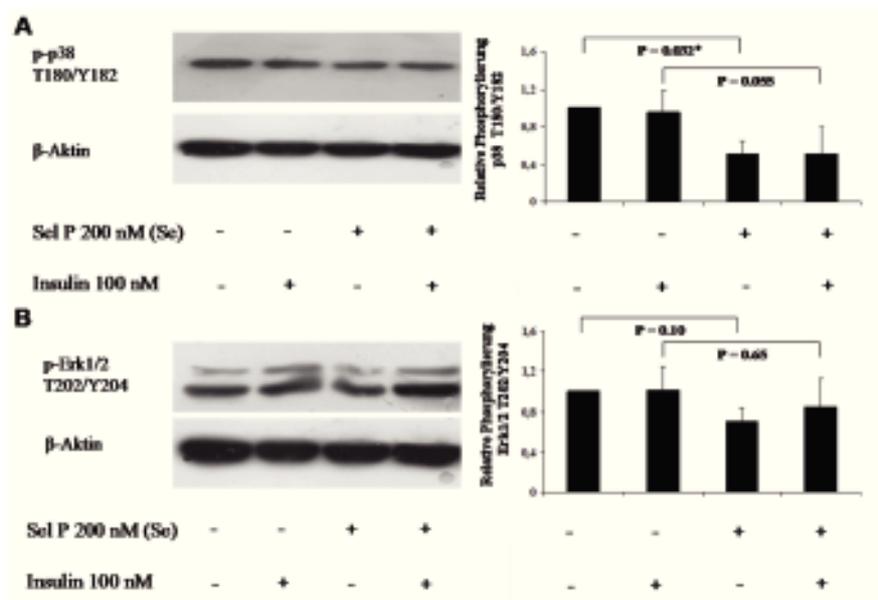


Abbildung 4.31: Phosphorylierung der P38 an T180/Y182 (A) und der Erk1/2 an T202/Y204 (B) unter 6 h Selenoprotein P-Einfluss. Auf der rechten Seite ist jeweils die densitometrische Auswertung von 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. HSKMC wurden 6 h mit Selenoprotein P 200 nM oder HepG2-Kontrollüberständen behandelt und anschließend 15 min lang mit Insulin 100 nM stimuliert.

Mit JNK und STAT3 wurden zwei weitere Proteine untersucht (Abbildung 4.32), die am Insulin-Signaling beteiligt sein können. In den HSKMC führte Insulin zu einer verminderten STAT3-Aktivierung an Y705 (Abbildung 4.32A). Durch Selenoprotein P wurde das basale Niveau der STAT3-Phosphorylierung kaum beeinflusst. Allerdings konnte die Verminderung durch Insulin von SelP aufgehoben werden. Ähnliche Befunde ergaben sich bei Kim et al., (2011b) bei der Stimulation mit IL-6.

Unter den hier gewählten Bedingungen wurden zwei Isoformen der JNK (p54 und p46) detektiert (Abbildung 4.32B). Insulin führte zu einer verstärkten Phosphorylierung der JNK an T183/T185, was eine Aktivierung bedeutet. Basal konnte Selenoprotein P ebenfalls im geringeren Umfang die JNK aktivieren, bei Insulinstimulation führte Selenoprotein P zu einer verringerten JNK-Aktivierung.

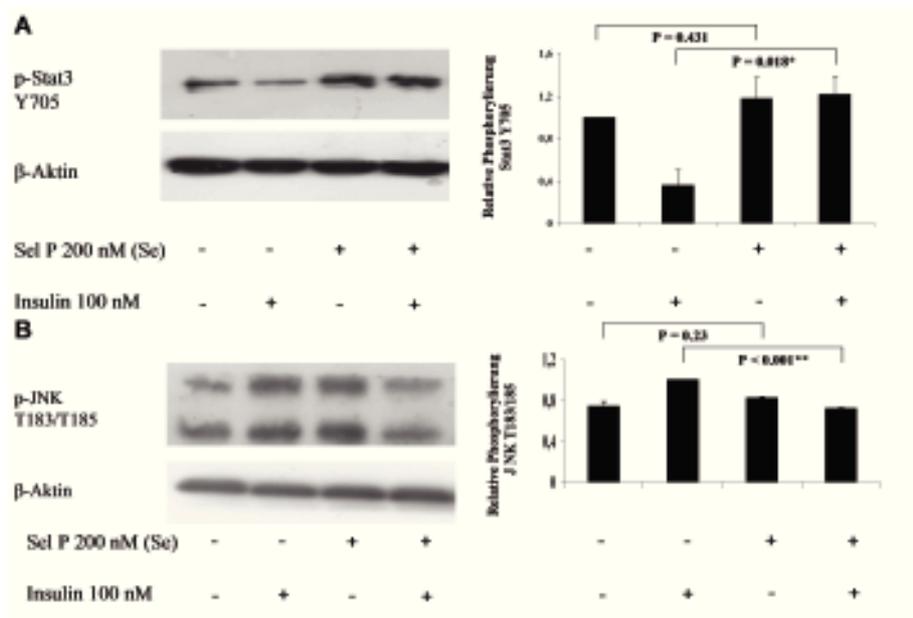
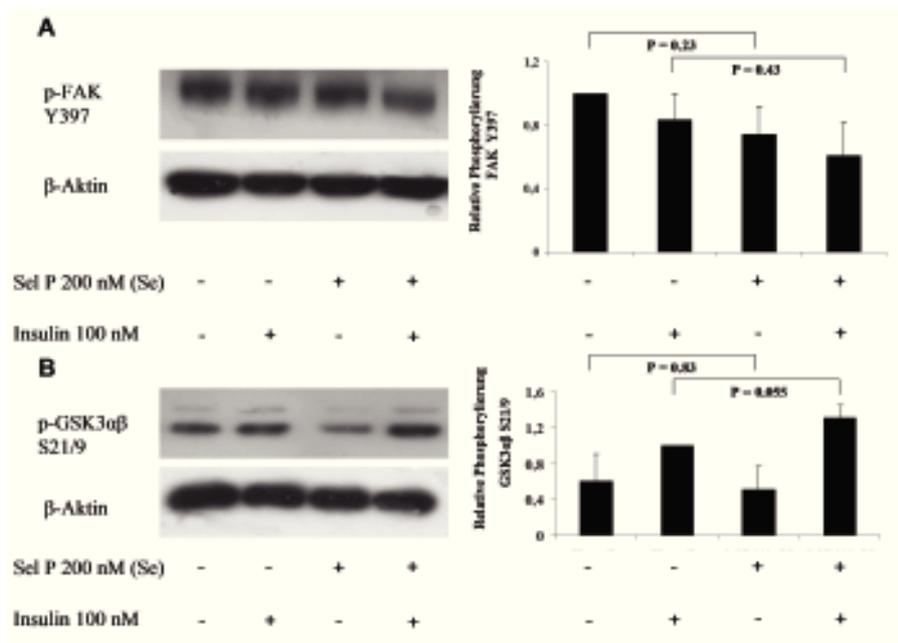


Abbildung 4.32: Phosphorylierung von STAT3 an Y705 (A) und der JNK an T183/T185 (B) unter 6 h Selenoprotein P Einfluss. Auf der rechten Seite ist jeweils die densitometrische Auswertung von 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. HSKMC wurden 6h mit Selenoprotein P 200 nM oder HepG2-Kontrollüberständen behandelt und anschließend 15 min mit Insulin 100 nM stimuliert.

Als Nächstes wurden, wie in Abbildung 4.33 dargestellt, die Fokale Adhäsionskinase (FAK) und Glycogensynthasekinase 3 untersucht. Die FAK befindet sich in den fokalen Adhäsionspunkten von Aktinfasern und leitet hauptsächlich Signale der extrazellulären Matrix, z.B. von Integrinen ausgehend, weiter (Parsons et al., 2000). Die FAK ist aber auch ein Substrat des Insulinrezeptors und damit an der Weiterleitung des Insulinsignalings beteiligt (Baron et al., 1998; Goel und Dey, 2002). Bei der FAK zeigte sich durch Insulin nur eine geringfügige Verminderung der Phosphorylierung, durch Selenoprotein P verringerte sich die Phosphorylierung tendenziell weiter, es ergab sich aber keine signifikante Veränderung.



**Abbildung 4.33: Phosphorylierung der FAK an Y397 (A) und der GSK3αβ an S21/9 (B) unter 6 h Selenoprotein P Einfluss. Auf der rechten Seite ist jeweils die densitometrische Auswertung von 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. HSKMC wurden 6h mit Selenoprotein P 200 nM oder HepG2-Kontrollüberständen behandelt und anschließend 15 min mit Insulin 100 nM stimuliert.**

Die Glycogensynthasekinase (GSK3) ist eine Serin-Threonin-Kinase, die an Glycogenmetabolismus und Zellproliferation beteiligt und direktes Substrat der Akt ist. Die beiden Isoformen alpha und beta besitzen strukturell gleiche Phosphorylierungstellen an Serin 21 bzw. 9, die beide Akt-Ziele sind; durch die Phosphorylierung an Ser 21/9 wird die GSK3 inaktiviert. Durch Insulin wurde die GSK3αβ verstärkt inaktiviert, was mit der Literatur vereinbar ist (Cross et al., 1995). Basal war bereits eine Phosphorylierung der beiden GSK3 Isoformen vorhanden (Abbildungen 4.33B). Selenoprotein P führte basal zu kaum einer Veränderung, während die Inaktivierung der GSK3 durch Insulin bei 6 h Selenoprotein P Inkubation leicht verstärkt wurde (ca. 30%  $p = 0.055$ ). Da die Akt-Aktivierung durch Selenoprotein P vermindert wurde und ähnliches sich auch im Akt-Substrat FoxO1a/3 wiederfand, scheinen hier andere Kinasen aktiv zu sein, die zumindest teilweise mit dem Insulinsignaling interferieren.

Als weitere wichtige Kinase im Energiestoffwechsel wurde, wie bereits bei den L6-Zellen, die Phosphorylierung der AMPK an Thr172 untersucht (Abbildung 4.34).

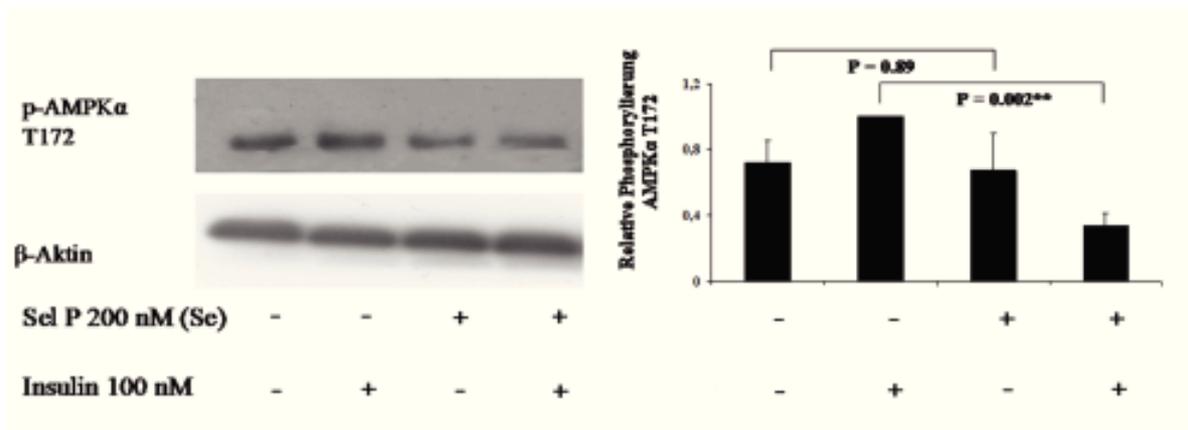


Abbildung 4.34: Phosphorylierung der AMPK an T172 unter 6 h Selenoprotein P Einfluss. Auf der rechten Seite ist jeweils die densitometrische Auswertung von 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. HSKMC wurden 6h mit Selenoprotein P 200 nM oder HepG2-Kontrollüberständen behandelt und anschließend 15 min lang mit Insulin 100 nM lang stimuliert.

Die AMPK ist ein Energiesensor innerhalb der Zelle, der auf Stimuli wie Glucose und Aminosäuren reagiert, die das AMP/ATP-Verhältnis verändern. Er kann aber auch durch Wachstumsfaktoren und Zytokine beeinflusst werden kann (Viollet et al., 2010). Die Aktivierung der AMPK durch Phosphorylierung an T172 konnte durch Selenoprotein P ebenfalls deutlich unterdrückt werden, was die Ergebnisse aus Misu et al (2010) bestätigt..

#### 4.2.4 Einfluss von Selenoprotein P auf die insulinabhängige Genexpression

Außer der Aktivierung bzw. Inaktivierung wichtiger Signalmoleküle, sollte auch der Einfluss des Selenoprotein P auf die von Insulin induzierte Genexpression untersucht werden. Dazu wurden Gene ausgewählt, die durch zeitlich begrenzte Insulinstimuli induziert werden können. Egr1 (Early Growth response 1) ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Regulation der NADP<sup>+</sup>-abhängigen Malatdehydrogenase durch Insulin beteiligt ist und auch weitere insulinabhängige Gene regulieren kann (Barroso und Santisteban, 1999; Baron et al., 2006). Die maximale Expression nach Insulinstimulus wird bereits nach 1 h erreicht (Barroso und Santisteban, 1999). Für die Genexpressionsexperimente wurde 6 h lang mit Selenoprotein P oder Kontrollüberständen vorbehandelt und anschließend 45 min mit Insulin 100 nM stimuliert. Nach Insulinstimulation war der Gehalt an Egr1-Transkripten um das 1,7fache erhöht (Abbildung 4.35A). Selenoprotein P führte nach 6 h zu einer geringen basalen Abnahme des Egr1, bei Insulinstimulation konnte Selenoprotein P die Regulation des Egr1 unterdrücken. Da die Egr1-Transkription hauptsächlich über die Akt oder MAP-Kinasen reguliert wird (Barroso und Santisteban, 1999; Kim et al., 2011a), ist dieser Befund in guter Übereinstimmung mit der Inhibition der Akt und der Mitogen-aktivierten Kinasen in

Abschnitt 4.2.3. Als weiteres „*immediate early gene*“ im Skelettmuskel gilt die PKC $\delta$ , die schon nach wenigen Minuten induziert wird (Horovitz-Fried et al., 2006). Allerdings konnte hier nach 45 min Insulinstimulation mit 100 nM kein regulatorischer Effekt von Insulin auf die PKC $\delta$  (Genname: PRKCD) nachgewiesen werden (Abbildung 4.35B). Die Inkubation mit Selenoprotein P führte zu einer Steigerung der PRKCD-Transkription um den Faktor 2, die allerdings keine Signifikanz erreichte. Nichtsdestotrotz deutet die verstärkte Transkription der PKC $\delta$  auf einen regulatorischen Einfluss durch Selenoprotein P hin.

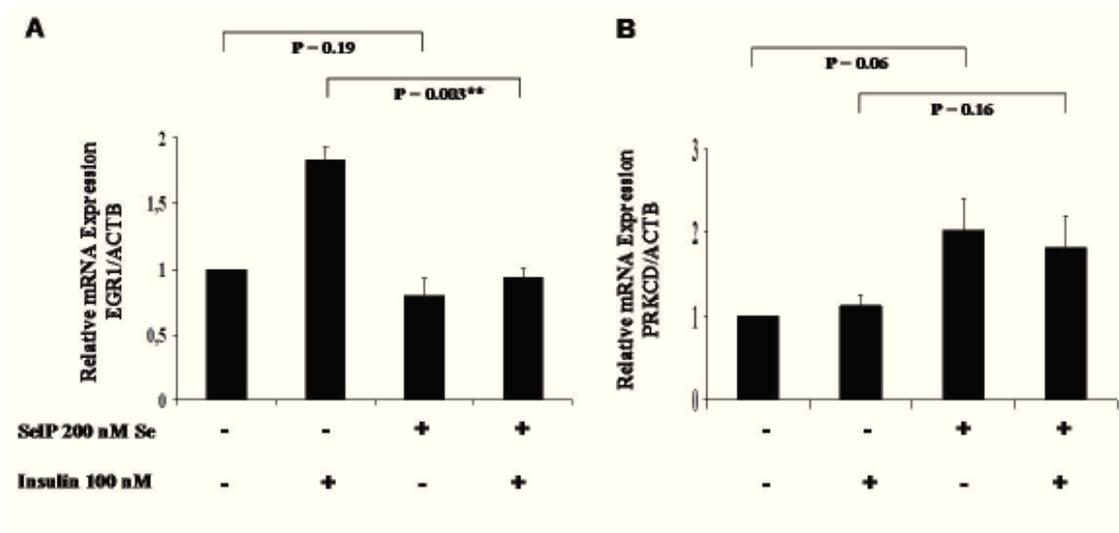


Abbildung 4.35: Genexpression des Transkriptionsfaktors Egr1 (A) und der PKC $\delta$  (PRKCD) (B) in humanen Skelettmuskelzellen nach 6 h Selenoprotein P Inkubation und anschließender 45 minütiger Stimulation mit 100 nM Insulin. Die Expressionsniveaus der Gene wurden auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert.

Als weitere insulinabhängige Gene wurden die MKP-1 (MAP Kinase Phosphatase 1) und SREBP-1c (*Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c*) untersucht. Die MKP-1 wird ebenfalls innerhalb kurzer Zeit über MAP-Kinasen durch Insulin induziert und kann der von Insulin induzierten Phosphorylierung entgegenwirken (Kusari et al., 1997; Byon et al., 2001). Ein Fehlen der MKP-1 kann zu Insulinresistenz führen (Wu et al., 2006). SREBP-1c ist wichtiger Regulator des Fettsäurestoffwechsel dessen Expression durch Insulin induziert wird (Wong und Sul, 2010). Seine transkriptionelle Regulation (Genname: SREBF1) ist unter anderem abhängig von PKC $\lambda$  und der PI3K/Akt-Signalachse (Taniguchi et al., 2006; Boonsong et al., 2007). Ein Einfluss von SeP auf die Transkription von MKP-1 und SREBP-1c war nach 6 h nicht zu beobachten.

### **4.3 Einfluss von Selensupplementation auf die Signaltransduktion und Genexpression in Insulinzielgeweben von *Sus Scrofa*.**

In Kooperation mit den Universitäten von Surrey und Reading wurde eine Tierstudie zu metabolischen und molekularen Auswirkungen einer Ernährung mit erhöhtem Selenanteil in einem Hausschweinmodell (*Sus Scrofa*) durchgeführt. In der Studie wurden zwei verschiedene Ernährungsgruppen à 6 Tiere gebildet, die jeweils 16 Wochen lang entweder mit einer kontrollierten Nahrungszufuhr von 0.17 mg/kg Se als adäquate Selenversorgung oder 0.5 mg/kg Se als eine erhöhte Selensupplementation gefüttert wurden. Die Selensupplementation von 0.5 mg/kg Se orientierte sich an Stranges et al. (2007), so dass sie der im NPC-Trial von den Probanden eingenommen Selenmenge von 200 µg Se/Tag entsprach (Combs et al., 1996). Die adäquate Selenzufuhr (0.17 mg/kg Se) wurde anhand der Sättigung der GPx1-Aktivität in verschiedenen Tiermodellen bei 0.15 mg/kg Se gewählt (persönliche Kommunikation Dr. Darren Juniper; Barnes et al., 2009). Neben der Bestimmung von metabolischen Parametern aus Plasmaproben, die hauptsächlich von den Kooperationspartnern gemessen wurden, sollten in dieser Arbeit die Hauptzielgewebe des Insulins, Leber, viszerales Fettgewebe und Skelettmuskel, auf Veränderungen im Phosphorylierungsstatus relevanter Kinasen des Energiestoffwechsels und in der Expression von Genen des Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsels untersucht werden. Für ein umfassendes Verständnis der endokrinen Wechselwirkungen zwischen den Geweben war es dabei unerlässlich die Untersuchung auf Leber und Fettgewebe auszuweiten. Um den organspezifischen Selenstatus und dessen Auswirkungen auf die Redoxhomöostase beurteilen zu können wurde die Expression diverser Selenoproteine und anderer antioxidativ wichtiger Gene bestimmt.

#### **4.3.1 Veränderung von systemischen Parametern durch Selensupplementation**

Nach 16 Wochen wurde die Supplementation beendet, die Tiere wurden gewogen, getötet und der Blut- und Organentnahme unterzogen. Die Gruppe mit erhöhter Se-Supplementation (Hoch-Se (0.5 mg/kg)) zeigte bei der Gewichtsbestimmung eine Zunahme im Körpergewicht, während beide Gruppen zu Beginn der Supplementation keine Gewichtunterschiede aufwiesen. Während die Adäquat-Se Gruppe (0.17 mg/kg) ein Endgewicht von  $136.0 \pm 15.3$  kg aufwies hatte die Hoch-Se Gruppe ein finales Gewicht von  $150.5 \pm 13.8$  kg erreicht ( $p = 0.053$ , Mittelwert + Standardabweichung). Aus den Plasmaproben wurden als metabolische Marker der Selengehalt, Insulin-, Glucose-, Triacylglycerid-, Cholesterinkonzentration und

die Aktivität der Alanin-Aminotransferase bestimmt. Diese Werte sind in Tabelle 4.1 aufgeführt. Die Hoch-Se Ernährung führte zu einem signifikanten Anstieg des Selenspiegels von 158.7 µg/L auf 199.3 µg/L Se. Weder in Nüchtern-glucose noch in Triacylglyceridwerten (TAG) und Cholesterinwerten unterschieden sich die beiden Gruppen eindeutig, allerdings zeigten sich bei TAG und Cholesterin Trends zu erhöhten Werten in der Hoch-Se Gruppe. Diesem Trend folgte auch die Aktivität der Alanin-Aminotransferase (ALT), die ein unabhängiges diagnostisches Kriterium für ein auftretendes metabolisches Syndrom ist (Hanley et al., 2004). Eine eindeutige Erhöhung zeigte sich beim Nüchtern-Insulinwert; hierbei erhöhte sich der Wert von 6.1 auf 8.8 pmol/L. Auch der HOMA-IR-Wert, der zur Diagnose einer Insulinresistenz herangezogen wird und in den multiplikativen Insulinwerten und Glucosewerten einfließt, wies eine Tendenz zu höheren Werten in der Hoch-Se Gruppe auf. Die Parameter aus Tabelle 4.1 zeigten also eine Tendenz zu erhöhten Nährstoffen im Blut. Folglich korrelierten die erhöhten Selenwerte der Hoch-Se Gruppe allgemein mit Trends zu höheren Plasmaparametern des Lipid- und Kohlehydratstoffwechsels. Diese metabolischen Veränderungen, auch wenn es sich um Tendenzen handelt, können zusammen mit der Hyperinsulinämie als mögliche Frühindikatoren für die Ausprägung eines Prädiabetes angesehen werden.

Tabelle 4.1

Parameter	Adäquat-Se Ernährung	Hoch-Se Ernährung	p-Wert
Selengehalt ( $\mu\text{g/L}$ )	$158.7 \pm 7.96$	$199.3 \pm 7.44$	0.003**
Nüchtern-Insulin ( $\text{pmol/L}$ )	$6.1 \pm 1.04$	$8.8 \pm 0.46$	0.041*
Nüchtern-Glucose ( $\text{mmol/L}$ )	$11.2 \pm 1.6$	$12.1 \pm 1.9$	0.784
HOMA-IR	$0.49 \pm 0.14$	$0.84 \pm 0.17$	0.140
Triacylglyceride ( $\text{mmol/L}$ )	$0.32 \pm 0.05$	$0.37 \pm 0.02$	0.380
Cholesterin ( $\text{mmol/L}$ )			
- total	$2.02 \pm 0.12$	$2.36 \pm 0.08$	0.077
- HDL	$0.87 \pm 0.06$	$1.04 \pm 0.04$	0.058
- LDL	$1.15 \pm 0.09$	$1.32 \pm 0.09$	0.275
ALT (U/L)	$39.1 \pm 1.4$	$42.5 \pm 3.2$	0.380

Tabelle 4.1: Metabolische Charakteristika von Schweinen, die 16 Wochen lang eine Adäquate Se Ernährung oder eine Hoch-Se Ernährung erhielten. Es wurden der Selengehalt, Nüchtern-Insulin, Nüchtern-Glucose, Triacylglyceride sowie Cholesterinwerte und Alanin-Aminotransferaseaktivität (ALT) aus Plasma bestimmt. Der HOMA-IR Wert (*homeostatic model assessment insulin resistance*) wurde für jedes Individuum noch folgender Formel bestimmt: Nüchtern-Plasma-Insulin ( $\mu\text{U/mL}$ )  $\times$  Nüchtern Plasma Glucose ( $\text{mmol/L}$ )/22.5 (Matthews et al., 1985). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Mit Ausnahme des Nüchtern-Insulins wurden alle Mittelwerte aus den Daten von je 6 Tieren pro Gruppe gebildet. Nüchtern Insulin und HOMA-IR wurden von je 5 Tieren pro Gruppe kalkuliert. Zwei Tiere (eins pro Gruppe) wurden vor der Berechnung der Insulinwerte ausgeschlossen, da sie eindeutig vor der Schlachtung gestresst waren, und deshalb angenommen wurde, dass ihre erhöhten Insulinwerte durch die Ausschüttung von Adrenalin beeinflusst waren. P-Werte wurden durch einen ANOVA-Test bestimmt, welcher als Kovarianz-Term eine lineare Anpassung an das finale Gewicht beinhaltete. Bis auf ALT wurden alle Plasma- bzw. Serumparameter an der Universität von Surrey von Mert Sanil im Rahmen seiner Masterarbeit bestimmt.

Als weiterer metabolischer Parameter wurde der Glycogengehalt von Skelettmuskel und Leber bestimmt. Weder in Skelettmuskel noch in Leber war die Änderung im Glycogengehalt signifikant. In Skelettmuskel gab es eine leichte Tendenz zu verringertem Glycogengehalt bei Hoch-Se Supplementation, während in Leber die Tendenz eher zu gesteigertem Glycogen zeigte (Abbildung 4.36). Das Fettgewebe enthält nur sehr geringe Mengen an Glycogen, eine Bestimmung des Glycogen aus Fettgewebe ergab sehr starke Hintergrundsignale und hohe Standardabweichungen.

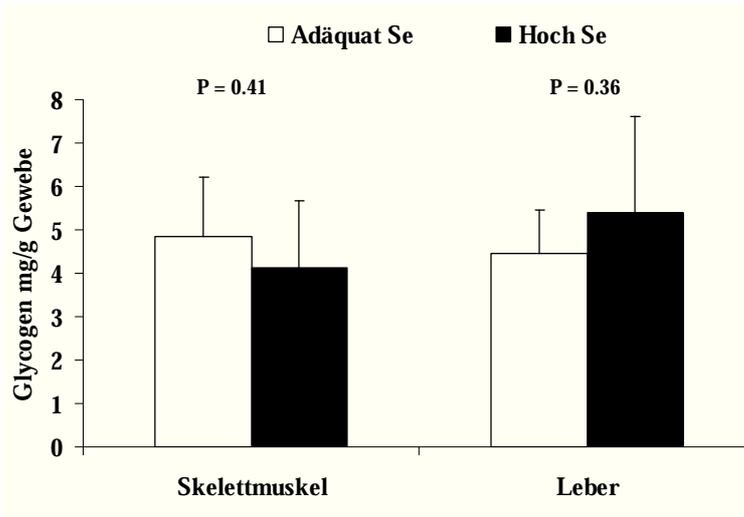


Abbildung 4.36: Bestimmung des Glycogengehalts in Skelettmuskel und Leber mit dem Biovision Oxiredprobe Assay.

#### 4.3.2 Regulation der Selenoproteine durch Selensupplementation

Um den Selenstatus in den Zielorganen von Insulin beurteilen und mögliche Ursachen für die metabolischen Veränderungen bestimmen zu können, wurde die Expression der Selenoproteine untersucht. Dazu wurde per Immunoblot die Proteinexpression der Glutathionperoxidase 1 und der Thioredoxinreduktase 1 (TrxR1) untersucht. Bei der GPx1 handelt es sich um ein Protein, dass in der Hierarchie der Selenoproteine am unteren Ende steht, was zur Folge hat, dass es in Abhängigkeit von verfügbarem Selen stimuliert oder reprimiert wird. Die Thioredoxinreduktase 1 ist hierarchisch wichtiger und daher in ihrer Expression weit weniger abhängig von verfügbarem Selen (Hesketh, 2008). Außerdem sind GPx1 und TrxR1 zwei Schlüsselenzyme der zellulären antioxidativen Abwehr, über die die wichtigen zellulären Redoxäquivalente Glutathion und Thioredoxin reguliert werden (Arnér, 2009; Steinbrenner und Sies, 2009).

In Abbildung 4.37 ist die Expression der GPx1 und TrxR1 in Leber, Skelettmuskel und viszeralem Fett dargestellt. Der verwendete GPx1-Antikörper detektierte in der Leber zwei Signale bei 22 und 20 kDa. Im Vergleich der drei Gewebe ist die Expression der GPx1 in der Leber mit Abstand am höchsten, eine wesentlich geringere Expression an GPx1 wurde im Fettgewebe detektiert. Unter diesen Bedingungen konnte im Skelettmuskel keine Expression der GPx1 detektiert werden. Die 56 kDa große Thioredoxinreduktase 1 wurde in allen drei Geweben detektiert. In Leber und Skelettmuskel konnte eine starke Expression der TrxR1 detektiert werden, wobei etwa gleich starke Niveaus in den beiden Organen vorhanden waren. Im Fettgewebe war die Expression der TrxR1 wesentlich geringer.

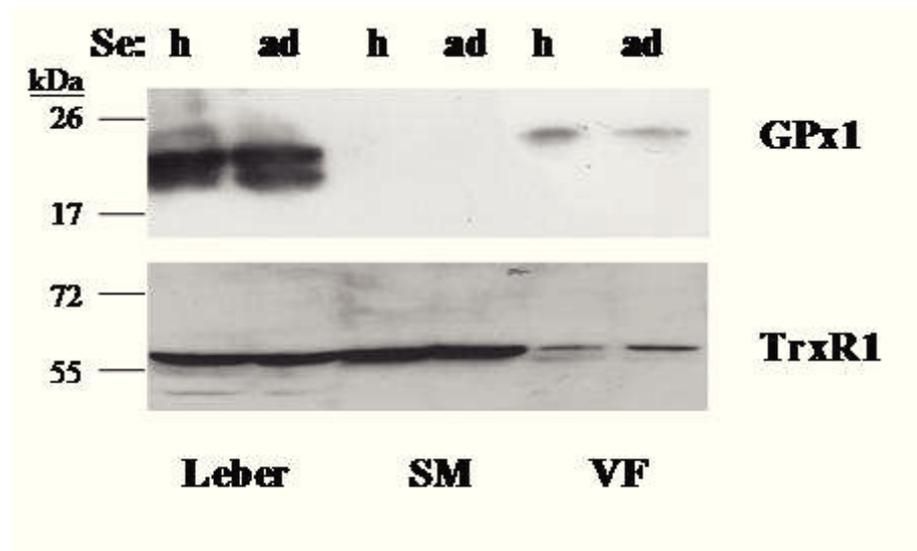


Abbildung 4.37: Proteinexpression der GPx1 und TrxR1 in Leber, Skelettmuskel (SM) und viszeralem Fettgewebe (VF). Es wurden jeweils 3 Lysate von Hoch-Se Schweinen und Adäquat-Se Schweinen zum Vergleich gegeneinander aufgetragen.

Da die Aktivität von Selenoenzymen nicht nur von ihrer Proteinexpression abhängt (Arnér, 2009; Wang et al., 2011), wurden auch die Aktivitäten der GPx und der TRxR bestimmt. Außerdem wurde die Proteinexpression der Selenoenzyme für jedes Gewebe spezifisch bestimmt. In Abbildung 4.38A sind die Aktivitäten und Proteinlevel der GPx1 gewebespezifisch dargestellt. Die Aktivität der GPx war in Leber mit ca. 750 mU/mg am höchsten. In viszeralem Fett betrug die Aktivität nur ca. 220 mU/mg Protein. Der Skelettmuskel zeigte die geringste GPx-Aktivität mit ca. 40 mU/mg. Die Ergebnisse der GPx-Aktivität stimmten mit der Proteinexpression in Abbildung 4.38 überein. Im Vergleich zur Adäquat-Se Ernährung führte die Hoch-Se Ernährung nur im Skelettmuskel zu einer signifikanten Steigerung der GPx-Aktivität, was darauf hindeutet, dass die Selensättigung im Skelettmuskel im Vergleich zu Leber und Fett erst bei höheren Selenkonzentrationen eintritt (Lei et al., 1998; Zhang et al., 2011). Zum Nachweis der GPx1 im Immunoblot war es nötig für jedes Gewebe die methodenspezifischen Parameter anzupassen. Dann ergaben sich im Immunoblot Proteinexpressionen, die der GPx-Aktivität im jeweiligen Gewebe qualitativ entsprachen. In Abbildung 4.38B ist die TrxR-Aktivität in den Geweben sowie die gewebespezifische Proteinexpression der TrxR1 aufgeführt. Auch waren die Western-Blot Ergebnisse aus Abbildung 4.38 konsistent mit den Aktivitäten der TRxR. Die TRxR-Aktivität in Leber war mit ca. 600 mU/mg deutlich höher als im Skelettmuskel (250 mU/mg), während die Proteinexpression ähnlich starke Signale zeigte. Die TrxR-Aktivität im Fett war mit ca. 70 mU/mg ähnlich gering wie die Proteinexpression. Sowohl die Aktivität als auch die Proteinexpression zeigten für keines der drei Gewebe einen Unterschied.

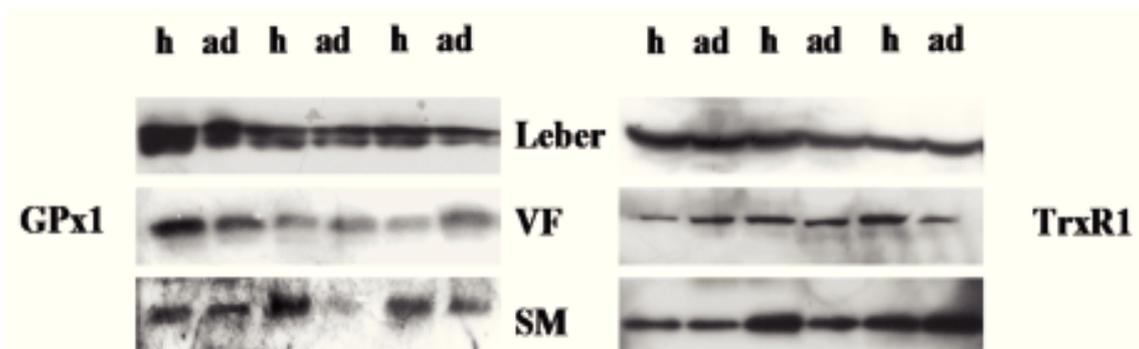
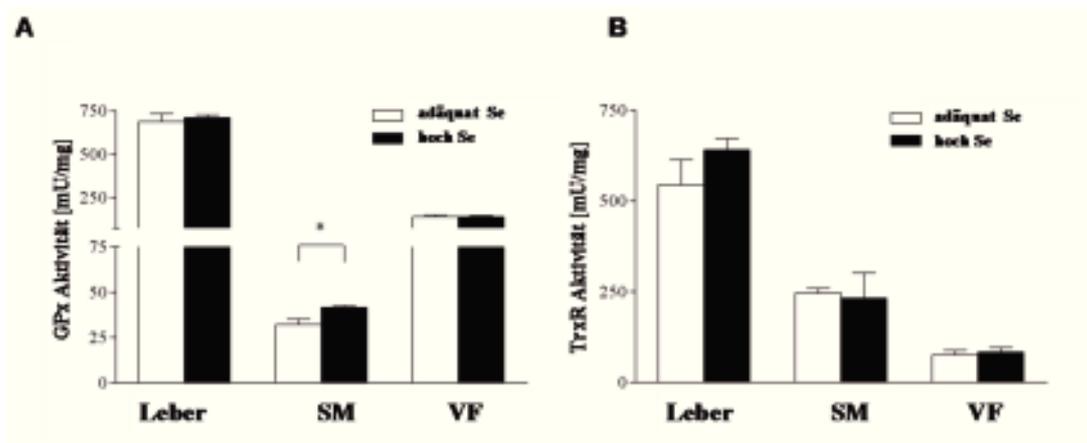


Abbildung 4.38: Aktivitäten der GPx (A) und TrxR (B) in Leber, Skelettmuskel und viszeralem Fettgewebe sowie gewebespezifischer Nachweis der GPx1 (A) und TrxR1 (B) in der Adäquat und Hoch-Se Gruppe. Exemplarisch sind nur die Expressionen bei 6 Tieren gezeigt.

Um ein kompletteres Bild der Selenoproteinexpression zu erhalten, wurde die Genexpression mehrerer Selenoproteine in den drei Geweben untersucht. Zusätzlich zur Expression von GPX1 und TRXND1 (TrxR1), wurde auch die Expression von Selenoprotein P (SEPP1), Selenoprotein W (SEPW1), Selenophosphat synthetase 2 (SEPHS2), Selenoprotein S (SELS), Selenoprotein K (SELK) und dem Selen-speicherprotein Selenium-Binding-Protein 1 (SELENBP1) in Leber, Skelettmuskel und Viszeralfettgewebe untersucht. Einige Selenoproteine wie z.B. SEPP1 und SEPW1 zeigen eine gewebespezifische Expression und wurden deshalb nur in den exprimierenden Geweben gemessen. Für die Berechnung der relativen Änderung der Genexpression wurden die Werte der Adäquat-Se Gruppe gleich eins gesetzt; die Änderungen in der Hoch-Se Gruppe wurden als Quotient angegeben (Tabelle 4.2). Es gab in den drei Geweben keine signifikanten Änderungen bei der Genexpression der Selenoproteine. In der Leber wurden die meisten Selenoproteine durch die veränderte Selenernährung gar nicht reguliert. Nur TRXND1 wurde in Übereinstimmung mit der Aktivität leicht erhöht. Zusätzlich wurde noch das SELENBP1 um 48% stärker exprimiert. Da SELENBP1 überschüssiges intrazelluläres Selen bindet (Huang et al., 2006), ergänzt diese

Beobachtung die Befunde zum erhöhten Selengehalt im Lebergewebe der Hoch-Se Gruppe (siehe Sanil, 2010).

**Tabelle 4.2**

Selenoprotein	Gensymbol	Leber	p- Wert	SM	p- Wert	VF	p- Wert
Glutathion-peroxidase 1	GPX1	0,99 ± 0,17	0,95	1,38 ± 0,19	0,25	1,09 ± 0,21	0,79
Thioredoxin- reduktase 1	TRXND1	1,22 ± 0,15	0,36	0,81 ± 0,12	0,20	0,87 ± 0,13	0,64
Selenoprotein P	SEPP1	0,86 ± 0,24	0,56			0,46 ± 0,29	0,05
Selenoprotein W	SEPW1			0,87 ± 0,08	0,25		
Selenophosphat- synthetase 2	SEPHS2	1,03 ± 0,17	0,86			1,07 ± 0,14	0,71
Selenoprotein S	SELS	1,05 ± 0,10	0,68	0,92 ± 0,07	0,38	1,01 ± 0,10	0,97
Selenoprotein K	SELK	1,05 ± 0,14	0,76	0,83 ± 0,03	0,15	0,82 ± 0,20	0,55
Selenium-Binding-Prot. 1	SELENBP1	1,48 ± 0,36	0,39			0,90 ± 0,19	0,72

**Tabelle 4.2. Relative Veränderung in der Genexpression der Selenoproteine in Leber, Skelettmuskel (SM) und Viszeralfettgewebe (VF) in Hoch-Se Schweinen relativ zu Adäquat-Se Schweinen. Stationäre mRNA Niveaus wurden per quantitativer real-time PCR bestimmt und auf  $\beta$ -Aktin (ACTB) normiert. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler für jede Gruppe angegeben.**

Im Skelettmuskel wurde das GPX1-Gen tendenziell um 38% erhöht, was ebenfalls die Befunde in Aktivität und Proteinexpression im Skelettmuskel unterstützt. Im Fettgewebe war die stärkste Regulation im SEPP1 zu beobachten, das Gen für den endogenen Selentransporter Selenoprotein P. Dieses wurde auf 46% der Expression in der Adäquat-Se Gruppe gesenkt. Die eher geringen Veränderungen bei der Expression der Selenoproteine deuten daraufhin, dass durch die adäquate Se-Ernährung bereits eine weitgehend ausreichende Versorgung mit Selen vorherrscht.

### 4.3.3 Einfluss der Selensupplementation auf den Phosphorylierungsstatus von Kinasen des Energiestoffwechsels im Skelettmuskel

Auch in den *Sus Scrofa*-Geweben wurden die Kinasen Akt, AMPK sowie die MAP-Kinasen Erk1/2 und P38 als zentrale Mediatoren des Energiestoffwechsels untersucht. (Bergeron et al.,

1999; Hardie, 2011; Cargnello und Roux, 2011). Diese Kinasen wurden zunächst auf ihre basale Phosphorylierung im Skelettmuskel untersucht (Abbildung 4.39A-C). Die basale Phosphorylierung der Akt zeigte keine Veränderung durch die Supplementation (Abbildung 4.39A). Eine Phosphorylierung der AMPK $\alpha$  an Threonin 172 konnte in diesem Gewebe nicht nachgewiesen werden, während in den anderen Geweben der Nachweis möglich war. Die AMPK $\alpha$  zeigte aber eine tendenziell ( $P = 0.10$ ) unterschiedliche Expression zwischen der Adäquat-Se und Hoch-Se Gruppe (Abbildung 4.39B). Die Phosphorylierung der Erk1/2 an Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup> wurde ebenfalls durch die erhöhte Selensupplementation beeinflusst. Diese führte tendenziell zu verringerter Phosphorylierung ( $P = 0.14$ ). Anders als die Erk1/2 wurde die Phosphorylierung der P38 an Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup> nicht durch die zusätzliche Supplementation beeinflusst.

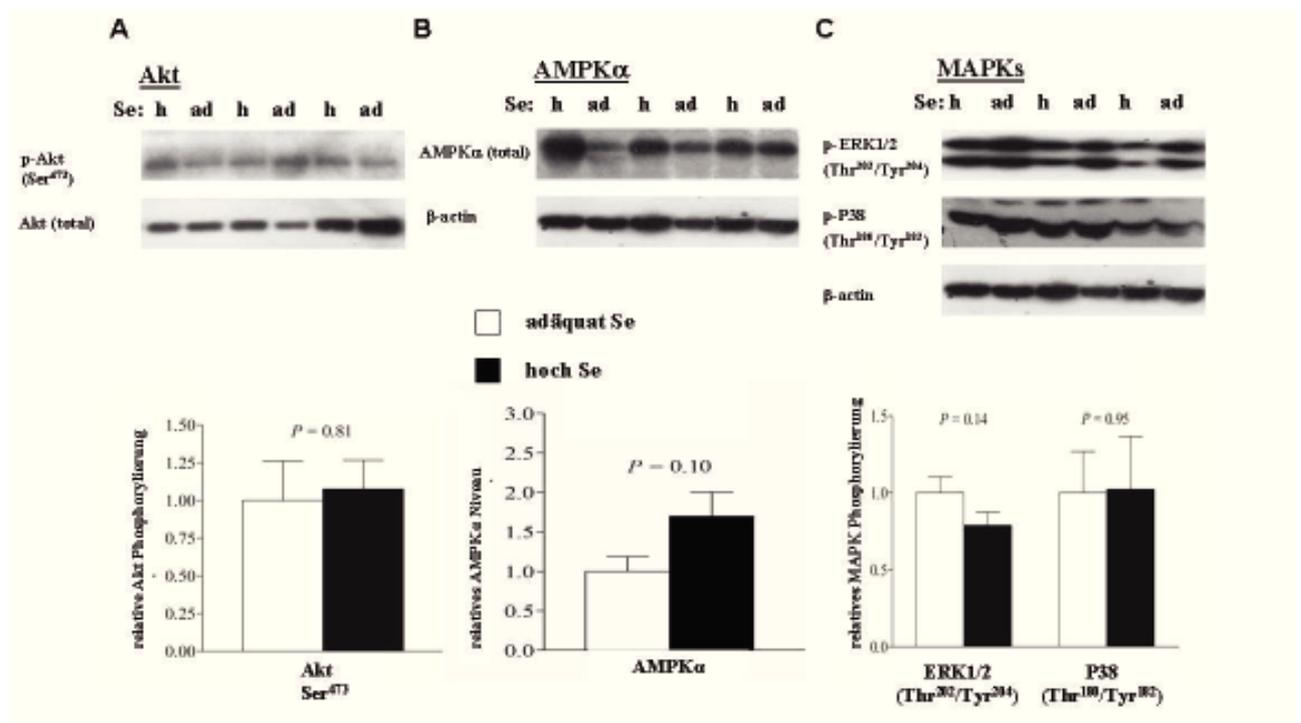


Abbildung 4.39: Phosphorylierung von Akt (A), Erk1/2 und P38 (C), sowie Expression der AMPK $\alpha$  (B) in Skelettmuskel. Die Phosphorylierung der Akt an Ser<sup>473</sup> wurde auf die totale Akt-Expression normiert. Die Expression der AMPK $\alpha$  sowie die Phosphorylierung der Erk1/2 und P38 wurde auf  $\beta$ -Aktin normiert. Exemplarisch sind jeweils 3 Tiere pro Gruppe dargestellt. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ. Die Signale von 6 Schweinen pro Gruppe wurden ausgewertet und die Daten als Mittelwerte + Standardfehler dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte durch einen t-Test.

#### 4.3.4 Einfluss der Selensupplementation auf den Phosphorylierungstatus von Kinasen des Energiestoffwechsels im Fettgewebe

Auch im Fettgewebe wurde die Phosphorylierung der Akt, AMPK $\alpha$  und der MAPK Erk1/2 und P38 untersucht (Abbildung 4.40). Die Akt-Phosphorylierung im Fettgewebe konnte an

Serin 473 und Threonin 308 nachgewiesen werden (Abbildung 4.41A), beide Phosphorylierungsstellen sind für eine volle Aktivität der Akt notwendig. Beide Phosphorylierungen zeigten eine ähnliche Tendenz. In den Hoch-Se Tieren zeigte sich eine verstärkte Aktivierung der Akt mit  $p = 0.27$  für Serin 473 und  $p = 0.43$  für Threonin 308. Die AMPK $\alpha$  war in der Adäquat-Se Gruppe im Trend stärker an Thr172 phosphoryliert ( $p = 0.18$ , Abbildung 4.41B). Die Phosphorylierung der MAP-Kinasen Erk1/2 und P38 wurden prinzipiell in die gleiche Richtung reguliert und zeigte eine Tendenz zu verstärkter Phosphorylierung bei Hoch-Se Ernährung ( $p = 0.54$  Erk1/2,  $p = 0.15$  P38, Abbildung 4.41C). Anders als im Skelettmuskel zeigen somit die Phosphorylierungen der Akt und der MAP-Kinasen einen Trend zu verstärkter Aktivierung in der Hoch-Se Gruppe. Diese Effekte sind in guter Übereinstimmung mit den erhöhten Insulinwerten der Hoch-Se Tiere, und könnten darauf zurückzuführen sein, dass das viszerale Fettgewebe sensibler auf die Stimulation mit Insulin reagiert als der Skelettmuskel, was bei ähnlichen metabolischen Parametern auch in der Literatur beobachtet wurde (Hom und Goodner, 1984; Kraegen et al., 1986).

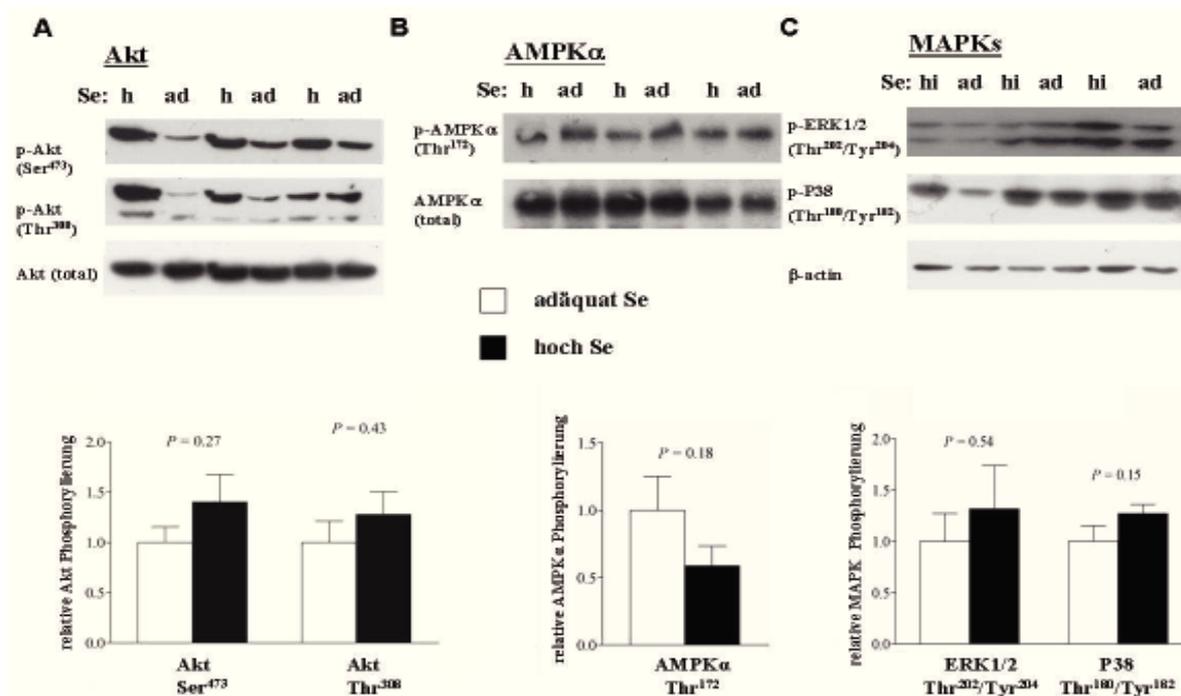


Abbildung 4.40: Phosphorylierung von Akt (A), AMPK $\alpha$  (B), Erk1/2 und P38 (C), in viszeralem Fettgewebe. Die Phosphorylierung der Akt an Ser<sup>473</sup> wurde auf die totale Akt-Expression normiert. Die Phosphorylierung der AMPK $\alpha$  wurde auf die totale AMPK $\alpha$  Expression normiert. Erk1/2 und P38 wurde auf  $\beta$ -Aktin normiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ. Die Signale von 6 Schweinen pro Gruppe wurden ausgewertet und die Daten als Mittelwerte + Standardfehler dargestellt. Die Statistische Analyse erfolgte durch einen t-Test

### 4.3.5 Einfluss der Selensupplementation auf den Phosphorylierungsstatus von Kinasen des Energiestoffwechsels in der Leber

Die schon zuvor in Skelettmuskel und Fettgewebe untersuchten Kinasen Akt, AMPK $\alpha$ , Erk1/2 und P38 wurden ebenfalls in der Leber auf ihren Phosphorylierungsgrad untersucht. Die Phosphorylierung von Akt (A), AMPK $\alpha$  (B) und der MAP-Kinasen (C) ist in Abbildung 4.41 dargestellt. Die Phosphorylierung der Akt zeigte zwischen den beiden Gruppen keine Unterschiede. Auch die AMPK $\alpha$  zeigte keine gruppenspezifische Tendenz zu einer geänderten Phosphorylierung an Thr172. Allerdings konnten beide AMPK $\alpha$ -Isoformen in Leber detektiert werden, während in Skelettmuskel und Fettgewebe eine Isoform deutlich überwog. Auch die MAP-Kinasen Erk1/2 und P38 wurden durch die erhöhte Selensupplementation nicht beeinflusst. In Leber wurden folglich die Kinasen am wenigsten beeinflusst. Das legt die Annahme nahe, dass der Selengehalt in der Leber, obwohl er durch die Hoch-Se Ernährung gestiegen ist (siehe Sanil, 2010), noch im metabolisch tolerablen Bereich liegt (Raines et al, 2011).

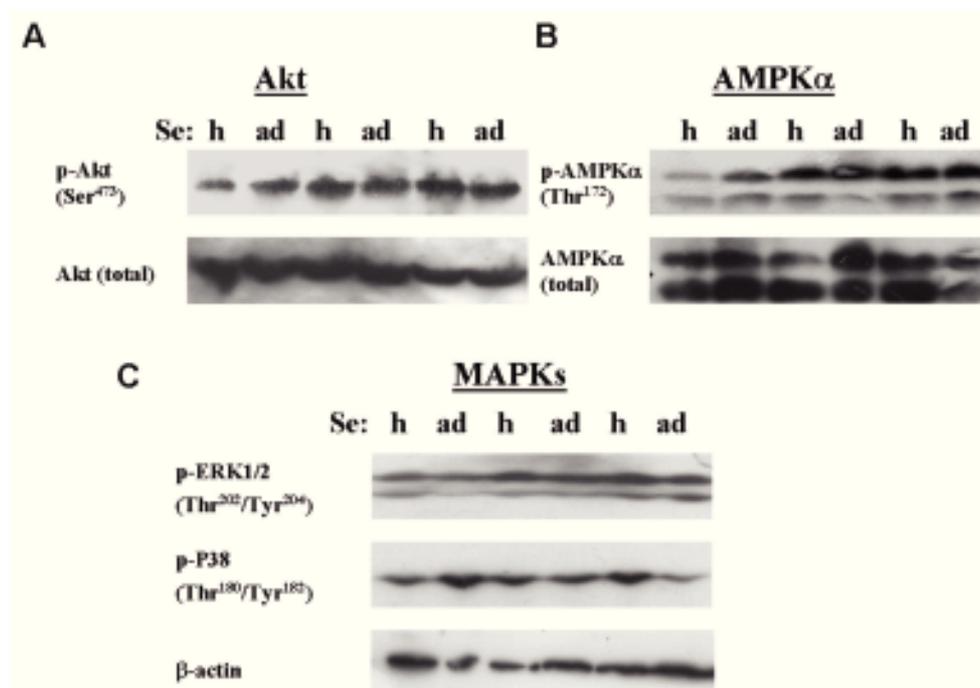


Abbildung 4.41: Phosphorylierung von Akt (A), AMPK $\alpha$  (B), Erk1/2 und P38 (C), in Leber. Als Ladungskontrollen wurden total Akt, AMPK $\alpha$ , und  $\beta$ -Aktin nachgewiesen.

### 4.3.6 Beeinflussung der Genexpression von Transkriptionsfaktoren und Enzymen des Energiestoffwechsels durch Selensupplementation.

Neben den metabolischen Parametern und dem Phosphorylierungsstatus verschiedener Kinasen wurde die Transkription von Genen des Lipidstoffwechsels, Kohlenhydratstoffwechsels und antioxidativer Enzyme untersucht. Ebenso wie die Phosphorylierung der Kinasen war die Genexpression organspezifisch durch die Selensupplementation der Tiere beeinflusst. Die Änderungen sind in Tabelle 4.3 dargestellt. In der Leber zeigte keines der untersuchten Gene eine Änderung der Transkription. Im Skelettmuskel zeigten sich signifikante Änderungen in der Hoch-Se Gruppe bei der Pyruvatkinase Muskel 2 (PKM2), FOXO1 und PGC-1 $\alpha$  (PPARGC1). PKM2 ist eine für Muskel und Tumore spezifische Isoform der in der Glycolyse aktiven Pyruvatkinase (Bayley und Devilee, 2011). Auch der Anstieg von FOXO1 bedeutet eine verringerte Glycolyse (Gross et al., 2008; Cheng und White, 2011). Die Pyruvatdehydrogenasekinase 4 zeigte eine tendenziell verminderte Expression (PDK4,  $p=0.21$ ). Sie reguliert, in Abhängigkeit von FoxO1a, negativ den Pyruvatdehydrogenasekomplex, der für die Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA verantwortlich ist (Connaughton et al., 2010). Die verstärkte Expression von PGC-1 $\alpha$  (PPARGC1) bedeutet ebenfalls eine Veränderung im Stoffwechsel des Skelettmuskels. Einerseits wird die Glucoseaufnahme verstärkt, gleichzeitig wird aber auch die Fettsäureaufnahme und -oxidation, sowie die Insulinsensitivität erhöht (Benton et al., 2008; Benton et al., 2010). Weitere tendenziell erhöhte Regulatoren des Stoffwechsels sind die Lipoprotein Lipase (LPL) (Lopez et al., 2009) und der Transkriptionsfaktors p53 (TP53; Goldstein et al. 2011).

Im viszeralen Fettgewebe wurde nur SREBF1 durch die Hoch-Se Supplementation signifikant reguliert. Die 1,6 fache Verstärkung des Gens des SREBP1c in der Hoch-Se Gruppe deutet im Viszeralfettgewebe auf einen geänderten Lipidmetabolismus hin (Eberle et al., 2004).

**Tabelle 4.3**

Gensymbol	<b>Leber</b>	p-Wert	<b>SM</b>	p-Wert	<b>VF</b>	p-Wert
INSR	0,79 $\pm$ 0,42	0,68	1,20 $\pm$ 0,44	0,71	0,53 $\pm$ 0,22	0,08
IRS1	1,09 $\pm$ 0,16	0,67	0,46 $\pm$ 0,27	0,11	0,94 $\pm$ 0,30	0,92
SLC2A4			0,92 $\pm$ 0,03	0,16	1,19 $\pm$ 0,12	0,58
PTPN1	1,06 $\pm$ 0,37	0,92	0,53 $\pm$ 0,14	0,17	0,97 $\pm$ 0,23	0,93
PDK4	1,00 $\pm$ 0,01	0,97	0,37 $\pm$ 0,42	0,21	0,70 $\pm$ 0,41	0,48

Gensymbol	Leber	p-Wert	SM	p-Wert	VF	p-Wert
GAPDH	0,98 ± 0,18	0,92	0,80 ± 0,10	0,10	1,34 ± 0,18	0,29
PKM2			0,61 ± 0,11	0,04*	1,16 ± 0,22	0,66
PCK1	1,03 ± 0,17	0,86				
G6PC	1,05 ± 0,10	0,68				
LPL			1,39 ± 0,13	0,10	1,90 ± 0,30	0,17
PNPLA2					1,16 ± 0,31	0,76
LIPE					0,86 ± 0,24	0,74
FASN	0,78 ± 0,23	0,57				
TP53	0,84 ± 0,14	0,54	1,70 ± 0,53	0,26	2,26 ± 1,31	0,37
CPT1A/B	1,63 ± 0,55	0,54	1,11 ± 0,62	0,88	0,54 ± 0,35	0,212
DGAT	0,98 ± 0,16	0,91	1,16 ± 0,12	0,35	1,27 ± 0,20	0,47
HMGR	1,04 ± 0,27	0,92	1,00 ± 0,20	0,99	0,86 ± 0,30	0,87
FOXO1	0,87 ± 0,14	0,47	1,36 ± 0,05	0,001**	0,97 ± 0,21	0,91
PPARGC-1	1,05 ± 0,10	0,74	1,89 ± 0,20	0,04*	0,55 ± 0,18	0,27
HNF4A	1,10 ± 0,11	0,52			0,71 ± 0,25	0,27
MLXIPL	0,91 ± 0,14	0,70	0,55 ± 0,18	0,31	1,21 ± 0,15	0,39
SREBF1	1,26 ± 0,52	0,77	0,75 ± 0,10	0,27	1,60 ± 0,10	0,04*
SREBF2	0,97 ± 0,16	0,87	0,93 ± 0,12	0,63	0,93 ± 0,35	0,87

Tabelle 4.3: Genexpression von Enzymen und Transkriptionsfaktoren des Energiestoffwechsels in Leber, Skelettmuskel (SM) und viszeralem Fettgewebe (VF) von Hoch-Se Schweinen im Vergleich zu Adäquat-Se Schweinen. Die codierten Proteine sind durch die Gensymbole abgekürzt: Glucosetransporter 4 (SLC2A4), Proteintyrosinphosphatase *Non-receptor typ 1* (PTPN1), Pyruvatedehydrogenasekinase 4 (PDK4), Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH), Pyruvatkinase Muskeltyp 2 (PKM2), Phosphoenolpyruvatcarboxykinase 1 (PCK1), Glucose-6-phosphatase (G6PC), Forkheadbox O1 (FOXO1), Peroxisomal Proliferator-activated Receptor- $\gamma$  Coactivator 1 $\alpha$  (PPARGC-1), hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF4A) und carbohydrate responsive element binding protein (MLXPL). Transkripte wurden per real-time RT-PCR bestimmt, sowie auf die Expression von  $\beta$ -Aktin (ACTB) normiert. Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von 6 Tieren pro Gruppe dargestellt. Signifikante Änderungen sind durch ein ( $p > 0,05$ ) oder zwei Sternchen ( $p > 0,01$ ) gekennzeichnet.

#### 4.3.7 Quantifizierung der Genexpression antioxidativer Enzyme und Proteine

Um die Beeinflussung des antioxidativen Status der Gewebe durch die Hoch-Se Supplementation beurteilen zu können, wurden in allen drei Geweben die Genexpression

wichtiger antioxidativer Enzyme und durch oxidativen Stress induzierbarer Faktoren untersucht (Pinto et al., 2011; Saito et al., 2003; Shilo et al., 2005). Weder in Leber, noch im Skelettmuskel und Fettgewebe gab es durch Hoch-Se induzierte signifikante Unterschiede in der Genexpression. Es kann also geschlussfolgert werden, dass die Genexpression der antioxidativen Enzyme durch die erhöhte Selenzufuhr nicht beeinflusst wurde.

**Tabelle 4.4**

Protein	Gen-symbol	Leber		SM		VF	
		Mittelwert	p-Wert	Mittelwert	p-Wert	Mittelwert	p-Wert
Superoxid-dismutase 1	SOD1	1.04 ± 0.17	0.84	0.88 ± 0.04	0.24	0.94 ± 0.16	0.84
Superoxid-dismutase 2	SOD2	1.00 ± 0.08	0.98	0.84 ± 0.13	0.30	0.76 ± 0.29	0.45
Hämoxygenase 1	HMOX1	1.21 ± 0.14	0.35	0.79 ± 0.11	0.18	0.69 ± 0.41	0.78
Katalase	CAT1	1.26 ± 0.34	0.59	0.87 ± 0.18	0.55	1.15 ± 0.40	0.90
Glutathion-reduktase	GR	0.96 ± 0.17	0.90	0.91 ± 0.19	0.70	1.48 ± 0.41	0.75
Uncoupling Protein 2	UCP2	0.82 ± 0.24	0.61	1.00 ± 0.15	0.97	0.64 ± 0.25	0.31
Uncoupling Protein 3	UCP3	1.25 ± 0.61	0.78	0.62 ± 0.40	0.37	0.64 ± 0.41	0.90

Tabelle 4.4. Genexpression von Proteinen der Redoxhomöostase in Leber, Skelettmuskel (SM) und viszeralem Fettgewebe (VF) von Hoch-Se Schweinen im Vergleich zu Adäquat-Se Schweinen. Transkripte wurden per real-time RT-PCR bestimmt und auf die Expression von  $\beta$ -aktin (ACTB) normiert. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von 6 Tieren pro Gruppe dargestellt.

#### 4.3.8 Quantifizierung der Genexpression von Zytokinen des viszeralem Fettgewebe

Das Fettgewebe wird auch als endokrines Drüsengewebe angesehen, da es in der Lage ist Zytokine zu sezernieren. Diese Adipokine können u.a die Insulinsensitivität beeinflussen und zur Ausprägung von Typ 2 Diabetes beitragen (Antuna-Puente et al., 2008). Die vom Fettgewebe sezernierten Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ , Leptin, Interleukin 6 und

Adiponektin wurden auf ihre Genexpression untersucht, um einen etwaigen Einfluss dieser Zytokine auf die Insulinsignaltransduktion in Skelettmuskel und Leber bestimmen zu können (Gonzalez und Claria, 2010). Die erhöhte Se-Aufnahme hatte auf die Transkription der 4 Zytokine jedoch keinen Einfluss.

**Tabelle 4.5**

Protein	Gensymbol	Genexpression	p-Wert
Tumor Necrosis Faktor $\alpha$	TNF	0,94 $\pm$ 0,16	0,84
Interleukin 6	IL6	0,76 $\pm$ 0,29	0,45
Leptin	LEP	0,69 $\pm$ 0,41	0,78
Adiponektin	ADIPOQ	1,15 $\pm$ 0,40	0,90

**Tabelle 4.5: Genexpression von Zytokinen des viszeralen Fettgewebe von Hoch-Se Schweinen im Vergleich zu Adäquat-Se Schweinen. Transkripte wurden per real-time RT-PCR bestimmt, sowie auf die Expression von  $\beta$ -Aktin (ACTB) normiert. Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von 6 Tieren pro Gruppe dargestellt. Signifikante Änderungen sind fettgedruckt.**

## 5 Diskussion

Selen hat in den letzten Dekaden viel Aufmerksamkeit erhalten, weil es sich dabei um ein essentielles Spurenelement handelt, das unerlässlich für die Funktion und Expression der Selenoproteine ist. Andererseits hat Selen eine geringe therapeutische Breite, so dass bei einer Übersupplementation eine Selenintoxikation bedacht werden muss, die in Einzelfällen auch zum Tod von Menschen führen kann (Nuttall, 2006). Um die helle von der dunklen Seite des „Mondes“<sup>1</sup> zu trennen, gilt für Selen ein Richtwert für die maximale Aufnahme von 400 µg/Tag (Institute of Medicine, Food and Nutrition Board 2000, RKI-Kommission 2006). Die empfohlene Tagesdosis an Selen beträgt 55-75 µg pro Tag (Stranges et al., 2010c). Bisher wurde eine Supplementation mit Selenverbindungen und anderen Mikronährstoffen als gesundheitsförderliches antioxidatives „Fine-Tuning“ des Metabolismus angesehen (Sies et al., 2005). Besonders in Westeuropa, Deutschland eingeschlossen, wo mit einer täglichen Selenaufnahme von 30-50 µg pro Tag eine leichte Selenunterversorgung herrscht, wird eine Supplementation propagiert (Rayman, 2008; Fairweather-Tait et al., 2011).

Inzwischen wurde durch mehrere epidemiologische Studien bekannt, dass eine leichte, aber chronische Übersupplementation mit Selen mit negativen Effekten auf den Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel korrelierte (Vinceti et al., 2009). Außerdem wurde gezeigt, dass Antioxidantien die adaptiven metabolischen durch ROS ausgelösten Antworten auf genregulatorischer Ebene verhindern können (Ristow et al., 2009). In diesem Zusammenhang ist es besonders wichtig, molekulare Mechanismen, die in Abhängigkeit von den eingesetzten Selenverbindungen und Konzentrationen ausgelöst werden, zu untersuchen und zu verstehen. Der Einfluss von Selen oder Selenoproteinen auf die Insulinwirkung wurde bisher hauptsächlich in hohen supraphysiologischen Konzentrationen oder transgenen Tiermodellen untersucht, wobei sich anti- und prodiabetische Effekte zeigten, abhängig von Tiermodell oder betroffenen Selenoprotein (zusammengefasst in Mueller et al., 2009b). Die Auswirkungen einer Supplementation mit physiologischen Selenmengen auf die Insulinsignaltransduktion sind größtenteils unklar. Der Skelettmuskel, als Insulinzielgewebe sowie als größter Glucoseverbraucher und Selenspeicher, stellt dabei ein geeignetes Modell dar, um den Einfluss von Selenverbindungen und Selenoproteinen auf den Insulin-regulierten Glucosestoffwechsel zu untersuchen.

---

<sup>1</sup>Selene = die Mondgöttin der Antike

## **5.1 Natriumselenit und methylseleninige Säure beeinträchtigen die Insulinsensitivität von Skelettmuskelzellen in L6-Zellen**

### **5.1.1 Toxizität der Selenverbindungen**

Anorganische und organische Selenverbindungen sind Donoren zur Selensupplementation. Vor allem Selenit und MSeA werden auch wegen ihrer anticarcinogenen Wirkung geschätzt. Als Nahrungsergänzungsmittel sind von den hier verwendeten niedermolekularen Selenverbindungen Selenit, Selenat und L-Selenomethionin zugelassen. Während Selenomethionin der größte natürliche Selenbestandteil von pflanzlichen und tierischen Produkten ist, werden Selenit und Selenat wegen ihrer besseren Handhabung bevorzugt in Vitaminpräparationen und Nahrungszusätzen eingesetzt (Schrauzer, 2001).

Die akute Toxizität dieser drei Selenverbindungen gemessen an LD<sub>50</sub>-Werten bei Ratten bewegt sich in einem ähnlichen Dosisbereich. Dabei ist die Toxizität von Selenat am stärksten (LD<sub>50</sub> = 1,6-3,5 mg/kg), während SeMet (LD<sub>50</sub> = 4,25 mg/kg) und Selenit (LD<sub>50</sub> = 3-7 mg/kg) besser verträglich sind (Abdo, 1994; Schrauzer, 2000; Mueller und Pallauf, 2006). Die Verträglichkeit gegenüber einer langfristigen Exposition sowie die Bioverfügbarkeit ist bei SeMet besser als bei den anorganischen Verbindungen (Rayman et al., 2008; Schrauzer, 2000).

In Zellkulturmodellen können die Toxizitäten von den *in vivo* Werten abweichen und müssen für jede Zelllinie bestimmt werden. Die L6-Zelllinie ist ein akzeptiertes und verbreitetes Modell für physiologische Untersuchungen zu den Auswirkungen von Nährstoffen auf den insulinabhängigen Glucose- und Lipidstoffwechsel (Ewart et al., 1998; Hajduch et al 1998).

In L6 Skelettmuskelzellen waren Selenit und MSeA deutlich toxischer als Selenat und SeMet. Durch die Differenzierung wurde die Toxizität moduliert, so dass das zuvor auf den Myoblasten weniger toxische MSeA zu einer stärkeren Abnahme der Zellzahl bei differenzierten Myotuben führte. Ähnliche Toxizitätswerte wurden für die getesteten Selenverbindungen auch in anderen Zellsystemen bestimmt (Weiller et al., 2004; Valdiglesias et al., 2009). Es kann also nicht davon ausgegangen werden, dass der Skelettmuskel besonders empfindlich gegenüber Selenverbindungen ist. Die erhöhte Toxizität des MSeA in Myotuben kann mit der Abnahme des Glutathions während der Skelettmuskeldifferenzierung zusammenhängen, da es toxische Metabolite wie Methylselenol entgiften kann (Catani et al., 2004; Suzuki et al., 2008).

### 5.1.2 Einfluss der Selenverbindungen auf die Signaltransduktion, Glucoseaufnahme und reaktive Sauerstoffspezies

In der Signaltransduktion zeigten sich Unterschiede bei der Differenzierung der Muskelzellen. Proliferierende Myoblasten zeigten eine stärkere basale Aktivierung der Akt als Myotuben. Selenat konnte auf keiner Ebene die Signaltransduktion beeinflussen, auch die Glucoseaufnahme wurde nicht beeinflusst. In der Literatur wurden für Selenat *in vivo* und *in vitro* insulinmimetische Effekte beschrieben (Ezaki, 1990; Fürnsinn et al., 1996; Mueller et al., 2009b). Allerdings wurden in dieser Arbeit niedrigere Konzentrationen als in den früheren Studien benutzt, da solche Selenkonzentrationen unphysiologisch sind. *In vivo* kann Selenat metabolisch reduziert werden und in reaktive Se(+IV)-Metabolite überführt werden, die für die metabolischen Effekte verantwortlich sein könnten (Mueller und Pallauf, 2006).

SeMet konnte die basale Phosphorylierung der Akt in Myoblasten vermindern. Es konnte die Aktivierung der Akt durch Insulin in Myotuben aber nicht inhibieren, auch die Glucoseaufnahme wurde nur in der sehr hohen Konzentration 100  $\mu\text{M}$  beeinflusst. Diese wurde allerdings sowohl basal als auch unter Insulinstimulation induziert und könnte durch oxidativen Stress erzeugt worden sein, da SeMet 100  $\mu\text{M}$  antiproliferativ wirkte. Außerdem ist bekannt, dass unter oxidativem Stress die Glucoseaufnahme sowie Expression von GLUT1 erhöht wird (Bloch-Damti und Bashan, 2005). Selenit und MSeA führten in niedrigen Konzentrationen zu einer Abnahme der Akt-Aktivierung in Myoblasten, dieser Effekt kehrte sich bei Konzentrationen ab 10  $\mu\text{M}$  in eine verstärkte Aktivierung um. Diese Umkehrung könnte durch die bei 10  $\mu\text{M}$  beginnende Toxizität der beiden Selenverbindungen ausgelöst worden sein, da Akt bei oxidativem Stress antiapoptotische Rettungssignalwege auslöst (Franke et al., 2003).

In bis zu 1  $\mu\text{M}$  Konzentrationen konnten Selenit und MSeA in Myotuben ebenfalls die Aktivierung der Akt durch Insulin verzögern, aber nicht vollständig verhindern. Die Verzögerung fand im Zeitraum bis 30 min Insulinstimulation statt. Nach 45 Minuten waren keine Unterschiede in der Aktivierung der Akt zu erkennen. Eine inhibitorische Wirkung von Selenit auf die Akt wurde bei Prostatakrebszellen (Bergren et al., 2009) und bei Darmkrebszellen auch unter Insulinstimulation beobachtet (Luo et al., 2012). Für MSeA konnte ebenfalls eine inhibitorische Wirkung auf die Akt in Prostatakrebszellen beobachtet werden (Jiang et al. 2002). Ein gemeinsamer Mechanismus für die beiden Selenverbindungen könnte abhängig von ihrer Oxidationstufe (für beide +IV) sein, die auch für *in vivo*-reaktive Selenverbindungen postuliert wird (Mueller et al., 2008). Die intrazelluläre Oxidation von Thiolverbindungen durch die Reduktion von Se (+IV) zu Se (+II) (z.B. an reaktiven Cysteinen

von Phosphatasen) könnte daran beteiligt sein, obwohl die Oxidation der reaktiven Cysteinreste der PTEN durch die Selenverbindungen in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte. Das könnte aber sowohl an der mangelnden Sensitivität der hier benutzten Methode als auch an der Myocyten-Zelllinie liegen. In Studien, in denen ein Nachweis durch einen elektrophoretischen Mobilitätshift in Folge einer Cystein-Oxidation gelang, wurden artifizielle Systeme eingesetzt, die durch Überexpression oder *Knockout* besonders sensitiviert wurden (Kwon et al., 2004; Loh et al., 2009). In anderen Arbeiten wurde die PTP1B, die den Insulinrezeptor nach Aktivierung dephosphoryliert, durch Se(+IV)-Verbindungen verstärkt glutathionyliert, wodurch sie inaktiviert wurde (Mueller et al., 2008). Die Depletion von Glutathion führte zu einer Aufhebung der Selenit-abhängigen Verzögerung der Akt-Phosphorylierung, was einen thiolabhängigen Mechanismus unterstützt, da Glutathion am Schutz und an der Regeneration aktiver Thiole beteiligt ist (Filomeni et al., 2002).

Die Phosphorylierung der FoxO-Transkriptionsfaktoren mediiert die Inhibition vieler transkriptioneller Effekte der Akt. Die verminderte Phosphorylierung von FoxO1a/3 durch 1  $\mu\text{M}$  Selenit setzt die Inhibition der Akt durch Selenit fort. Da FoxO1a und FoxO3 Transkriptionsfaktoren sind, die u.a. an der Muskeldifferenzierung und der transkriptionellen Regulation der Insulinsignaltransduktion beteiligt sind (Hribal et al., 2003; Puig und Tjian, 2005), ist eine Beeinflussung der Transkription durch Selenit möglich. Die Inhibition durch MSeA erreicht allerdings keine Signifikanz, deshalb wird eine Interferenz mit anderen Signalwegen für möglich gehalten. Eine Phosphorylierung am selben Motiv der FoxOs durch Kinasen eines anderen Signalwegs, wie die Serum-Glucocorticoid-Kinase, sind bekannt (Cheng und White, 2011). Die Translokation des transient transfizierten EGFP-FoxO1a schien nicht von der Akt abhängig zu sein und war schon in unbehandelten Kontrollen hoch. Selenit konnte diese weiter verstärken. Hier spielt die erzwungene Translokation von FoxO-Proteinen in Myoblasten durch die JNK- und MAP-Kinase-Signalwege möglicherweise eine Rolle, wobei ein Zusammenhang zwischen der P38, die hier in den L6 verstärkt durch Selenit aktiviert wurde, und der Translokation von FoxO-Proteinen im Skelettmuskel bekannt ist (Hribal et al., 2003; Clavel et al., 2010). In Korrelation mit der verringerten Akt-Aktivierung konnte MSeA ebenfalls die Glucoseaufnahme inhibieren. Selenit zeigte bei 1  $\mu\text{M}$  keinen Effekt auf die Glucoseaufnahme, während 5  $\mu\text{M}$  Selenit die Glucoseaufnahme unabhängig von Insulin stark reduzierte. Allerdings zeigte sich bei 5  $\mu\text{M}$  Selenit-Inkubation auch eine Stimulation des GLUT4-Promotors, was eine kompensatorische Antwort auf die verringerte Glucoseaufnahme sein könnte. In der Literatur ist bekannt, das Wolframat ebenfalls einen stimulatorischen Effekt auf den GLUT4-Promotor zeigte (Girón et al., 2006). Generell

scheinen Übergangsmetalle wie Chrom, Vanadium, Nickel oder Zink bzw. ihre anorganischen Salze die Insulinsignaltransduktion zu beeinflussen (Dong et al., 2009; Eckers und Klotz, 2009; Pereira et al., 2009). Konzentrationen von Übergangsmetallen im Bereich ab 100  $\mu\text{M}$  führen meistens zu einer Aktivierung des Insulinsignalwegs, eine gesteigerte ROS-Produktion durch die Übergangsmetalle wird als Ursache angenommen.

Die Inhibition der Insulin-induzierten Phosphorylierung der Akt und der FoxO-Proteine könnte auch durch reaktive Sauerstoffspezies hervorgerufen worden sein. Selenit konnte die ROS am stärksten senken, während 1  $\mu\text{M}$  MSeA das ROS-Signal im geringeren Umfang senken konnte. Zumindest teilweise könnte diese Senkung auf die durch Selenit und MSeA gesteigerte GPx-Aktivität zurückzuführen sein. Eine gesteigerte GPx-Aktivität verringert die intrazelluläre Konzentration an  $\text{H}_2\text{O}_2$ , das als *Second Messenger* in der Insulinsignalkaskade angesehen wird (Mahadev et al., 2004). Eine Verringerung der reaktiven Sauerstoffspezies durch Selenit und MSeA wurde auch in anderen Zellkultursystemen nachgewiesen (Saito et al., 2003; Park et al., 2007). Weiterhin wurde auch eine differenzielle Regulation der ROS durch Selenit und MSeA gezeigt (Li et al., 2007). SeMet und Selenat führten erst ab 10  $\mu\text{M}$  eine Verringerung der intrazellulären ROS in den L6. Der in Folge von Insulinstimulation detektierte Anstieg der ROS fiel allerdings gering aus. Da aber reaktive Sauerstoffspezies in der Physiologie des Muskels eine große Rolle spielen und auch insulinunabhängig in hohem Maße vertreten sind (Powers et al., 2011), könnte der durch Insulin induzierte Anstieg der ROS geringer als in Adipozyten ausfallen, in denen eine Beteiligung von ROS an der Insulinsignaltransduktion beobachtet wurde (Krieger-Brauer und Kather, 1995; Mahadev et al., 2001a). Während alle Selenverbindungen zu einer Abnahme der durch DCF detektierten ROS führten, wurde im Gegensatz dazu mit DHE, einem superoxidspezifischen intrazellulären Fluoreszenzmarker, nur für Selenit ein signifikanter und konzentrationsabhängiger Anstieg der Superoxidkonzentration festgestellt. Die Spezifität der beiden Farbstoffe muss aber generell hinterfragt werden, weil inzwischen viele Publikationen erschienen sind, die Nebenreaktionen und Nebenprodukte der beiden Farbstoffe beobachtet haben, die mit den üblichen Nachweismethoden interferieren (Chen et al., 2010; Keller et al., 2004; Zielonka et al., 2010). Die Superoxidgeneration von Selenit und Selenid ist von der Oxidation des GSH abhängig, während DCF vor allem reduziertes GSH misst, so dass hier ein Zusammenhang zu der Wiederherstellung der Akt-Phosphorylierung durch BSO in Myotuben bestehen könnte (Chen et al., 2007). Ein direkter Einfluss von Superoxid auf die Akt-Phosphorylierung wurde noch nicht nachgewiesen, aber in Hepatoma-Zellen führte eine Erzeugung von Superoxid durch Selenit zu einer Induktion der Apoptose, die eine Inhibierung

der Akt benötigt (Shen et al., 2001). Da Selenit ein Stimulus für die Induktion der mitochondrialen MnSOD sein kann, diese eine Hauptquelle für mitochondriales  $H_2O_2$  ist (Shilo et al., 2005) und die Transkription der MnSOD unter der Kontrolle von FoxO-Proteinen steht (Pardo et al., 2011; Miao und St.Clair, 2009), wurde die Proteinexpression der MnSOD untersucht, die aber in den L6-Zellen auch bei 100  $\mu M$  Selenit unverändert blieb. Auch die Expression des PGC-1 $\alpha$  wurde auf translationaler Ebene nicht verändert. Allerdings wurde durch Insulin und Selenit 1  $\mu M$  die Transkription von PGC-1 $\alpha$  signifikant vermindert. Hier scheint Selenit einen verstärkenden Effekt auf die Regulation des PGC-1 $\alpha$  durch Insulin zu haben (Daitoku et al., 2003). Auch die Expression der GLUT4 wurde durch Selenit 1  $\mu M$  verringert, was einem gegenregulatorischen Effekt zu Insulin entspricht. Die verringerte Expression beider Gene ist in Adipozyten mit Insulinresistenz assoziiert (Hammarstedt et al., 2003). Selenit kann also *in vitro* vereinzelt ähnliche gegenregulatorische Effekte hervorrufen, wie Ristow et al. (2009) es im Menschen für Antioxidantien beobachtet haben.

### 5.1.3 Selenoproteinexpression und Einfluss von Selenoprotein P

Die Expression der Selenoproteine GPx1 und SelW wurde durch Supplementation mit allen 4 hier eingesetzten Selenverbindungen stimuliert. Bei 1  $\mu M$  Konzentration zeigte Selenit gegenüber den anderen Selenverbindungen ein stärkeres Potential bei der Induktion der GPx1- und SelW-mRNA. Auch die GPx-Aktivität war bei Selenitsupplementation am höchsten, während die SelW-Proteinexpression durch alle Verbindungen in gleicher Weise induziert wurde. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von anderen Gruppen gemacht. So wurde in HepG2-Zellen die Expression von Selenoprotein P am stärksten durch Selenit induziert (Hoefig et al., 2010). Bei Untersuchung der Induktion der Glutathionperoxidasen in verschiedenen Zelllinien zeigte sich ebenfalls, dass Selenit der beste Donor für Selenoproteine ist (Brigelius-Flohé et al., 1995-1996). Interessanterweise zeigte sich in genannter Studie auch, dass die Fähigkeit anderer Selenverbindungen die Glutathionperoxidasen zu induzieren teilweise begrenzt war, während die L6-Muskelzellen alle eingesetzten Selenverbindungen zur Selenoproteinsynthese heranziehen konnten. Dies konnte ebenfalls von Yeh et al. (1997) für ein Skelettmuskelzellsystem gezeigt werden, die ebenfalls bei 1  $\mu M$  Selen eine Sättigung der GPx-Aktivität und Selenoprotein W Expression feststellen konnten. Zusätzlich beschrieben Yeh et al., wie auch in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, dass Selenit, bei niedrigeren Konzentrationen als 1 $\mu M$ , der beste Selendonor für die GPx-Aktivität ist. Für den Skelettmuskel konnte *in vivo* gezeigt werden, dass Selenomethionin im Vergleich zu Selenit zu einer verstärktem Anreicherung von Selen führt, aber nicht zu einer entsprechenden Erhöhung der GPx-Aktivität führt. Eine chromatographische Aufreinigung zeigte, dass

Selenit verstärkt in Selenocystein vorzufinden ist, während SeMet vorwiegend in seiner chemischen Form erhalten bleibt (Beilstein und Whanger, 1988; Butler et al., 1990). Besonders in Gehirn und Skelettmuskel ist die Retention von Selenomethionin ausgeprägt (Whanger und Butler, 1988). Eine mögliche Erklärung dafür ist der unspezifische Einbau von SeMet anstelle von Methionin (Kajander et al., 1991) und die Funktion des Skelettmuskels als Reservoir für essentielle Aminosäuren (Dioguardi, 2011). Gleichzeitig könnte darin die vergleichsweise geringe Toxizität des Selenomethionins begründet sein, da im Vergleich zu Selenit und MSeA intrazellulär weniger freies Selen vorliegt. Selenat wird schlechter aufgenommen als Se(IV)-Verbindungen (Vendeland et al., 1994; Ganyc and Self, 2008). Bei der hier eingesetzten Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  war die aufgenommene Menge an Selenat aber ausreichend um die GPx1- und SelW-Expression ähnlich deutlich zu steigern wie bei den übrigen Selenverbindungen, wobei in früheren Studien gezeigt wurde, dass schon geringere Konzentrationen an Selen für eine maximale Induktion an Selenoproteinen genügen (Yeh et al., 1997; Nasr et al., 2004). Bei Supplementationen mit 100 nM Konzentrationen war Selenoprotein P der beste Selendonator für die Synthese von Selenoprotein W, gefolgt von Selenit. Burk und Hill (2009) hatten angenommen, dass der Skelettmuskel sowohl von Selenoprotein P als auch von niedermolekularen Selenverbindungen mit Selen versorgt werden kann, was somit hier bestätigt werden konnte. Durch Misu et al. (2010) wurde beschrieben, dass Selenoprotein P in hohen Konzentrationen zu einer Insulinresistenz in Skelettmuskel und Leber von Mäusen führt, und dass hohe SelP-Plasmawerte mit Typ 2 Diabetes assoziiert sind. Daher wurde hier auch die Akt-Phosphorylierung in L6-Myotuben bei SelP-Inkubation untersucht. Das 10 Selenocysteine enthaltende Selenoprotein bindet an zwei Lipoprotein-Rezeptoren, ApoER2 (Apolipoprotein E Rezeptor 2) und Megalin (Burk et al., 2007; Chiu-Ugalde et al., 2010), und hat eine hohe Affinität für Heparansulfate der extrazellulären Matrix (Arteel et al., 2000). Eine Einflussnahme auf intrazelluläre Signalwege könnte also nicht nur durch Aufnahme des SelP und Stimulation der Selenoproteinsynthese stattfinden, sondern auch eine direkte rezeptorvermittelte Einflussnahme auf die Signaltransduktion ist möglich. Nach 6 h Insulinstimulation wurde eine leicht verringerte Aktivierung der Akt durch Selenoprotein P registriert. Diese Wirkung war nach 24 h nicht mehr zu beobachten. Im Vergleich zu Misu et al., (2010) waren die hier beobachteten Effekte gering, was an den niedrigeren eingesetzten Konzentrationen an Selenoprotein P liegen könnte. Misu et al. setzten als niedrigste Konzentration 5  $\mu\text{g/mL}$  Selenoprotein P ein. Geht man von einem Molekulargewicht von 45 kDa für Selenoprotein P aus und 10 Selenatome pro SelP-Molekül, ergibt sich ein eine Selenkonzentration von 1,1  $\mu\text{M}$ , während in dieser

Arbeit 200 nM eingesetzt wurden. Eine physiologische Plasmakonzentration von SeIP-Selen wäre 500 nM, da SeIP ca. 50% der Selen-Plasmawerte eines gesunden Mitteleuropäers ausmacht (Letsiou et al., 2010).

In L6-Myotuben führten also vor allem die Se(+IV)-Verbindungen Selenit und MSeA, bei physiologisch relevanten Selenkonzentrationen, zu einer Verzögerung der Insulinwirkung, was sich auf die Phosphorylierung von Akt und FoxO1a/3 übertrug. Weiterhin beeinflussten die Se(+IV)-Verbindungen auch die Glucoseaufnahme. Die Herabsetzung der Produktion an intrazellulären ROS durch erhöhte GPx-Aktivität könnte diese Effekte hervorgerufen haben.

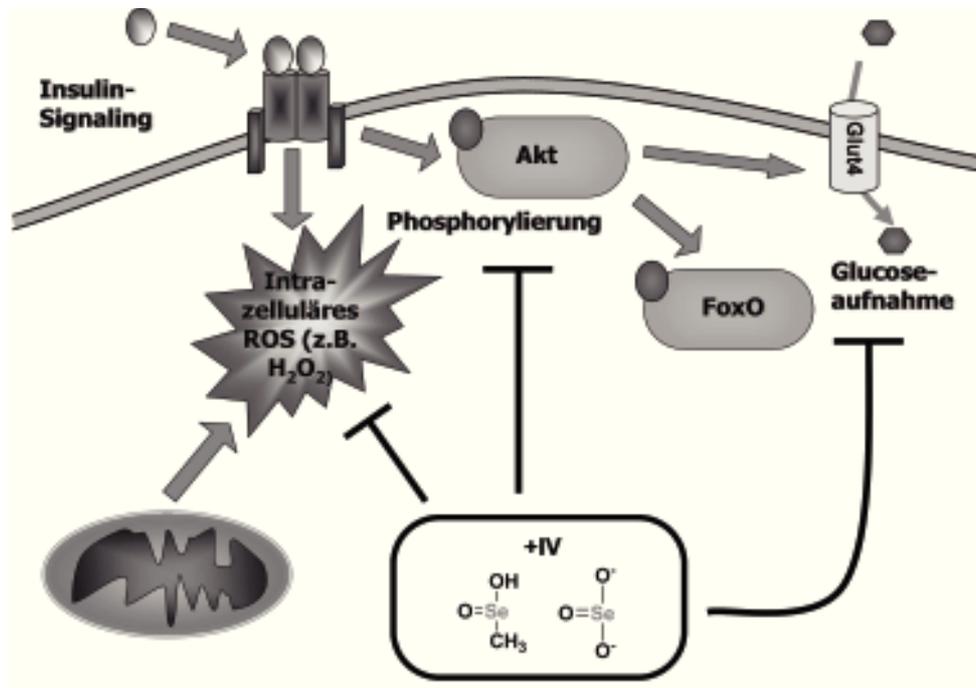


Abbildung 5.1: Angriffspunkte der Se(+IV)-Verbindungen Methylseleninsäure und Selenit innerhalb der Insulinsignaltransduktion von L6-Myotuben (übernommen aus Pinto et al., 2011).

## 5.2 Selenoprotein P beeinflusst die Phosphorylierung von insulinabhängigen Signalmolekülen in humanen Skelettmuskelzellen

Misu et al. (2010) konnten zeigen, dass intraperitoneal verabreichtes Selenoprotein P sowohl die insulinabhängige Glucoseverwertung als auch molekulare Parameter wie Akt-Phosphorylierung und IRS-Phosphorylierung in Leber und Skelettmuskel von Mäusen und in Zellsystems in Zellsystemen inhibiert. Im Allgemeinen kam es zu einer verringerten Aktivierung der metabolischen Signalwege nach SeIP-Injektion. Umgekehrt war in der SeIP-KO-Maus das

Insulinsignaling verbessert, so dass die Hypothese aufgestellt wurde, dass Selenoprotein P ein Hepatokin ist, das Hyperglykämie und Insulinresistenz hervorruft. Der Nachweis erhöhter SelP-Niveaus in Typ 2 Diabetikern unterstützt dieses Konzept (Misu et al., 2010; Roman et al., 2010; Yang et al., 2011). Bei den von Misu et al. eingesetzten SelP-Injektionen handelte es sich allerdings um supraphysiologische Mengen an Selenoprotein P und nicht alle für den Skelettmuskel relevanten Fragestellungen wurden befriedigend beantwortet. Evolutionär bedingt ist der Energiestoffwechsel des Skelettmuskels bei Nagetieren, die eher Fluchttiere sind, und Menschen, die sich in Richtung ausdauerndem Metabolismus entwickelt haben, divergiert (Koch und Britton, 2004), so dass im Rahmen dieser Arbeit beschlossen wurde die Auswirkungen von Selenoprotein P auf Signalmediatoren des Stoffwechsels in humanen Skelettmuskelzellen zu untersuchen.

### **5.2.1 Phosphorylierung von Signalmolekülen der Insulinsignaltransduktion durch Selenoprotein P**

Zuerst wurde die Aktivierung der Akt untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden deutliche inhibitorische Effekte durch SelP auf die Aktivierung durch Insulin, während die niedermolekularen Verbindungen in äquivalenter Konzentration keine Auswirkung hatte. Weitere Insulin-sensitive Kinasen wurden untersucht. Dazu gehörten die GSK3 $\alpha/\beta$ , FAK, Erk1/2, JNK T183/185 und STAT3. Ähnlich wie bei Misu et al. (2010) wurde bei mehreren Kinasen eine Tendenz zur Abschwächung der Insulinwirkung festgestellt. So wurden die Phosphorylierung des Akt-Substrats FoxO1a/3, der JNK und der AMPK $\alpha$  bei Insulinstimulation durch SelP signifikant verringert. Die Phosphorylierung der P38 war basal signifikant verringert. Die durch Insulin unterdrückte Phosphorylierung von STAT3 konnte durch Selenoprotein P wieder hergestellt werden. Die Phosphorylierung der GSK3 $\alpha/\beta$  war durch Selenoprotein P nach Insulinstimulation tendenziell erhöht.

Es ergeben sich also folgende Aussagen: Der kanonische Insulinsignalweg, an dem Akt und FoxO1a/3 beteiligt sind wird, durch Selenoprotein P eindeutig unterdrückt bzw. abgeschwächt. Leicht supprimiert wird ebenfalls die Aktivierung der MAP-Kinasen (P38, Erk1/2, JNK), wenn auch in unterschiedlicher Stärke. Die Unterdrückung der Insulin-unabhängigen AMPK $\alpha$ -Aktivierung und die GSK3-Phosphorylierung könnten durch eine Änderung des cAMP-Spiegels ausgelöst worden sein (Fang et al., 2000; Mihaylova und Shaw, 2011). Die Wiederherstellung der STAT3-Aktivierung deutet ebenfalls auf die

Beinflussung eines anderen Signalwegs hin, da STAT3 im Allgemeinen entweder durch Zytokin- oder Cadherinaktivierung phosphoryliert wird.

Die herabgesetzten Phosphorylierungen der Akt, von FoxO1a/3 und der AMPK $\alpha$  sind konsistent mit der von Misu et al. (2010) beschriebenen, durch SelP induzierten Insulinresistenz. Es ist bekannt, dass die Aktivierung der AMPK $\alpha$  zu einer verstärkten Glucoseaufnahme und verstärkter mitochondrialer ATP-Bildung führt. Obwohl die AMPK eigentlich als insulinunabhängig gilt (Barthel und Schmoll, 2003), wurde in den hier benutzten HSKMC eine verstärkte Phosphorylierung durch Insulin detektiert. Für Skelettmuskel und andere Gewebe wurde dieser Effekt aber beobachtet (Viollet et al., 2010). Die AMPK ist außerdem an der Anpassung von Anabolismus zu Katabolismus innerhalb der Zelle beteiligt. Die Regulation ist kanonisch vom cAMP-Spiegel der Zelle abhängig, bei einem Anstieg der cAMP-Konzentration wird die AMPK über die PKA inaktiviert (Hardie., 2011). Die Aktivierung der AMPK kann aber auch über oxidativen Stress geschehen (Irrcher et al., 2009). Misu et al.; (2010) zeigten eine erhöhte Expression der Proteinphosphatase PP2C, die die AMPK dephosphorylieren kann.

Gleichzeitig ist die verringerte Aktivierung der JNK und P38 eher Signale, die der Insulinresistenz entgegengesetzt sind (Hirosumi et al., 2002; Liu und Cao, 2009). Die JNK wird nicht durch Insulin sondern hauptsächlich durch Fettsäuren und ROS aktiviert. Sie führt über die Expression proinflammatorischer Gene und die Inaktivierung von IRS1 durch Phosphorylierung zu Insulinresistenz (Berdichevsky et al., 2010; Solinas und Karin, 2010). Akuter oxidativer Stress kann allerdings im Skelettmuskel zu einer Inaktivierung der JNK führen und so eine bereits vorhandene Insulinresistenz wieder aufheben (Berdichevsky et al., 2010). Auch die P38 wird durch ROS aktiviert und kann zu einer verstärkten Glucoseaufnahme führen (Diamond-Stanic et al., 2011). Eine Aktivierung der Erk 1/2 durch Insulin konnte nicht beobachtet werden (Boulton et al., 1991).

Die Reinduktion von STAT3 durch Selenprotein P ist mit der Aktivierung von STAT3 durch IL-6 im Skelettmuskel vergleichbar, die zu Insulinresistenz führen kann und spricht für die Hepatokintheorie (Kim et al., 2011b). Außerdem können STAT3 und FoxO in Abhängigkeit von IL-6 interagieren und gegenseitig die transkriptionelle Regulation ihrer Zielgene beeinflussen (Kortylewski et al., 2003). Das könnte auch die im Vergleich zur Akt geringere Inhibierung der Phosphorylierung des FoxO1a/3 erklären. Die Phosphorylierung der STAT3 wird nicht durch ROS beeinflusst. STAT3 ist aber an der Modulation intrazellulärer ROS beteiligt, so wird in mit Adiponektin behandelten Makrophagen die ROS-Produktion durch Aktivierung des Jak2/STAT3-Signalwegs induziert (Akifusa et al., 2010). Außerdem ist

STAT3 für das Überleben und die Differenzierung von Myotuben mitverantwortlich (Boengler et al., 2008; Trenerry et al., 2011) und kann die Öffnung des mitochondrialen Transitions-porenkomplexes mitregulieren und die damit verbundene ROS-Produktion steuern (Mantel et al., 2011).

Ebenfalls einer Insulinresistenz entgegengesetzt ist die Inaktivierung der GSK3 $\alpha/\beta$ , die im Skelettmuskel die Glucoseaufnahme begünstigt (Rayasam et al., 2009). Die Phosphorylierung der GSK3 kann nicht nur durch die Akt mediiert sein, auch andere Kinasen können diese Phosphorylierungsstelle nutzen. Als mögliche Quelle für die verstärkte Phosphorylierung der GSK3 kommt eine cAMP-abhängige Signalkaskade über die Proteinkinase A in Frage, die ebenfalls Ser21/9 phosphorylieren kann (Fang et al., 2000). Im Skelettmuskel, z.B über den Adrenalinrezeptor aktiviert, führte die PKA zu einem verstärkten Insulinsignal, während auf die basale Inaktivierung der GSK3 nur geringe Auswirkungen registriert wurden (Jensen et al., 2007). Eine Inaktivierung der GSK3 $\alpha/\beta$  führt zu einer verstärkten Glycogensynthese, was auf eine erhöhte Versorgung der Zelle mit Glucose bei SeP-Stimulation hindeuten könnte.

Als wichtigste Aktivierungsstelle der FAK dient das Tyrosin 397 in der membranständigen n-terminalen FERM-Domäne (FERM = 4.1-Ezrin-Radixin-Moesin), die bei Integrinsignaling autophosphoryliert wird, und die zur Interaktion mit PI3K, Src und weiteren Kinasen führt (Zhao und Guan, 2011). Die tendenziell verringerte Phosphorylierung der FAK könnte durch ihre direkte Interaktion mit der Akt erklärt werden. Durch diese Interaktion ist Akt in der Lage den Phosphorylierungsstatus der FAK zu beeinflussen (Wang und Basson, 2011).

Es scheint also vor allem, dass die durch ROS regulierten Kinasen inhibiert worden sind, während andere Signalwege entgegengesetzt reguliert worden sind.

### 5.2.2 Steigerung der GPx1-Expression durch Selenoprotein P

Nach 6 h ist die GPx1-Proteinexpression durch Selenoprotein P stark erhöht. Es kann geschlussfolgert werden, dass SeP nach 6 h Signalwege unterdrückt, die sonst durch oxidativen Stress aktiviert sind und zu einer stärkeren metabolischen Aktivität führen würden. Diese Effekte könnten durch die Induktion der GPx1-Expression nach 6 h durch SeP hervorgerufen worden sein. Die intrazelluläre Konzentration an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sollte dadurch erniedrigt sein, und als Folge davon sollten die beschriebenen Wirkungen auf die Kinasen auftreten. Die sonst protektiven Effekte einer GPx1-Induktion (Sies et al., 1997) könnten so zu einer abgeschwächten Insulinwirkung führen.

### **5.2.3 Selenoprotein P unterdrückt die insulinabhängige Egr1-Genexpression**

Die Genexpression von Egr1 wurde hier insulinabhängig verstärkt, was in Übereinstimmung mit der Literatur ist (Barroso und Santisteban, 1999; Baron et al., 2006). In Analogie zur verhinderten Aktivierung der Kinase Akt fand in den HSKMC durch Selenoprotein P eine Unterdrückung der Egr1-Transkription statt. Die Egr-1 Genexpression kann im Skelettmuskel ebenfalls durch ROS reguliert werden, außerdem ist Egr-1 an der Regulation der Expression der MnSOD beteiligt (Pardo et al., 2011). Eine direkte Regulation über die ROS oder die Kinasen ist also möglich. Die mRNA-Ergebnisse der PKC $\delta$ -Expression (PRKCD) sind nicht in Übereinstimmung mit einer Inhibition des Insulinsignalwegs. Allerdings ist die Regulation der PKC $\delta$  nicht vollständig aufgeklärt, Zytokine und NF $\kappa$ B können die Expression der PKC $\delta$  innerhalb kurzer Zeiträume erhöhen und könnten deshalb auch in diesem System eine Rolle bei der Regulation spielen (Suh et al., 2003).

### **5.2.4 Mögliche Mechanismen der durch SelP veränderten Signaltransduktion**

Es gibt mehrere weitere Möglichkeiten wie SelP, diese Signalwege unterdrücken könnte. Einerseits könnte es über rezeptorvermittelte Mechanismen zu einer Störung des intrazellulären Signalings führen. So kann Selenoprotein P an eine Reihe von Rezeptoren und Bestandteilen der extrazellulären Matrix binden, für die es nicht der endogene Ligand ist (Arteel et al., 2000; Burk et al., 2007; Chiu-Ugalde et al., 2010). Besonders zu nennen sind Lipoproteinrezeptoren, die eine große Zahl unterschiedlicher Liganden binden können und auch im Skelettmuskel vorkommen und die Aktivierung der AMPK beeinflussen (Zenimaru et al., 2008). Weiterhin könnten intrazelluläre ROS, die als „*Second Messenger*“ dienen, durch die Induktion der GPx1 unterdrückt werden (Loh et al., 2009), eine Schutzwirkung von Selenoprotein P gegen oxidativen Stress ist ebenfalls beschrieben (Steinbrenner et al., 2006). Eine veränderte ROS-Produktion durch 6 h oder 24 h Inkubation mit Selenoprotein P durch DCF konnte nicht detektiert werden. Als Hepatokin könnte SelP über den TLR4-Rezeptor STAT3 aktivieren und darüber zur Insulinresistenz beitragen. STAT3 ist erst seit Kurzem in das Blickfeld der Diabetesforschung geraten, in Adipozyten überträgt es die Wirkung diverser Zytokine und könnte an der Adipogenese beteiligt sein (Richard und Stephens, 2011). Im Skelettmuskel wurde es als Mediator für das Zytokinsignaling bei IL-6 induzierter Insulinresistenz identifiziert (Kim et al., 2011b). Bei diesem Signalweg vermittelt der Toll-

like-Rezeptor 4 (TLR4) die Insulinresistenz. Dieser Rezeptor kann relativ unspezifisch eine große Anzahl an Substraten, wie z.B. Palmitat, binden und intrazelluläre Signale auslösen, die zu Typ 2 Diabetes führen (Reyna et al., 2008).

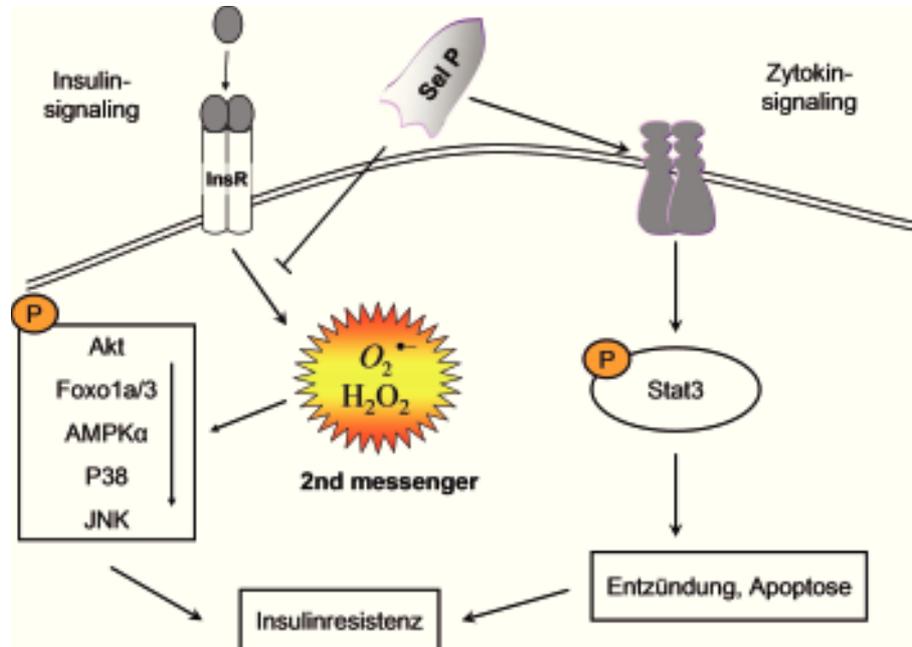


Abbildung 5.2 Interventionen von Selenoprotein P in den Insulin- und Zytokin-Signalweg nach 6h, die zu einer Insulinresistenz führen könnten. Ein möglicher Mechanismus für die Inhibition der Signalkaskade ist die Verringerung der intrazellulären Sauerstoffspezies durch Selenoprotein P, da alle regulierten Kinasen durch diese aktiviert werden können.

### **5.3 Einfluss einer Supplementation mit Selen auf den Energiestoffwechsel in Skelettmuskulatur und viszeralem Fettgewebe im Tiermodell *Sus scrofa***

Schweine (*Sus Scrofa*) gelten in ihren metabolischen Charakteristika und ihrer Physiologie als dem Menschen sehr ähnlich. Damit sind sie für die Untersuchung diabetogener Faktoren gegenüber Nagetieren, die im Lipid- und Kohlehydratstoffwechsel teilweise vom Menschen differieren (Patterson et al., 2008; Bergen und Mersmann, 2005), das bessere Modell. Zusätzlich neigen Schweine ähnlich wie der Mensch, zum übermäßigen Konsum von Nahrung und Bildung von Fettdepots und sind damit auch als Modell für Atherosklerose und kardiovaskuläre Krankheiten geeignet (Pond und Mersmann, 2001; Verma et al., 2011). Für die Supplementation der Tiere wurde eine Selequellen und Selendosen verwendet, die auch im Menschen Anwendung finden. Die beobachtete Steigerung der Plasmaselenwerte durch die erhöhte Selensupplementation der Hoch-Se Gruppe war vergleichbar mit dem Anstieg der Plasmaselenwerte im NPC-Trial von 114.4 µg/L auf ca. 180 µg/L, wo eine sehr ähnliche

Selensupplementation eingesetzt wurde (Stranges et al., 2007). Die Hoch-Se Supplementation führte zu einer Gewichtszunahme, einer eindeutigen Hyperinsulinämie, tendenziell erhöhten Serum Triacylglycerid- und Cholesterinwerten, sowie tendenziell gesteigerter ALT-Aktivität und Glykogenwerten in Leber. Insgesamt sind die metabolischen Veränderungen ein Anzeichen für eine bessere Energieverwertung in den Tieren, die das Hoch-Se Futter erhalten haben. Diese erhöhte Zirkulation an Nährstoffen kann zur Hyperinsulinämie geführt haben, und kann bei langfristigem Vorliegen beider Faktoren im Menschen zu Insulinresistenz führen (Reaven, 1995).

### **5.3.1 Genexpression der Selenoproteine und antioxidativen Enzyme in *Sus Scrofa***

Trotz erhöhter Serumselenwerte zeigte keines hier untersuchten Organe eine signifikant erhöhte Genexpression der Selenoproteine. Es waren maximal Tendenzen in der Hoch-Se-Gruppe sichtbar. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das im Organismus überschüssig vorhandene Selen (siehe Tabelle 4.1: erhöhtes Plasma-Se) in einer anderen Form vorliegen musste, und dass die Genexpression der Selenoproteine bereits durch eine adäquate Selenversorgung gesättigt war. In einer ähnlichen Studie konnte die Selenoproteinexpression durch erhöhte Selengabe weiter gesteigert werden, allerdings wurden dort die angepassten Diäten nur 8 Wochen verabreicht und die Hoch-Se Gruppe erhielt 6-mal soviel Selen wie in der hier vorliegenden Studie (Zhou et al., 2009). Bei den Aktivitäten der untersuchten Selenoenzyme zeigte, sich nur im Skelettmuskel eine Erhöhung der GPx-Aktivität, was mit der Annahme einhergeht, dass Skelettmuskel als eins der letzten Gewebe mit Selen gesättigt wird (Oster et al., 1988; Whanger und Butler, 1988; Zhang et al., 2011) und als Selenspeicher dienen kann. In einem weiteren Schweinemodell wurde ein ähnliches Verhalten der GPx-Aktivität bei Selensupplementation beobachtet (Lei et al., 1998).

Es wurde für möglich gehalten, dass Selen andere antioxidative Enzyme beeinflussen kann und eventuell den Inflammationstatus des Fettgewebes über die Aktivierung von T-Zellen beeinflussen kann (Hoffmann et al., 2010). Hinweise für eine Veränderung der Transkription antioxidativer Enzyme und Adipokine wurden aber nicht gefunden.

### 5.3.2 Einfluss der Selensupplementation auf die Genexpression und die Kinasen des Skelettmuskels

Im Skelettmuskel wurde die Genexpression der muskulären Pyruvatkinase (PKM2), FoxO1 und PGC-1 $\alpha$  (PPARGC-1) signifikant verändert. Die PKM2 wurde vermindert und FoxO1 und PGC-1 $\alpha$  wurden verstärkt exprimiert. Sowohl die erhöhte Expression von FoxO1 als auch von PGC-1 $\alpha$  sind im Skelettmuskel mit der metabolischen Umstellung von Glucoseoxidation zu Fettsäureoxidation assoziiert (Benton et al., 2008; Cheng und White, 2011). PKM2 ist eine für Muskel und Tumore spezifische Isoform der in der Glycolyse aktiven Pyruvatkinase (Bayley und Devilee, 2011). Dort katalysiert sie den letzten Schritt in der *Pay-off* Phase, die Dephosphorylierung von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat unter ATP-Gewinn. Die hier festgestellte Verringerung der PKM2-Expression könnte also eine geringere ATP-Produktion aus der Glycolyse hindeuten. Dies könnte ein Hinweis auf die bevorzugte Nutzung einer anderen Energiequelle als Glucose im Skelettmuskel sein, durch die die Expression der Pyruvatkinase durchaus beeinflusst werden kann (Yamada und Noguchi, 1999). Auch die tendenziell verminderte Expression der Pyruvatdehydrogenasekinase 4 (PDK4,  $p= 0.21$ ) unterstützt die Annahme einer ausreichenden Glucoseversorgung und damit verringerter Glycolyse (Connaughton et al., 2010). Zusätzlich deutet der hier registrierte Anstieg von FOXO1 in die Richtung einer geänderten metabolischen Energieverwertung, da durch eine erhöhte Expression von FoxO1 in Skelettmuskel die Glycolyse verringert und Lipidoxidation bevorzugt wird (Gross et al., 2008; Cheng und White, 2011). Die verstärkte Expression von PGC-1 $\alpha$  (PPARGC1) ist ebenfalls ein Hinweis zu einem Wechsel des Skelettmuskelmetabolismus zur Fettsäureoxidation und kann weiterhin mit der verstärkten AMPK $\alpha$ -Expression und verringerten Erk1/2 Phosphorylierung bei Hoch-Se (siehe Abschnitt 4.3.3) in Übereinstimmung gebracht werden (Benton et al., 2008). Weitere unterstützende Befunde sind die tendenziell erhöhte Regulation der Lipoprotein Lipase (LPL) (Lopez et al., 2009) und des Transkriptionsfaktors p53 (TP53), der erst kürzlich als Induktor des Lipidmetabolismus identifiziert wurde (Goldstein et al., 2011). Die höheren Proteinmengen der AMPK $\alpha$  und die verminderte Phosphorylierung der Erk1/2 im Skelettmuskel könnte durch die erhöhten Insulin- oder Lipidwerte induziert worden sein (Steinberg et al., 2003; Fang et al., 2005). Auch die größere Menge an systemisch vorhandenen Selen könnte auf direktem intrazellulärem Wege diese Effekte auf direktem intrazellulären Wege herbeigeführt haben, da Xenobiotika diese Kinasen ebenfalls stimulieren können (Hardie, 2011; Cargnello und Roux, 2011).

Die beobachteten Veränderungen von molekularen Markern im Skelettmuskel stehen somit im Einklang mit dem Konzept der metabolischen Flexibilität, das eine Adaptation des Stoffwechsels an systemisch verstärkt vorhandenen Lipide beschreibt (Chow et al., 2010). Eine Insulinresistenz scheint dagegen im Skelettmuskel nicht vorzuliegen, da die Phosphorylierung der Akt nicht beeinflusst wurde, und eine Anpassung an vorliegende Metabolite noch möglich ist.

### **5.3.3 Einfluss der Selensupplementation auf die Genexpression und die Kinasen des Fettgewebes**

Im Viszeralfettgewebe wurde nur SREBF1 durch die Hoch-Se Supplementation eindeutig reguliert. Die 1.6 fache Verstärkung in der Hoch-Se Gruppe könnte durch die tendenziell erhöhte Akt-Aktivierung hervorgerufen sein, da die Transkription von SREBF1 durch den Insulinsignalweg induziert werden kann (Nadeau et al., 2004). Die erhöhte Regulation des SREBF1, das ein Masterregulator der Lipidhomöostase ist, deutet im Viszeralfettgewebe auf einem geänderten Lipidmetabolismus hin (Eberle et al., 2004). Auch die verringerte Phosphorylierung der AMPK $\alpha$  im Fettgewebe stimmt mit der Regulation des SREBF1 überein (Zhou et al., 2001). Interessanterweise war auch in der Leber der transgenen GPx1-Maus und ebenfalls in der Leber selensupplementierter Ratten SREBF1 verstärkt reguliert worden (Pepper et al., 2010; Mueller et al., 2008). Auch die Steigerung der LPL-Expression (1,90 p =0,18) und die Verringerung der PGC-1 $\alpha$  Expression (0,55; p =0,27) sind in Übereinstimmung mit den erhöhten Insulinwerten und dem Phosphorylierungsmuster der Kinasen in Fettgewebe (Abbildung 4.41) (Daitoku et al., 2003; Kim et al., 2010). Außerdem könnte die verringerte PGC-1 $\alpha$  Expression zur erniedrigten Selenoprotein P Expression im Fettgewebe beigetragen haben (Speckmann, 2008). Selenoprotein P war lange Zeit als reines sekretorisches Leberprotein bekannt, wurde aber erst kürzlich in ausdifferenzierten Adipozyten entdeckt. Eine verminderte Expression des SelP könnte ebenfalls durch eine erhöhte endokrine Zytokinausschüttung oder durch eine verringerte Differenzierung der Adipozyten hervorgerufen worden sein (Zhang und Chen, 2010). Vor allem in den Kinasen des Fettgewebes zeigte sich der Einfluss der Hyperinsulinämie, da das Fettgewebe sensitiver für Insulin ist als Skelettmuskel (Hom und Goodner, 1984; Kraegen et al., 1986). Die verminderte Phosphorylierung der AMPK könnte von einer verstärkten Fetteinlagerung in viszeralem Fettgewebe herrühren (Hardie, 2011). Eine verminderte AMPK-Phosphorylierung wird auch im Fettgewebe adipöser Patienten mit Insulinresistenz beobachtet (Gauthier et al.,

2011). Die Beeinflussung der Akt, AMPK und MAP-Kinasen durch die Hyperinsulinämie könnte zu gesteigerter Lipogenese und anschließender Lipolyse im Fettgewebe und zu den erhöhten Lipidwerten im Serum geführt haben.

Fasst man alle Beobachtungen zusammen, hatte die erhöhte Selensupplementation eine Hyperinsulinämie zur Folge, die zu einer verstärkten Freisetzung von Lipiden aus Adipozyten und zu einer Verschiebung von Glycolyse hin zur Fettsäureoxidation im Skelettmuskel geführt hat. Das spiegelte sich in einem systemisch erhöhten Lipidumsatz der Hoch-Se Tiere wieder, der zum erhöhten Körpergewicht beigetragen haben könnte. Die durch die Selensupplementation induzierte Gewichtszunahme könnte aber auch direkte Folge einer verbesserten Energieverwertung sein, die zu verstärkter Nutzung anaboler Speicher wie Fett und Glykogen geführt hat. Eine Entwicklung von Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes bei Verwendung einer höheren Supplementationskonzentration, längerer Supplementation, und weiterem Wachsen und Altern der Schweine, erscheint somit nicht ausgeschlossen.

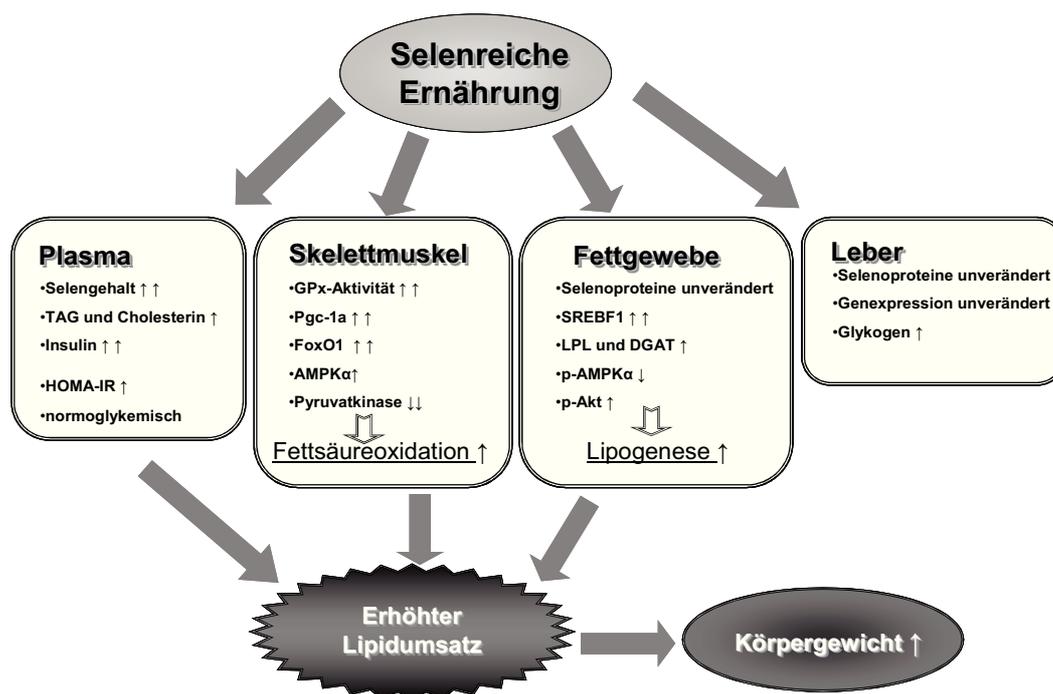


Abbildung 5.3: Einfluss der Selensupplementation auf den Metabolismus von *Sus Scrofa*. Die Adäquat-Se Gruppe erhielt 0.17 mg/kg Selen, die Hoch-Se Gruppe erhielt 0.5 mg/kg Selen. Signifikanzen wurden mit einem Doppelpfeil gekennzeichnet, Tendenzen mit einem einfachen Pfeil. Durch die veränderten Parameter, lässt sich auf einen erhöhten Lipidumsatz schließen der zu einer Erhöhung des Körpergewichts führt.

## **5.4 Potentialbewertung von Selen als Risikofaktor für Typ 2**

### **Diabetes mellitus**

In der Reevaluation des NPC-Trial wurde festgestellt, dass die dort verabreichte Selensupplementation von 200 µg/Tag zu einem erhöhten Diabetesrisiko führen kann (Stranges et al., 2007). Das Diabetesrisiko war zwar zwischen Selen- und Placebokohorte generell erhöht (relatives Risiko 1.5-fach), doch zeigte eine genauere Analyse, dass vor allem das Tertil mit den höchsten Selenwerten (>121.6 µg/L) besonders gefährdet war (relatives Risiko 2.4). Auch in der NHANES-Studie (*Nutrition Examination Survey III*) zeigte sich ein erhöhtes Risiko für Typ 2 Diabetes bei Selenkonzentrationen im Serum von über 137,6 µg/L (relatives Risiko 1.57). Interessanterweise korrelierten in dieser Studie auch die Cholesterinwerte mit den Serumseleenniveaus (Bleys et al., 2007). Diese Studien wurden in den USA durchgeführt, wo die tägliche Selenaufnahme im Vergleich zu Europa relativ hoch ist (Navas Acien et al., 2008). Aber auch in einer britischen Studie konnten erhöhte Blutlipidwerte besonders ab einem Serumseleleveln von ca. 1,5 µM (ca. 119 µg Se/L) gemessen werden (Stranges et al., 2010b). Weiterhin zeigte auch die ORDET-Studie (*Hormones and Diet in the Etiology of Breast Cancer*) in einer weiblichen Kohorte aus der italienischen Provinz Varese eine Korrelation zwischen Diabetesinzidenz und Selenaufnahme. Bei dieser Studie wurden nicht die Serumseleleveln bestimmt, sondern die täglich durch die Nahrung aufgenommenen Selenmengen berechnet. Im höchsten Quintil mit einer Selenaufnahme von >65,4 µg/d, war das relative Risiko für Typ 2 Diabetes um das 2,4-fache erhöhte (Stranges et al., 2010d). Es sollte aber angemerkt werden, dass im höchsten Quintil die Aufnahme von tierischen Proteinen und Fetten ebenfalls am höchsten war, die ebenfalls mit einem erhöhtem Diabetesrisiko assoziiert werden (Aune et al., 2009). Nicht bei allen epidemiologischen Studien zur Selensupplementation korrelierten erhöhte Plasmaselenwerte mit dem Risiko für Typ 2 Diabetes. In der SELECT-Studie, die in den USA stattfand, führte eine Supplementation von 200 µg L-Selenomethionin pro Tag für 5,5 Jahre nur zu einer nicht signifikanten Steigerung des Typ 2 Diabetesrisiko (Lippman et al., 2009). In der in Frankreich durchgeführten, SU.VI.MAX-Studie (*Supplementation en Vitamines et Mineraux Antioxydants*) kam es zu keiner Korrelation zwischen der Selenzufuhr von 100 µg/d an Selenhefe über 7,5 Jahre und erhöhtem Diabetesrisiko (Czernichow et al., 2006).

In Europa liegt die durchschnittliche tägliche Selenaufnahme bei ca 30-50 µg während in den USA 106 µg pro Tag aufgenommen werden (Rayman, 2008). Bei zusätzlicher Selensupplementation werden also besonders in den USA hohe Serumseleleveln und damit auch eine besonders starke Selenakkumulation im Gewebe erreicht, wie diverse Studien

zeigen konnten (Clark et al., 1996; Lippman et al., 2009). Das überschüssige Selen könnte molekulare Signale induzieren oder verändern oder auf den Energiestoffwechsel Einfluss nehmen. Dafür werden aktuell verschiedene potentielle Mechanismen diskutiert. Zum einen könnte eine erhöhte Expression des Selenoprotein P zu einer Inhibition der Insulinwirkung führen (Misu et al., 2010). Zum anderen könnte die systemisch verstärkte Expression antioxidativer Selenoproteine wie GPx1 die Phosphorylierungen innerhalb Insulinsignaltransduktion beeinflussen (McClung et al., 2004; Wang et al., 2008; Loh et al., 2009; Labunskyy et al., 2011). Die dritte Möglichkeit ist, dass niedermolekulare Selenverbindungen akkumulieren und schädliche Auswirkungen auf den zellulären Metabolismus haben könnte.

Die SelP-Expression im Plasma wird durch Selensupplementation erst später gesättigt als die GPx3 (Xia et al., 2005). Es beinhaltet ca. 50% des Serumselens (Letsiou et al., 2010). Interessanterweise wird es durch Insulin, Dexamethason und Glucose ähnlich reguliert wie das Gluconeogeneseenzym Glucose-6-Phosphatase (Speckmann et al., 2008; Speckmann et al., 2009). Bei Diabetikern wurden erhöhte SelP-Werte gemessen, und eine intraperitoneale Applikation von SelP im Mausmodell führte zu einer Insulinresistenz (Misu et al., 2010). Andererseits wurde gezeigt, dass bei gesunden Individuen Selenoprotein P bereits bei 120 µg/L Serum-Se gesättigt war und auch durch Supplementation nicht weiter erhöht werden konnte (Burk et al., 2006; Combs et al., 2011). Die Biosynthese von Selenoprotein P müsste also nicht nur durch Selen, sondern auch durch weitere Faktoren stimuliert werden, um zu den sehr hohen Selenwerten des NPC-Trial und der NHANES-Studie beitragen zu können (Stranges et al., 2007; Bleyts et al., 2007). Ein möglicher Faktor wären Corticosteroide, die im Typ 2 Diabetes erhöht sind, und sowohl die Gluconeogenese als auch die Selenoprotein P Synthese stimulieren können (Anagnostis et al., 2009; Speckmann et al., 2008). Bei ausreichend hoher Expression kann Selenoprotein P wie auch in dieser Arbeit gezeigt, also zur Entwicklung einer Insulinresistenz beitragen.

Die systemische Überexpression der GPx1 führte zu einem transgenen Mausmodell mit beeinträchtigter Insulinsignalkaskade in peripheren Geweben wie Skelettmuskel (McClung et al., 2004). Zusätzlich zeigte sich in der GPx1-Maus eine Hyperinsulinämie, die durch Inhibition einer durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors PDX1 in pancreatischen β-Zellen (Wang et al., 2008) ausgelöst wurde. Durch Nahrungskarenz konnte der Phänotyp der Insulinresistenz verhindert, die Hyperinsulinämie aber nicht aufgehoben werden. Eine zusätzliche Selendefizienz konnte weitere Veränderungen in der Signaltransduktion der GPx1-Maus hervorrufen (Pepper et al., 2010). In den

Insulinzielgeweben ist, wie in dieser Arbeit und durch andere gezeigt wurde (Whanger und Butler, 1988; Lei et al., 1998), eine Induktion der GPx1 durch Selensupplementation nur im begrenzten Maße möglich, so dass eine Sättigung unterhalb der Diabetes-assoziierten Serumsekonzentration auftritt. In der  $\beta$ -Zelle könnten auch physiologische Mengen an Selen die fragile ROS-Balance und so auch die ROS-abhängige Insulinsekretion beeinflussen (Lei und Vatamaniuk, 2010). So wird in  $\beta$ -Zellen durch 30 nM Selenit die Genexpression von Insulin induziert (Campbell et al., 2008). Auch weitere Selenoproteine könnten zur Entwicklung eines Typ 2 Diabetes beitragen. In diesem Zusammenhang zeigten Labunskyy et al. (2011), dass durch die Überexpression einer mutanten  $i^6A$ -tRNA<sup>sec</sup> in einem transgenen Mausmodell hierarchisch niedrige Selenoproteine (auch GPx1) nicht exprimiert werden, was ebenfalls zu Glucoseintoleranz, Hyperglykämie und Hyperinsulinämie führte. Sie argumentieren, dass die ROS-Balance sowohl durch verminderte als auch durch erhöhte Selenoproteinexpression, so verschoben werden kann, dass Defekte im Kohlenhydratstoffwechsel eintreten. Vor allem für die  $\beta$ -Zellen des Pancreas ist eine solche Beeinflussung der Funktion durch ROS bekannt (Lei und Vatamaniuk, 2010). Bei einer Nahrungsergänzung mit Selen wird allerdings nur ein geringer Teil des in Organen vorhandenen Selens in Selenoproteinen gebunden. Besonders in Skelettmuskel liegt der größte Teil in anderer Form vor (Whanger und Butler, 1988). Es sollte also in Betracht gezogen werden, dass auch niedermolekulare Verbindungen zu einer Erhöhung des Typ 2 Diabetesrisiko beitragen können. Vor allem L-Selenomethionin und Selenhefe (mit einem ebenfalls großen L-Selenomethioninanteil) können zu einer starken Erhöhung der Serumsekonzentrationen führen (Whanger und Butler, 1988; Burk et al., 2006; Rayman et al., 2008). Eine Einflussnahme auf die Wirkung von Wachstumsfaktoren und Hormonen ist durch die niedermolekularen Selenverbindungen durchaus möglich, wie auch in dieser Arbeit für Myoblasten und Myotuben gezeigt wurde. So können Selenverbindungen *in vivo* Thiole oxidieren und damit die intrazelluläre Signaltransduktion modulieren (Mueller et al., 2009a; Bosse et al., 2010) oder die T-Zellantwort modifizieren (Hoffmann et al., 2010). Da Redoxreaktionen an allen wichtigen zellulären Prozessen beteiligt sind, und auch die Insulinsensitivität vom Thiolstatus der Zelle abhängig ist (Findeisen et al., 2011), muss in Betracht gezogen werden, dass auch unabhängig von der Induktion der Selenoproteine niedermolekulare Selenverbindungen zur Pathogenese der Insulinresistenz beitragen können. Abschließend sollte angemerkt werden, dass unter Einbeziehung der epidemiologischen Studien und der molekularbiologischen und der biochemischen Befunde, eine negative Beeinflussung der Insulinsensitivität und Insulinsekretion durch eine supraphysiologische

Selensupplementation für möglich gehalten wird. Allerdings scheint es sehr unwahrscheinlich, dass es allein durch eine verstärkte Aufnahme von Selen unterhalb der tolerierbaren Aufnahmegrenze von 400 µg/Tag (Institute of Medicine, Food and Nutrition Board 2000) bei gesunden Individuen zu der Ausprägung eines Typ 2 Diabetes kommen kann. Insgesamt jedoch sollte Selen, trotz unbestreitbar positiver Effekte einer Selensupplementation bei defizientem oder suboptimalem Selenstatus, als möglicher Risikofaktor bei Individuen mit bereits ausreichender Selenversorgung und/oder prädiabetischen Zustand angesehen werden.

## 6 Zusammenfassung

Eine Supplementation der Nahrung mit dem essentiellen Spurenelement Selen ist weit verbreitet. Die Induktion der Selenoproteine und die antioxidativen Eigenschaften des Selen sollen prophylaktisch gegen Krebs und altersbedingte Erkrankungen schützen. Allerdings zeigten epidemiologische Studien, dass eine Selensupplementation bei bereits gutem basalen Selenstatus zu einem erhöhtem Typ 2 Diabetesrisiko führen kann. Im Typ 2 Diabetes ist die Insulinsignaltransduktion in peripheren Geweben wie Skelettmuskel, Leber und Fettgewebe gestört. Das führt zu Insulinresistenz und einer Fehlregulation der Glucosehomöostase.

Deshalb wurde in dieser Arbeit in drei Modellen des Skelettmuskels der Einfluss von Selen auf die Insulinsignaltransduktion erforscht.

(1) In L6-Myotuben wurde vorrangig die Fähigkeit niedermolekularer Selenverbindungen untersucht, die Insulinsignaltransduktion zu beeinflussen. Hierbei zeigte sich, dass die Selen(+IV)-Verbindungen Selenit und Methylseleninsäure die Phosphorylierung der insulinresponsiven Proteinkinase B (PKB) verzögern konnten. Auch die PKB-abhängige Glucoseaufnahme und Phosphorylierung von FoxO-Transkriptionsfaktoren wurden vermindert. Die Beeinflussung der Insulinsignaltransduktion könnte eine Folge verringerter Produktion von ROS (*Reactive Oxygen Species*) sein, die durch Se(+IV)-Verbindungen ebenfalls erniedrigt waren. Die Verminderung der intrazellulären ROS lässt sich durch eine gesteigerte Aktivität des Selenoenzyms Glutathionperoxidase (GPx) bei den Se(+IV)-Verbindungen erklären.

(2) Auch in humanen Skelettmuskelzellen waren durch Selenoprotein P die insulinabhängige Phosphorylierung der PKB und FoxO-Transkriptionsfaktoren unterdrückt. Die Phosphorylierung der stressresponsiven Kinasen JNK und P38 sowie des metabolischen Regulators AMP-Kinase wurden in Abhängigkeit von SelP (Selenoprotein P) vermindert. Zusätzlich wurde die Aktivierung des Zytokinsignalwegs durch SelP über Stat3 beobachtet. Die Verstärkung der Genexpression von Egr-1 durch Insulin konnte durch SelP ebenfalls inhibiert werden.

(3) In einem Tiermodell (*Sus Scrofa*) führte eine hohe Selenzufuhr (0.5 mg/kg) zu einer Steigerung der GPx-Aktivität im Skelettmuskel, während die Selenoproteingenexpression in Skelettmuskel, Leber und viszeralem Fettgewebe bereits bei adäquater Selenzufuhr (0.17 mg/kg) gesättigt war. Durch die selenreiche Ernährung wurde eine Hyperinsulinämie, eine Gewichtszunahme und eine tendenzielle Erhöhung der Plasmalipidwerte induziert. Diese Veränderungen korrelierten auf molekularer Ebene im Fettgewebe mit einer verstärkten

Phosphorylierung der PKB und einer verminderten Phosphorylierung der AMP-Kinase, die zu einer Induktion der Genexpression von SREBF1 führte, einem regulatorischen Transkriptionsfaktor der Lipogenese. In diesem Zusammenhang wurde im Skelettmuskel eine Adaptation an Lipide als Energiequelle beobachtet. Die beobachtete Induktion von FoxO1 und PGC-1 $\alpha$  im Skelettmuskel sind Merkmale einer gesteigerten Fettsäureoxidation, während die beobachtete Verringerung der Pyruvatkinase-Expression ein Anzeichen für eine verminderte Glycolyse ist.

In den drei Modellen wurden verschiedene zelluläre und physiologische Antworten auf eine gesteigerte Selenversorgung beobachtet, die deutlich machen, dass Selenverbindungen in der Lage sind, die Insulinsignaltransduktion und die metabolische Regulation zu beeinflussen. Besonders Selenoprotein P war *in vitro* dazu in der Lage, insulinresistenzähnliche Zustände hervorzurufen, während niedermolekulare Selenverbindungen nur zu einer Verzögerung der Insulinsignaltransduktion führten. *In vivo* führte die Selensupplementation zu einer Hyperinsulinämie und Hyperlipidämie, Faktoren für die mögliche Ausprägung einer Insulinresistenz, an die aber eine metabolische Anpassung stattgefunden hat. Damit kann ein erhöhter Selenstatus durchaus als Risikofaktor bei der Ausprägung einer Insulinresistenz und damit eines Typ 2 Diabetes angesehen werden.

## 7 Literatur

- Aachmann, F.L., Fomenko, D.E., Soragni, A., Gladyshev, V.N., Dikiy, A., 2007. Solution Structure of Selenoprotein W und NMR Analysis of Its Interaction with 14-3-3 Proteins. *J. Biol. Chem.* 282 (51), 37036–37044.
- Abdo, K.M., 1994 NTP Technical Report on Toxicity Studies of Sodium Selenate and Sodium Selenite. National Toxicology Program-Toxicity Report Series No. 38.
- Ahmad, B., 2004. Review: Pharmacology of insulin. *The British Journal of Diabetes & Vascular Disease* 4 (1), 10–14.
- Akifusa, S., Kamio, N., Shimazaki, Y., Yamaguchi, N., Nonaka, K., Yamashita, Y., 2010. Involvement of the JAK-STAT pathway und SOCS3 in the regulation of adiponectin-generated reactive oxygen species in murine macrophage RAW 264 cells. *J Cell Biochem* 111 (3), 597–606.
- Alessi, D.R., Caudwell, F.B., Andjelkovic, M., Hemmings, B.A., Cohen, P., 1996. Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 und p70 S6 kinase. *FEBS Lett* 399 (3), 333–338.
- Al-Khalili, L., Forsgren, M., Kannisto, K., Zierath, J., Lönnqvist, F., Krook, A., 2005. Enhanced insulin-stimulated glycogen synthesis in response to insulin, metformin or rosiglitazone is associated with increased mRNA expression of GLUT4 und peroxisomal proliferator activator receptor gamma co-activator 1. *Diabetologia* 48 (6), 1173–1179.
- Ali, M.K., Weber, M.B., Narayan, K.M.V., 2010. The Global Burden of Diabetes, in: , *Textbook of Diabetes*. Wiley-Blackwell, pp. 69–84.
- Allmang, C., Wurth, L., Krol, A., 2009. The selenium to selenoprotein pathway in eukaryotes: More molecular partners than anticipated. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790 (11), 1415–1423.
- Anagnostis, P., Athyros, V., Tziomalos, K., Karagiannis, A., Mikhailidis, D., 2009. Clinical review: The pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: a hypothesis. *J Clin Endocrinol Metab* 94 (8), 2692–2701.
- Antuna-Puente, B., Feve, B., Fellahi, S., Bastard, J.P., 2008. Adipokines: the missing link between insulin resistance und obesity. *Diabetes Metab* 34 (1), 2–11.
- Arbogast, S., Beuvin, M., Fraysse, B., Zhou, H., Muntoni, F., Ferreira, A., 2009. Oxidative stress in SEPN1-related myopathy: from pathophysiology to treatment. *Ann. Neurol.* 65 (6), 677–686
- Arbogast, S., Ferreira, A., 2010. Selenoproteins und protection against oxidative stress: selenoprotein N as a novel player at the crossroads of redox signaling und calcium homeostasis. *Antioxid Redox Signal* 12 (7), 893–904.
- Arnér, E.S., 2010. Selenoproteins—What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? Special Issue Celebrating the 60-Year Anniversary of ECR und the 200-Year Anniversary of the Karolinska Institute. *Experimental Cell Research* 316 (8), 1296–1303.

- Arnér, E.S., 2009. Focus on mammalian thioredoxin reductases--important selenoproteins with versatile functions. *Biochim Biophys Acta* 1790 (6), 495–526. Arnér, E.S., Holmgren, A., 2000. Physiological functions of thioredoxin und thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 267 (20), 6102–6109.
- Arteel, G.E., Franken, S., Kappler, J., Sies, H., 2000. Binding of selenoprotein P to heparin: characterization with surface plasmon resonance. *Biol Chem* 381 (3), 265–268.
- Arteel, G.E., Sies, H., 2001. The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 10 (4), 153–158.
- Aune, D., Ursin, G., Veierod, M.B., 2009. Meat consumption und the risk of type 2 diabetes: a systematic review und meta-analysis of cohort studies. *Diabetologia* 52 (11), 2277–2287.
- Bansal, M.P., Mukhopadhyay, T., Scott, J., Cook, R.G., Mukhopadhyay, R., Medina, D., 1990. DNA sequencing of a mouse liver protein that binds selenium: implications for selenium's mechanism of action in cancer prevention. *Carcinogenesis* 11 (11), 2071–2073.
- Baptista, R.J., Bistran, B.R., Blackburn, G.L., Miller, D.G., Champagne, C.D., Buchanan, L., 1984. Suboptimal selenium status in home parenteral nutrition patients with small bowel resections. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 8 (5), 542–545.
- Barnes, K., Evenson, J., Raines, A., Sunde, R., 2009. Transcript analysis of the selenoproteome indicates that dietary selenium requirements of rats based on selenium-regulated selenoprotein mRNA levels are uniformly less than those based on glutathione peroxidase activity. *J Nutr* 139 (2), 199–206.
- Baron, V., Adamson, E.D., Calogero, A., Ragona, G., Mercola, D., 2006. The transcription factor *Egr1* is a direct regulator of multiple tumor suppressors including *TGFbeta1*, *PTEN*, *p53*, und *fibronectin*. *Cancer Gene Ther* 13 (2), 115–124.
- Baron, V., Calleja, V., Ferrari, P., Alengrin, F., Van, O.E., 1998. *p125Fak* focal adhesion kinase is a substrate for the insulin und insulin-like growth factor-I tyrosine kinase receptors. *J Biol Chem* 273 (12), 7162–7168.
- Barroso, I., Santisteban, P., 1999. Insulin-induced Early Growth Response Gene (*Egr-1*) Mediates a Short Term Repression of Rat Malic Enzyme Gene Transcription. *Journal of Biological Chemistry* 274 (25), 17997–18004.
- Barthel, A., Schmoll, D., 2003. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *American Journal of Physiology - Endocrinology und Metabolism* 285 (4), E685-E692.
- Bayley, J.P., Devilee, P., 2011. The Warburg effect in 2012. *Curr Opin Oncol*.
- Beck, M., Levander, O., Handy, J., 2003. Selenium deficiency und viral infection. *J Nutr* 133 (5 Suppl 1), 1463S-7S.
- Becker, D.J., Reul, B., Ozcelikay, A.T., Buchet, J.P., Henquin, J.C., Brichard, S.M., 1996. Oral selenate improves glucose homeostasis und partly reverses abnormal expression of liver glycolytic und gluconeogenic enzymes in diabetic rats. *Diabetologia* 39 (1), 3–11.
- Bedard, K., Krause, K.-H., 2007. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology und Pathophysiology. *Physiological Reviews* 87 (1), 245–313.

- Behne, D., Kyriakopoulos, A., Meinhold, H., Kohrle, J., 1990. Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 173 (3), 1143–1149.
- Beilstein, M.A., Vendeland, S.C., Barofsky, E., Jensen, O.N., Whanger, P.D., 1996. Selenoprotein W of rat muscle binds glutathione und an unknown small molecular weight moiety. *Journal of Inorganic Biochemistry* 61 (2), 117–124.
- Beilstein, M.A., Whanger, P.D., 1988. Glutathione peroxidase activity und chemical forms of selenium in tissues of rats given selenite or selenomethionine. *Journal of Inorganic Biochemistry* 33 (1), 31–46.
- Bell, G.I., Kayano, T., Buse, J.B., Burant, C.F., Takeda, J., Lin, D., Fukumoto, H., Seino, S., 1990. Molecular Biology of Mammalian Glucose Transporters. *Diabetes Care* 13 (3), 198–208.
- Bellingham, J., Gregory-Evans, K., Fox, M.F., Gregory-Evans, C.Y., 2003. Gene structure und tissue expression of human selenoprotein W, SEPW1, und identification of a retroprocessed pseudogene, SEPW1P. *Biochim. Biophys. Acta* 1627 (2-3), 140–146.
- Benton, C.R., Holloway, G.P., Han, X.-X., Yoshida, Y., Snook, L.A., Lally, J., Glatz, J.F., Luiken, J., Chabowski, A., Bonen, A., 2010. Increased levels of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha (PGC-1alpha) improve lipid utilisation, insulin signalling and glucose transport in skeletal muscle of lean and insulin-resistant obese Zucker rats. *Diabetologia* 53 (9), 2008–2019.
- Benton, C., Nickerson, J., Lally, J., Han, X.-X., Holloway, G., Glatz, J., Luiken, J., Graham, T., Heikkila, J., Bonen, A., 2008. Modest PGC-1alpha overexpression in muscle in vivo is sufficient to increase insulin sensitivity and palmitate oxidation in subsarcolemmal, not intermyofibrillar, mitochondria. *J Biol Chem* 283 (7), 4228–4240.
- Benton, C.R., Wright, D.C., Bonen, A., 2008b. PGC-1alpha-mediated regulation of gene expression und metabolism: implications for nutrition und exercise prescriptions. *Applied physiology, nutrition, und metabolism* 33 (5), 843–862.
- Berdichevsky, A., Guarente, L., Bose, A., 2010. Acute oxidative stress can reverse insulin resistance by inactivation of cytoplasmic JNK. *J Biol Chem* 285 (28), 21581–21589.
- Bergen, W.G., Mersmann, H.J., 2005. Comparative Aspects of Lipid Metabolism: Impact on Contemporary Research und Use of Animal Models. *The Journal of Nutrition* 135 (11), 2499–2502.
- Bergeron, R., Russell, R., Young, L.H., Ren, J.M., Marcucci, M., Lee, A., Shulman, G.I., 1999. Effect of AMPK activation on muscle glucose metabolism in conscious rats. *Am J Physiol* 276 (5 Pt 1), E938-44.
- Berggren M, Sittadjody S, Song Z, Samira JL, Burd R, Meuillet EJ, 2009. Sodium selenite increases the activity of the tumor suppressor protein, PTEN, in DU-145 prostate cancer cells. *Nutrition und Cancer* 61 (3), 322-261.
- Bisht, B., Goel, H.L., Dey, C.S., 2007. Focal adhesion kinase regulates insulin resistance in skeletal muscle. *Diabetologia* 50 (5), 1058–1069.

- Bjornholm, M., Kawano, Y., Lehtihet, M., Zierath, J.R., 1997. Insulin receptor substrate-1 phosphorylation und phosphatidylinositol 3-kinase activity in skeletal muscle from NIDDM subjects after in vivo insulin stimulation. *Diabetes* 46 (3), 524–527.
- Bleys, J., Navas-Acien, A., Guallar, E., 2007. Serum Selenium und Diabetes in U.S. Adults. *Diabetes Care* 30 (4), 829–834.
- Bloch-Damti, A., Bashan, N., 2005. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 7 (11-12), 1553–1567.
- Boengler, K., Hilfiker-Kleiner, D., Drexler, H., Heusch, G., Schulz, R., 2008. The myocardial JAK/STAT pathway: From protection to failure. *Pharmacology & Therapeutics* 120 (2), 172–185.
- Boonsong, T., Norton, L., Chokkalingam, K., Jewell, K., Macdonald, I., Bennett, A., Tsintzas, K., 2007. Effect of exercise und insulin on SREBP-1c expression in human skeletal muscle: potential roles for the ERK1/2 und Akt signalling pathways. *Biochem Soc Trans* 35 (Pt 5), 1310–1311.
- Bosl, M.R., Takaku, K., Oshima, M., Nishimura, S., Taketo, M.M., 1997. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (11), 5531–5534.
- Bosse, A.C., Pallauf, J., Hommel, B., Sturm, M., Fischer, S., Wolf, N.M., Mueller, A.S., 2010. Impact of selenite und selenate on differentially expressed genes in rat liver examined by microarray analysis. *Biosci Rep* 30 (5), 293–306.
- Boulton, T.G., Nye, S.H., Robbins, D.J., Ip, N.Y., Radzilewska, E., Morgenbesser, S.D., DePinho, R.A., Panayotatos, N., Cobb, M.H., Yancopoulos, G.D., 1991. ERKs: A family of protein-serine/threonine kinases that are activated und tyrosine phosphorylated in response to insulin und NGF. *Cell* 65 (4), 663–675.
- Bozulic, L., Surucu, B., Hynx, D., Hemmings, B., 2008. PKBalpha/Akt1 acts downstream of DNA-PK in the DNA double-strand break response und promotes survival. *Mol Cell* 30 (2), 203–213.
- Brigelius-Flohé, R., 2009. Commentary: oxidative stress reconsidered. *Genes Nutr* 4 (3), 161–163.
- Brigelius-Flohé, R., 2006. Glutathione peroxidases und redox-regulated transcription factors. *Biological Chemistry. Biological Chemistry* 387 (10\_11), 1329–1335.
- Brigelius-Flohé, R., Lotzer, K., Maurer, S., Schultz, M., Leist, M., 1995-1996. Utilization of selenium from different chemical entities for selenoprotein biosynthesis by mammalian cell lines. *Biofactors* 5 (3), 125–131.
- Broggiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R., Hafen, E., 2001. An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor und insulin-like peptides in growth control. *Curr Biol* 11 (4), 213–221.
- Burk, R., Norsworthy, B., Hill, K., Motley, A., Byrne, D., 2006. Effects of chemical form of selenium on plasma biomarkers in a high-dose human supplementation trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15 (4), 804–810.

- Burk, R.F., Hill, K.E., 2005. SELENOPROTEIN P: An Extracellular Protein with Unique Physical Characteristics und a Role in Selenium Homeostasis. *Annual Review of Nutrition* 25 (1), 215–235.
- Burk, R.F., Hill, K.E., Olson, G.E., Weeber, E.J., Motley, A.K., Winfrey, V.P., Austin, L.M., 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. Neurosci.* 27 (23), 6207–6211.
- Burk, R.F., Hill, K.E., 2009. Selenoprotein P-Expression, functions, und roles in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* (1790), 1441–1447.
- Butler, J.A., Whanger, P.D., Kaneps, A.J., Patton, N.M., 1990. Metabolism of selenite und selenomethionine in the rhesus monkey. *J Nutr* 120 (7), 751–759.
- Byon, J.C., Dadke, S.S., Rulli, S., Kusari, A.B., Kusari, J., 2001. Insulin regulates MAP kinase phosphatase-1 induction in Hirc B cells via activation of both extracellular signal-regulated kinase (ERK) und c-Jun-N-terminal kinase (JNK). *Mol Cell Biochem* 218 (1-2), 131–138.
- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A., 2001. Hormesis: a generalizable und unifying hypothesis. *Crit Rev Toxicol* 31 (4-5), 353–424.
- Campbell, S.C., Aldibbiat, A., Marriott, C.E., Landy, C., Ali, T., Ferris, W.F., Butler, C.S., Shaw, J.A., Macfarlane, W.M., 2008. Selenium stimulates pancreatic  $\beta$ -cell gene expression und enhances islet function. *FEBS Letters* 582 (15), 2333–2337.
- Cantor, A.H., Moorhead, P.D., Musser, M.A., 1982. Comparative effects of sodium selenite und selenomethionine upon nutritional muscular dystrophy, selenium-dependent glutathione peroxidase, and tissue selenium concentrations of turkey poults. *Poult Sci* 61 (3), 478–484.
- Cantrell, D.A., 2001. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J Cell Sci* 114 (Pt 8), 1439–1445.
- Capetanaki, Y., Bloch, R.J., Kouloumenta, A., Mavroidis, M., Psarras, S., 2007. Muscle intermediate filaments und their links to membranes und membranous organelles. Special Issue - Intermediate Filaments. *Experimental Cell Research* 313 (10), 2063–2076.
- Cargnello, M., Roux, P.P., 2011. Activation und Function of the MAPKs und Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology und Molecular Biology Reviews* 75 (1), 50–83.
- Castellano, S., 2009. On the unique function of selenocysteine - Insights from the evolution of selenoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790 (11), 1463–1470.
- Catani, M.V., Savini, I., Duranti, G., Caporossi, D., Ceci, R., Sabatini, S., Avigliano, L., 2004. Nuclear factor  $\kappa$ B und activating protein 1 are involved in differentiation-related resistance to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radical Biology und Medicine* 37 (7), 1024–1036.

- Chambers, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Affara, N., McBain, W., Harrison, P.R., 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), 1221–1227.
- Chambers, M.A., Moylan, J.S., Smith, J.D., Goodyear, L.J., Reid, M.B., 2009. Stretch-stimulated glucose uptake in skeletal muscle is mediated by reactive oxygen species and p38 MAP-kinase. *J Physiol* 587 (Pt 13), 3363–3373.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews* 59 (3), 527–605.
- Chariot, P., Dubreuil-Lemaire, M.L., Zhou, J.Y., Lamia, B., Dume, L., Larcher, B., Monnet, I., Levy, Y., Astier, A., Gherardi, R., 1997. Muscle involvement in human immunodeficiency virus-infected patients is associated with marked selenium deficiency. *Muscle Nerve* 20 (3), 386–389.
- Chavatte, L., Brown, B.A., Driscoll, D.M., 2005. Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes. *Nat Struct Mol Biol* 12 (5), 408–416.
- Chen, J.-J., Boylan, L., Wu, C.-K., Spallholz, J.E., 2007. Oxidation of glutathione and superoxide generation by inorganic and organic selenium compounds. *Biofactors* 31 (1), 55–66.
- Chen, X., Zhong, Z., Xu, Z., Chen, L., Wang, Y., 2010. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radic Res* 44 (6), 587–604.
- Cheng, Z., Tseng, Y., White, M., 2010. Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 21 (10), 589–598.
- Cheng, Z., White, M., 2011. Targeting Forkhead box O1 from the concept to metabolic diseases: lessons from mouse models. *Antioxid Redox Signal* 14 (4), 649–661.
- Choi, C.S., Befroy, D.E., Codella, R., Kim, S., Reznick, R.M., Hwang, Y.-J., Liu, Z.-X., Lee, H.-Y., Distefano, A., Samuel, V.T., Zhang, D., Cline, G.W., Handschin, C., Lin, J., Petersen, K.F., Spiegelman, B.M., Shulman, G.I., 2008. Paradoxical effects of increased expression of PGC-1 $\beta$  on muscle mitochondrial function and insulin-stimulated muscle glucose metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (50), 19926–19931.
- Connaughton, S., Chowdhury, F., Attia, R., Song, S., Zhang, Y., Elam, M., Cook, G., Park, E., 2010. Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase isoform 4 (PDK4) gene expression by glucocorticoids and insulin. *Mol Cell Endocrinol* 315 (1-2), 159–167.
- Chiu-Ugalde, J., Theilig, F., Behrends, T., Drebes, J., Sieland, C., Subbarayal, P., Köhrle, J., Hammes, A., Schomburg, L., Schweizer, U., 2010. Mutation of megalin leads to urinary loss of selenoprotein P and selenium deficiency in serum, liver, kidneys and brain. *Biochemical Journal* 431 (1), 103–111.
- Chow, L., From, A., Seaquist, E., 2010. Skeletal muscle insulin resistance: the interplay of local lipid excess and mitochondrial dysfunction. *Metabolism* 59 (1), 70–85.

- Clark, L.C., Combs, G., Turnbull, B.W., Slate, E.H., Chalker, D.K., Chow, J., Davis, L.S., Glover, R.A., Graham, G.F., Gross, E.G., Krongrad, A., Lesher, J., Park, H.K., Sanders, B., Smith, C.L., Taylor, J.R., 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), 1957–1963.
- Clavel, S., Siffroi-Fernandez, S., Coldefy, A.S., Boulukos, K., Pisani, D.F., Derijard, B., 2010. Regulation of the Intracellular Localization of Foxo3a by Stress-Activated Protein Kinase Signaling Pathways in Skeletal Muscle Cells. *Mol. Cell. Biol.* 30 (2), 470–480.
- Combs, G., Watts, J.C., Jackson, M.I., Johnson, L.K., Zeng, H., Scheett, A.J., Uthus, E.O., Schomburg, L., Hoeg, A., Hoefig, C.S., Davis, C.D., Milner, J.A., 2011. Determinants of Selenium Status in Healthy Adults. *Nutr J* 10 (1), 75.
- Cone, J.E., Del Río, R.M., Davis, J.N., Stadtman, T.C., 1976. Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase: identification of selenocysteine as the organoselenium moiety. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73 (8), 2659–2663.
- Cross, D.A.E., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., Hemmings, B.A., 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378 (6559), 785–789.
- Cusi, K., Maezono, K., Osman, A., Pendergrass, M., Patti, M.E., Pratipanawatr, T., DeFronzo, R.A., Kahn, C.R., Mandarino, L.J., 2000. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest* 105 (3), 311–320.
- Czernichow, S., Couthouis, A., Bertrais, S., Vergnaud, A.-C., 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), 395–399.
- 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), 642–649.
- Dan, H.C., Sun, M., Yang, L., Feldman, R.I., Sui, X.-M., Ou, C.C., Nellist, M., Yeung, R.S., Halley, D.J.J., Nicosia, S.V., Pledger, W.J., Cheng, J.Q., 2002. Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway Regulates Tuberous Sclerosis Tumor Suppressor Complex by Phosphorylation of Tuberin. *Journal of Biological Chemistry* 277 (38), 35364–35370.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., Greenberg, M.E., 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91 (2), 231–241.
- DeFronzo, R.A., 2009. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 58 (4), 773–795.

- DeFronzo, R.A., Gunnarsson, R., Bjorkman, O., Olsson, M., Wahren, J., 1985. Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J Clin Invest* 76 (1), 149–155.
- DeFronzo, R.A., Jacot, E., Jequier, E., Maeder, E., Wahren, J., Felber, J.P., 1981. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes* 30 (12), 1000–1007.
- Denu, J., Tanner, K., 2002. Redox regulation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: detecting sulfenic acid intermediates and examining reversible inactivation. *Methods Enzymol* 348, 297–305.
- Diamond, A.M., 2004. On the road to selenocysteine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (37), 13395–13396.
- Diamond-Stanic, M.K., Marchionne, E.M., Teachey, M.K., Durazo, D.E., Kim, J.S., Henriksen, E.J., 2011. Critical role of the transient activation of p38 MAPK in the etiology of skeletal muscle insulin resistance induced by low-level in vitro oxidant stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 405 (3), 439–444.
- Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F., Sherr, C.J., 1998. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes and Development* 12 (22), 3499–3511.
- Dioguardi, F.S., 2011. Clinical use of amino acids as dietary supplement: pros and cons. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2 (2), 75–80.
- Dong, F., Hua, Y., Zhao, P., Ren, J., Du, M., Sreejayan, N., 2009. Chromium supplement inhibits skeletal muscle atrophy in hindlimb-suspended mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 20 (12), 992–999.
- Dubé, N., Tremblay, M.L., 2005. Involvement of the small protein tyrosine phosphatases TC-PTP and PTP1B in signal transduction and diseases: From diabetes, obesity to cell cycle, and cancer. *Inhibitors of Protein Kinases (4th International Conference, Inhibitors of Protein Kinases) and Associated Workshop: Modelling of Specific Molecular Recognition Processes (Warsaw, Poland, June 25-29, 2005)*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1754 (1-2), 108–117.
- Dwivedi, S., Singh, N., Kumari, R., Mishra, J., Tripathi, S., Banerjee, P., Shah, P., Kukshal, V., Tyagi, A., Gaikwad, A., Chaturvedi, R., Mishra, D., Trivedi, A., Sanyal, S., Chattopadhyay, N., Ramachandran, R., Siddiqi, M., Bandyopadhyay, A., Arora, A., Lundasen, T., Anakk, S., Moore, D., Sanyal, S., 2011. Bile acid receptor agonist GW4064 regulates PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  expression through estrogen receptor-related receptor alpha. *Mol Endocrinol* 25 (6), 922–932.
- Eberle, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferre, P., Foulle, F., 2004. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86 (11), 839–848.
- Eckers, A., Klotz, L.-O., 2009. Heavy metal ion-induced insulin-mimetic signaling. *Redox Rep* 14 (4), 141–146.

- Erol, A., 2007. Insulin resistance is an evolutionarily conserved physiological mechanism at the cellular level for protection against increased oxidative stress. *Bioessays* 29 (8), 811–818.
- Espinosa, A., Garcia, A., Härtel, S., Hidalgo, C., Jaimovich, E., 2009. NADPH Oxidase and Hydrogen Peroxide Mediate Insulin-induced Calcium Increase in Skeletal Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry* 284 (4), 2568–2575.
- Ewart, H.S., Somwar, R., Klip, A., 1998. Dexamethasone stimulates the expression of GLUT1 and GLUT4 proteins via different signalling pathways in L6 skeletal muscle cells. *FEBS Lett* 425 (1), 179–183.
- Ezaki, O., 1990. The insulin-like effects of selenate in rat adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 265 (2), 1124–1128.
- Fairweather-Tait, S.J., Bao, Y., Broadley, M.R., Collings, R., Ford, D., Hesketh, J.E., Hurst, R., 2011. Selenium in Human Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling* 14 (7), 1337–1383.
- Fang, W., Goldberg, M., Pohl, N., Bi, X., Tong, C., Xiong, B., Koh, T., Diamond, A., Yang, W., 2010. Functional and physical interaction between the selenium-binding protein 1 (SBP1) and the glutathione peroxidase 1 selenoprotein. *Carcinogenesis* 31 (8), 1360–1366.
- Fang, X., Palanivel, R., Zhou, X., Liu, Y., Xu, A., Wang, Y., Sweeney, G., 2005. Hyperglycemia- and hyperinsulinemia-induced alteration of adiponectin receptor expression and adiponectin effects in L6-Myoblasts. *J Mol Endocrinol* 35 (3), 465–476.
- Fang, X., Yu, S.X., Lu, Y., Bast, R., Woodgett, J.R., Mills, G.B., 2000. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (22), 11960–11965.
- Farese, R., Sajan, M., Yang, H., Li, P., Mastorides, S., Gower, W., Nimal, S., Choi, C., Kim, S., Shulman, G., Kahn, C., Braun, U., Leitges, M., 2007. Muscle-specific knockout of PKC-lambda impairs glucose transport and induces metabolic and diabetic syndromes. *J Clin Invest* 117 (8), 2289–2301.
- Feng, J., Park, J., Cron, P., Hess, D., Hemmings, B., 2004. Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 279 (39), 41189–41196.
- Filomeni, G., Rotilio, G., Ciriolo, M.R., 2002. Cell signalling and the glutathione redox system. *Cell Signaling, Transcription and Translation as Therapeutic Targets. Biochemical Pharmacology* 64 (5-6), 1057–1064.
- Findeisen, H.M., Gizard, F., Zhao, Y., Qing, H., Jones, K.L., Cohn, D., Heywood, E.B., Bruemmer, D., 2011. Glutathione depletion prevents diet-induced obesity and enhances insulin sensitivity. *Obesity* 19 (12), 2429–2432.
- Finkel, T., 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol* 194 (1), 7–15.
- Fisher, A., 2009. Redox signaling across cell membranes. *Antioxid Redox Signal* 11 (6), 1349–1356.

- Flohé, L., Günzler, W.A., 1984. Assays of glutathione peroxidase, in: Lester Packer (Ed.), *Methods in Enzymology : Oxygen Radicals in Biological Systems*. Academic Press, pp. 114–120.
- Flohé, L., Loschen, G., Gunzler, W.A., Eichele, E., 1972. Glutathione peroxidase, V. The kinetic mechanism. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 353 (6), 987–999.
- Flohé, L., Gunzler, W.A., Schock, H.H., 1973. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett* 32 (1), 132–134.
- Fomenko, D., Gladyshev, V., 2002. CxxS: fold-independent redox motif revealed by genome-wide searches for thiol/disulfide oxidoreductase function. *Protein Sci* 11 (10), 2285–2296.
- Franke, T.F., Hornik, C.P., Segev, L., Shostak, G.A., Sugimoto, C., 2003. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 22 (56), 8983–8998.
- Frenkel, G., Falvey, D., MacVicar, C., 1991. Products of the reaction of selenite with intracellular sulfhydryl compounds. *Biological Trace Element Research* 30 (1), 9–18.
- Fürnsinn, C., Englisch, R., Ebner, K., Nowotny, P., Vogl, C., Waldhäusl, W., 1996. Insulin-like vs. non-insulin-like stimulation of glucose metabolism by vanadium, tungsten, and selenium compounds in rat muscle. *Life Sciences* 59 (23), 1989–2000.
- Fürnsinn, C., Leitner, G., Roden, M., Osterode, W., Waldhausl, W., 1995. Improved glucose tolerance by acute vanadate but not by selenate exposure in genetically obese rats (fa/fa). *Int J Obes Relat Metab Disord* 19 (7), 458–463.
- Ganther, H.E., Kraus, R.J., 1984. Oxidation states of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 107, 593–602.
- Ganyc, D., Self, W.T., 2008. High affinity selenium uptake in a keratinocyte model. *FEBS Letters* 582 (2), 299–304.
- Gauthier, M.-S., O'Brien, E., Bigornia, S., Mott, M., Cacicedo, J., Xu, X., Gokce, N., Apovian, C., Ruderman, N., 2011. Decreased AMP-activated protein kinase activity is associated with increased inflammation in visceral adipose tissue and with whole-body insulin resistance in morbidly obese humans. *Biochem Biophys Res Commun* 404 (1), 382–387.
- Girón, M., Sevillano, N., Vargas, A., Domínguez, J., Guinovart, J., Salto, R., 2008. The glucose-lowering agent sodium tungstate increases the levels and translocation of GLUT4 in L6 myotubes through a mechanism associated with ERK1/2 and MEF2D. *Diabetologia* 51 (7), 1285–1295.
- Goel, H.L., Dey, C.S., 2002. Insulin stimulates spreading of skeletal muscle cells involving the activation of focal adhesion kinase, phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal regulated kinases. *J. Cell. Physiol.* 193 (2), 187–198.
- Goldstein, B.J., Mahadev, K., Wu, X., Zhu, L., Motoshima, H., 2005. Role of Insulin-Induced Reactive Oxygen Species in the Insulin Signaling Pathway. *Antioxidants & Redox Signaling* 7 (7-8), 1021.
- Goldstein, I., Ezra, O., Rivlin, N., Molchadsky, A., Madar, S., Goldfinger, N., Rotter, V. p53, a novel regulator of lipid metabolism pathways. *Journal of Hepatology* 2011, article in press.

- Gomez-Cabrera, M.-C., Borrás, C., Pallardo, F., Sastre, J., Ji, L., Vina, J., 2005. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol* 567 (Pt 1), 113–120.
- Gomez-Cabrera, M.-C., Domenech, E., Romagnoli, M., Arduini, A., Borrás, C., Pallardo, F., Sastre, J., Vina, J., 2008. Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am J Clin Nutr* 87 (1), 142–149.
- Gonzalez, P.A., Claria, J., 2010. Resolution of adipose tissue inflammation. *ScientificWorldJournal* 10, 832–836.
- Goodyear, L.J., Giorgino, F., Sherman, L.A., Carey, J., Smith, R.J., Dohm, G.L., 1995. Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *J Clin Invest* 95 (5), 2195–2204.
- Gross, D.N., van, d., Birnbaum, M.J., 2008. The role of FoxO in the regulation of metabolism. *Oncogene* 27 (16), 2320–2336.
- Gu, Q.P., Ream, W., Whanger, P.D., 2002. Selenoprotein W gene regulation by selenium in L8 cells. *Biometals* 15 (4), 411–420.
- Gu, Q.P., Sun, Y., Ream, L.W., Whanger, P.D., 2000. Selenoprotein W accumulates primarily in primate skeletal muscle, heart, brain and tongue. *Mol. Cell. Biochem.* 204 (1-2), 49–56.
- Guan, L., Jiang, Q., Li, Z., Huang, F., Ren, Y., Yang, Y., Xu, C., 2009. The subcellular distribution of MnSOD alters during sodium selenite-induced apoptosis. *BMB Rep* 42 (6), 361–366.
- Hajdúch, E., Alessi, D.R., Hemmings, B.A., Hundal, H.S., 1998. Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells. *Diabetes* 47 (7), 1006–1013.
- Hakuno, F., Yamauchi, Y., Kaneko, G., Yoneyama, Y., Nakae, J., Chida, K., Kadowaki, T., Yamanouchi, K., Nishihara, M., Takahashi, S.-I., 2011. Constitutive expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 inhibits myogenic differentiation through nuclear exclusion of Foxo1 in L6-Myoblasts. *PLoS One* 6 (10), e25655.
- Hammarstedt, A., Jansson, P.A., Wesslau, C., Yang, X., Smith, U., 2003. Reduced expression of PGC-1 and insulin-signaling molecules in adipose tissue is associated with insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 301 (2), 578–582.
- Handayaningsih, A.-E., Iguchi, G., Fukuoka, H., Nishizawa, H., Takahashi, M., Yamamoto, M., Herningtyas, E.-H., Okimura, Y., Kaji, H., Chihara, K., Seino, S., Takahashi, Y., 2011. Reactive Oxygen Species Play an Essential Role in IGF-I Signaling and IGF-I-Induced Myocyte Hypertrophy in C2C12 Myocytes. *Endocrinology*, en.2010-0981.
- Hanley, A.J.G., Williams, K., Festa, A., Wagenknecht, L.E., D'Agostino, R.B., Kempf, J., Zinman, B., Haffner, S.M., 2004. Elevations in markers of liver injury and risk of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 53 (10), 2623–2632.

- Hardie, D.G., 2011. Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase. *The American Journal of Clinical Nutrition* 93 (4), 891S-896S.
- Hatfield, D.L., Carlson, B.A., Xu, X., Mix, H., Gladyshev, V.N., 2006. Selenocysteine Incorporation Machinery and the Role of Selenoproteins in Development and Health, in: Kivie Moldave (Ed.), *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology : Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. Academic Press, pp. 97–142.
- Hayes, G.R., Lockwood, D.H., 1987. Role of insulin receptor phosphorylation in the insulinomimetic effects of hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (22), 8115–8119.
- Hesketh, J., 2008. Nutrigenomics and selenium: gene expression patterns, physiological targets, and genetics. *Annu Rev Nutr* 28, 157–177.
- Higaki, Y., Mikami, T., Fujii, N., Hirshman, M.F., Koyama, K., Seino, T., Tanaka, K., Goodyear, L.J., 2008. Oxidative stress stimulates skeletal muscle glucose uptake through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 294 (5), E889-E897.
- Hill, K.E., Motley, A.K., Li, X., May, J.M., Burk, R.F., 2001. Combined selenium and vitamin E deficiency causes fatal myopathy in guinea pigs. *J Nutr* 131 (6), 1798–1802.
- Hill, K.E., Zhou, J., McMahan, W.J., Motley, A.K., Atkins, J.F., Gesteland, R.F., Burk, R.F., 2003. Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse. *J Biol Chem* 278 (16), 13640–13646
- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C.Z., Uysal, K.T., Maeda, K., Karin, M., Hotamisligil, G.S., 2002. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420 (6913), 333–336.
- Hoefig, C.S., Renko, K., Kohrle, J., Birringer, M., Schomburg, L., 2010. Comparison of different selenocompounds with respect to nutritional value vs. toxicity using liver cells in culture. *J Nutr Biochem*.
- Hoffmann, F.W., Hashimoto, A.C., Shafer, L.A., Dow, S., Berry, M.J., Hoffmann, P.R., 2010. Dietary selenium modulates activation and differentiation of CD4+ T cells in mice through a mechanism involving cellular free thiols. *J Nutr* 140 (6), 1155–1161.
- Hom, F.G., Goodner, C.J., 1984. Insulin dose-response characteristics among individual muscle and adipose tissues measured in the rat in vivo with  $^3\text{H}$ 2-deoxyglucose. *Diabetes* 33 (2), 153–159.
- Horovitz-Fried, M., Cooper, D.R., Patel, N.A., Cipok, M., Brand, C., Bak, A., Inbar, A., Jacob, A.I., Sampson, S.R., 2006. Insulin rapidly upregulates protein kinase Cdelta gene expression in skeletal muscle. *Cell Signal* 18 (2), 183–193.
- Houstis, N., Rosen, E., Lander, E., 2006. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440 (7086), 944–948.
- Hribal, M., Nakae, J., Kitamura, T., Shutter, J., Accili, D., 2003. Regulation of insulin-like growth factor-dependent myoblast differentiation by Foxo forkhead transcription factors. *J Cell Biol* 162 (4), 535–541.

- Huang, J., Manning, B.D., 2009. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans* 37 (Pt 1), 217–222.
- Huang, K.-C., Park, D., Ng, S.-K., Lee, J., Ni, X., Ng, W.-C., Bandera, C., Welch, W., Berkowitz, R., Mok, S., Ng, S.-W., 2006. Selenium binding protein 1 in ovarian cancer. *Int J Cancer* 118 (10), 2433–2440.
- Huber, R.E., Criddle, R.S., 1967. Comparison of the chemical properties of selenocysteine and selenocystine with their sulfur analogs. *Arch Biochem Biophys* 122 (1), 164–173.
- Hylemon, P., Zhou, H., Pandak, W., Ren, S., Gil, G., Dent, P., 2009. Bile acids as regulatory molecules. *J Lipid Res* 50 (8), 1509–1520.
- Ignarro, L.J., Cirino, G., Casini, A., Napoli, C., 1999. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 34 (6), 879–886.
- Im, S.S., Kwon, S.K., Kim, T.H., Kim, H.I., Ahn, Y.H., 2007. Regulation of glucose transporter type 4 isoform gene expression in muscle and adipocytes. *IUBMB Life* 59 (3), 134–145.
- Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes: Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. National Academy Press, Washington, DC, 2000
- Irrcher, I., Ljubicic, V., Hood, D., 2009. Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1 $\alpha$  transcription in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 296 (1), C116–23.
- Jackson, M., 2008. Free radicals generated by contracting muscle: by-products of metabolism or key regulators of muscle function? *Free Radic Biol Med* 44 (2), 132–141.
- Jensen, J., Brennesvik, E.O., Lai, Y.-C., Shepherd, P.R., 2007. GSK-3 $\beta$  regulation in skeletal muscles by adrenaline and insulin: Evidence that PKA and PKB regulate different pools of GSK-3. *Cellular Signalling* 19 (1), 204–210.
- Jeong, D.-w., Kim, T.S., Chung, Y.W., Lee, B.J., Kim, I.Y., 2002. Selenoprotein W is a glutathione-dependent antioxidant in vivo. *FEBS Letters* 517 (1-3), 225–228.
- Ji, L.L., 2008. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. *Free Radicals in Exercise. Free Radical Biology and Medicine* 44 (2), 142–152.
- Jiang, C., Wang, Z., Ganther, H., Lü, J., 2002. Distinct effects of methylseleninic acid versus selenite on apoptosis, cell cycle, and protein kinase pathways in DU145 human prostate cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 1 (12), 1059–1066.
- Johansson, L., Arscott, L., Ballou, D., Williams, C., Arner, E., 2006. Studies of an active site mutant of the selenoprotein thioredoxin reductase: the Ser-Cys-Cys-Ser motif of the insect orthologue is not sufficient to replace the Cys-Sec dyad in the mammalian enzyme. *Free Radic Biol Med* 41 (4), 649–656.
- Johansson, L., Gafvelin, G., Arnér, E.S.J., 2005. Selenocysteine in proteins—properties and biotechnological use. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1726 (1), 1–13.
- Jurynek, M.J., Xia, R., Mackrill, J.J., Gunther, D., Crawford, T., Flanigan, K.M., Abramson, J.J., Howard, M.T., Grunwald, D.J., 2008. Selenoprotein N is required for ryanodine

- receptor calcium release channel activity in human and zebrafish muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (34), 12485–12490.
- Kajander, E.O., Harvima, R.J., Eloranta, T.O., Martikainen, H., Kantola, M., Karenlampi, S.O., Akerman, K., 1991. Metabolism, cellular actions, and cytotoxicity of selenomethionine in cultured cells. *Biol Trace Elem Res* 28 (1), 57–68.
- Kamei, Y., Miura, S., Suzuki, M., Kai, Y., Mizukami, J., Taniguchi, T., Mochida, K., Hata, T., Matsuda, J., Aburatani, H., Nishino, I., Ezaki, O., 2004. Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *J Biol Chem* 279 (39), 41114–41123.
- Kars, M., Yang, L., Gregor, M., Mohammed, B., Pietka, T., Finck, B., Patterson, B., Horton, J., Mittendorfer, B., Hotamisligil, G., Klein, S., 2010. Tauroursodeoxycholic Acid may improve liver and muscle but not adipose tissue insulin sensitivity in obese men and women. *Diabetes* 59 (8), 1899–1905.
- Keller, A., Mohamed, A., Dräse, S., Brandt, U., Fleming, I., Brandes, R.P., 2004. Analysis of Dichlorodihydrofluorescein and Dihydrocalcein as Probes for the Detection of Intracellular Reactive Oxygen Species. *Free Radical Research* 38 (12), 1257–1267.
- Kelley, D., He, J., Menshikova, E., Ritov, V., 2002. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51 (10), 2944–2950
- Kiermayer, C., Michalke, B., Schmidt, J., Brielmeier, M., 2007. Effect of selenium on thioredoxin reductase activity in Txnrd1 or Txnrd2 hemizygous mice. *Biological Chemistry* 388 (10), 1091–1097.
- Kim, J.-H., Jeong, I.-Y., Lim, Y., Lee, Y.H., Shin, S.Y., 2011a. Estrogen receptor B stimulates Egr-1 transcription via MEK1/Erk/Elk-1 cascade in C6 glioma cells. *BMB Rep* 44 (7), 452–457.
- Kim, S.H., Johnson, V.J., Shin, T.-Y., Sharma, R.P., 2004. Selenium Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Oxidative Stress Responses Through Modulation of p38 MAPK and NFkB Signaling Pathways. *Exp. Biol. Med.* 229 (2), 203–213.
- Kim, S.-J., Nian, C., McIntosh, C., 2010. GIP increases human adipocyte LPL expression through CREB and TORC2-mediated trans-activation of the LPL gene. *J Lipid Res* 51 (11), 3145–3157.
- Kim, T.H., Choi, S.E., Ha, E.S., Jung, J.G., Han, S.J., Kim, H.J., Kim, D.J., Kang, Y., Lee, K.W., 2011b. IL-6 induction of TLR-4 gene expression via STAT3 has an effect on insulin resistance in human skeletal muscle. *Acta Diabetol.* Ahead of print.
- Kim, Y.-B., Kotani, K., Ciaraldi, T., Henry, R., Kahn, B., 2003. Insulin-stimulated protein kinase C lambda/zeta activity is reduced in skeletal muscle of humans with obesity and type 2 diabetes: reversal with weight reduction. *Diabetes* 52 (8), 1935–1942.
- Kim, Y.B., Nikoulina, S.E., Ciaraldi, T.P., Henry, R.R., Kahn, B.B., 1999. Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 104 (6), 733–741.

- Kim, Y.-J., Chai, Y.-G., Ryu, J.-C., 2005. Selenoprotein W as molecular target of methylmercury in human neuronal cells is down-regulated by GSH depletion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 330 (4), 1095–1102.
- Kitamura, T., Kitamura, Y.I., 2007. A Foxo/Notch pathway controls myogenic differentiation and fiber type specification. *J Clin Invest* 117 (9), 2477–2485.
- Klaus, V., Hartmann, T., Gambini, J., Graf, P., Stahl, W., Hartwig, A., Klotz, L.-O., 2010. 1,4-Naphthoquinones as inducers of oxidative damage and stress signaling in HaCaT human keratinocytes. *Arch Biochem Biophys* 496 (2), 93–100.
- Klip, A., 2009. The many ways to regulate glucose transporter 4. *Appl Physiol Nutr Metab* 34 (3), 481–487.
- Kloet, D.E.A., Burgering, B.M.T., 2011. The PKB/FOXO switch in aging and cancer. PI3K-AKT-FoxO axis in Cancer and Aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813 (11), 1926–1937.
- Knight, J.A., 1997. Reactive oxygen species and the neurodegenerative disorders. *Ann Clin Lab Sci* 27 (1), 11–25.
- Koehle, J., 2005. Selenium and the control of thyroid hormone metabolism. *Thyroid* 15 (8), 841–853.
- Koch, L.G., Britton, S.L., 2001. Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. *Physiological Genomics* 5 (1), 45–52.
- Kono, T., Robinson, F.W., Blevins, T.L., Ezaki, O., 1982. Evidence that translocation of the glucose transport activity is the major mechanism of insulin action on glucose transport in fat cells. *Journal of Biological Chemistry* 257 (18), 10942–10947.
- Kortylewski, M., Feld, F., Kruger, K.-D., Bahrenberg, G., Roth, R., Joost, H.-G., Heinrich, P., Behrmann, I., Barthel, A., 2003. Akt modulates STAT3-mediated gene expression through a FKHR (FOXO1a)-dependent mechanism. *J Biol Chem* 278 (7), 5242–5249.
- Kraegen, E., James, D., Storlien, L., Burleigh, K., Chisholm, D., 1986. In vivo insulin resistance in individual peripheral tissues of the high fat fed rat: assessment by euglycaemic clamp plus deoxyglucose administration. *Diabetologia* 29 (3), 192–198.
- Krieger-Brauer, H.I., Kather, H., 1995. The stimulus-sensitive H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating system present in human fat-cell plasma membranes is multireceptor-linked and under antagonistic control by hormones and cytokines. *Biochem J* 307 (Pt 2), 543–548.
- Kristiansen, S., Hargreaves, M., Richter, E.A., 1996. Exercise-induced increase in glucose transport, GLUT-4, and VAMP-2 in plasma membrane from human muscle. *Am J Physiol* 270 (1 Pt 1), E197–201.
- Krook, A., Roth, R.A., Jiang, X.J., Zierath, J.R., Wallberg-Henriksson, H., 1998. Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. *Diabetes* 47 (8), 1281–1286.
- Kryukov, G., Castellano, S., Novoselov, S., Lobanov, A., Zehtab, O., Guigo, R., Gladyshev, V., 2003. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 300 (5624), 1439–1443.

- Kusari, A.B., Byon, J., Bandyopadhyay, D., Kenner, K.A., Kusari, J., 1997. Insulin-Induced Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Phosphatase-1 (MKP-1) Attenuates Insulin-Stimulated MAP Kinase Activity: A Mechanism for the Feedback Inhibition of Insulin Signaling. *Molecular Endocrinology* 11 (10), 1532–1543.
- Kwon, J., Lee, S.-R., Yang, K.-S., Ahn, Y., Kim, Y., Stadtman, E., Rhee, S., 2004. Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (47), 16419–16424.
- Labunskyy, V., Lee, B., Handy, D., Loscalzo, J., Hatfield, D., Gladyshev, V., 2011. Both maximal expression of selenoproteins and selenoprotein deficiency can promote development of type 2 diabetes-like phenotype in mice. *Antioxid Redox Signal* 14 (12), 2327–2336.
- Lee, H.-C., Wei, Y.-H., 2007. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med (Maywood)* 232 (5), 592–606.
- Lee, S.-R., Kwon, K.-S., Kim, S.-R., Rhee, S.G., 1998. Reversible Inactivation of Protein-tyrosine Phosphatase 1B in A431 Cells Stimulated with Epidermal Growth Factor. *Journal of Biological Chemistry* 273 (25), 15366–15372.
- Lee, S.-R., Yang, K.-S., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W., Rhee, S.G., 2002. Reversible Inactivation of the Tumor Suppressor PTEN by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Journal of Biological Chemistry* 277 (23), 20336–20342.
- Lei, X.G., Dann, H.M., Ross, D.A., Cheng, W.H., Combs, G.F., Roneker, K.R., 1998. Dietary selenium supplementation is required to support full expression of three selenium-dependent glutathione peroxidases in various tissues of weanling pigs. *J Nutr* 128 (1), 130–135.
- Lei, X.G., Vatamaniuk, M.Z., 2010. Two Tales of Antioxidant Enzymes on beta Cells and Diabetes. *Antioxid Redox Signal*. 14(3) 489-503
- Leney, S.E., Tavaré, J.M., 2009. The molecular basis of insulin-stimulated glucose uptake: signalling, trafficking and potential drug targets. *Journal of Endocrinology* 203 (1), 1–18.
- Leng, Y., Steiler, T., Zierath, J., 2004. Effects of insulin, contraction, and phorbol esters on mitogen-activated protein kinase signaling in skeletal muscle from lean and ob/ob mice. *Diabetes* 53 (6), 1436–1444.
- Lescure, A., Gautheret, D., Carbon, P., Krol, A., 1999. Novel selenoproteins identified in silico and in vivo by using a conserved RNA structural motif. *J Biol Chem* 274 (53), 38147–38154.
- Lescure, A., Rederstorff, M., Krol, A., Guicheney, P., Allamand, V., 2009. Selenoprotein function and muscle disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790 (11), 1569–1574.
- Leslie, N.R., 2006. The Redox Regulation of PI 3-Kinase “Dependent Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling* 8 (9-10), 1765–1774.
- Letsiou, S., Lu, Y., Nomikos, T., Antonopoulou, S., Panagiotakos, D., Pitsavos, C., Stefanadis, C., Pergantis, S., 2010. High-throughput quantification of selenium in

- individual serum proteins from a healthy human population using HPLC on-line with isotope dilution inductively coupled plasma-MS. *Proteomics* 10 (19), 3447–3457.
- Li, G.-X., Hu, H., Jiang, C., Schuster, T., Lu, J., 2007. Differential involvement of reactive oxygen species in apoptosis induced by two classes of selenium compounds in human prostate cancer cells. *Int J Cancer* 120 (9), 2034–2043.
- Liang, H., Ward, W.F., 2006. PGC-1 $\alpha$ : a key regulator of energy metabolism. *Advances in Physiology Education* 30 (4), 145–151.
- Liou, G.-Y., Storz, P., 2010. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* 44 (5), 479–496.
- Lippman, S.M., Klein, E.A., Goodman, P.J., Lucia, M.S., Thompson, I.M., Ford, L.G., Parnes, H.L., Minasian, L.M., Gaziano, J.M., Hartline, J.A., Parsons, J.K., Bearden, J.D., III, Crawford, E.D., Goodman, G.E., Claudio, J., Winquist, E., Cook, E.D., Karp, D.D., Walther, P., Lieber, M.M., Kristal, A.R., Darke, A.K., Arnold, K.B., Ganz, P.A., Santella, R.M., Albanes, D., Taylor, P.R., Probstfield, J.L., Jagpal, T.J., Crowley, J.J., Meyskens, F.L., JR, Baker, L.H., Coltman, C.A., JR, 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, Z., Cao, W., 2009. p38 mitogen-activated protein kinase: a critical node linking insulin resistance and cardiovascular diseases in type 2 diabetes mellitus. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 9 (1), 38–46.
- Livingston, J.N., Gurny, P.A., Lockwood, D.H., 1977. Insulin-like effects of polyamines in fat cells. Mediation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation. *J Biol Chem* 252 (2), 560–562.
- Lobanov, A., Fomenko, D., Zhang, Y., Sengupta, A., Hatfield, D., Gladyshev, V., 2007. Evolutionary dynamics of eukaryotic selenoproteomes: large selenoproteomes may associate with aquatic life and small with terrestrial life. *Genome Biology* 8 (9), R198.
- Loflin, J., Lopez, N., Whanger, P.D., Kioussi, C., 2006. Selenoprotein W during development and oxidative stress. *Journal of Inorganic Biochemistry* 100 (10), 1679–1684.
- Loh, K., Deng, H., Fukushima, A., Cai, X., Boivin, B., Galic, S., Bruce, C., Shields, B.J., Skiba, B., Ooms, L.M., Stepto, N., Wu, B., Mitchell, C.A., Tonks, N.K., Watt, M.J., Febbraio, M.A., Crack, P.J., Andrikopoulos, S., Tiganis, T., 2009. Reactive Oxygen Species Enhance Insulin Sensitivity. *Cell Metabolism* 10 (4), 260–272.
- Lopez, V., Saraff, K., Medh, J.D., 2009. Down-regulation of lipoprotein lipase increases glucose uptake in L6 muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 389 (1), 34–39.
- Low, S.C., Berry, M.J., 1996. Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 21 (6), 203–208.
- Lu, J., Berndt, C., Holmgren, A., 2009. Metabolism of selenium compounds catalyzed by the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase. Special Issue: Selenoprotein Expression and Function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790 (11), 1513–1519.

- Luo, H., Yang, Y., Huang, F., Li, F., Jiang, Q., Shi, K., Xu, C., 2012. Selenite induces apoptosis in colorectal cancer cells via AKT-mediated inhibition of  $\beta$ -catenin survival axis. *Cancer Letters* 315 (1), 78–85.
- Maarbjerg, S.J., Sylow, L., Richter, E.A., 2011. Current understanding of increased insulin sensitivity after exercise - emerging candidates. *Acta Physiol (Oxf)* 202 (3), 323–335.
- Mahadev, K., Motoshima, H., Wu, X., Ruddy, J.M., Arnold, R.S., Cheng, G., Lambeth, J.D., Goldstein, B.J., 2004. The NAD(P)H Oxidase Homolog Nox4 Modulates Insulin-Stimulated Generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Plays an Integral Role in Insulin Signal Transduction. *Molecular and Cellular Biology* 24 (5), 1844–1854.
- Mahadev, K., Wu, X., Zilbering, A., Zhu, L., Lawrence, J.T., Goldstein, B.J., 2001a. Hydrogen peroxide generated during cellular insulin stimulation is integral to activation of the distal insulin signaling cascade in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 276 (52), 48662–48669.
- Mahadev, K., Zilbering, A., Zhu, L., Goldstein, B.J., 2001b. Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. *J Biol Chem* 276 (24), 21938–21942.
- Malinska, D., Kudin, A.P., Bejtka, M., Kunz, W.S. Changes in mitochondrial reactive oxygen species synthesis during differentiation of skeletal muscle cells. *Mitochondrion In Press*, Corrected Proof.
- Manning, B., Cantley, L., 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129 (7), 1261–1274.
- Mantel, C., Messina-Graham, S., Broxmeyer, H., 2011. Superoxide flashes, reactive oxygen species, and the mitochondrial permeability transition pore: potential implications for hematopoietic stem cell function. *Curr Opin Hematol* 18 (4), 208–213.
- Martin-Romero, F.J., Kryukov, G.V., Lobanov, A.V., Carlson, B.A., Lee, B.J., Gladyshev, V.N., Hatfield, D.L., 2001. Selenium metabolism in *Drosophila*: selenoproteins, selenoprotein mRNA expression, fertility, and mortality. *J Biol Chem* 276 (32), 29798–29804.
- Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F., Turner, R.C., 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28 (7), 412–419.
- May, J.M., de Haën, C., 1979. Insulin-stimulated intracellular hydrogen peroxide production in rat epididymal fat cells. *Journal of Biological Chemistry* 254 (7), 2214–2220.
- May, J.M., de Haën C., 1979b. The insulin-like effect of hydrogen peroxide on pathways of lipid synthesis in rat adipocytes. *J Biol Chem* 254 (18), 9017–9021.
- McCann, J., Ames, B., 2011. Adaptive dysfunction of selenoproteins from the perspective of the triage theory: why modest selenium deficiency may increase risk of diseases of aging. *FASEB J* 25 (6), 1793–1814.
- McClung, J.P., Roneker, C.A., Mu, W., Lisk, D.J., Langlais, P., Liu, F., Lei, X.G., 2004. Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione

- peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (24), 8852–8857.
- McNeill, J.H., Delgatty, H.L., Battell, M.L., 1991. Insulinlike effects of sodium selenate in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 40 (12), 1675–1678.
- Meyts, P. de, 2008. The insulin receptor: a prototype for dimeric, allosteric membrane receptors? *Trends Biochem Sci* 33 (8), 376–384.
- Miao, L., St. Clair, D.K., 2009. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med* 47 (4), 344–356.
- Mihaylova, M., Shaw, R., 2011. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol* 13 (9), 1016–1023.
- Misu, H., Takamura, T., Takayama, H., Hayashi, H., Matsuzawa-Nagata, N., Kurita, S., Ishikura, K., Ando, H., Takeshita, Y., Ota, T., Sakurai, M., Yamashita, T., Mizukoshi, E., Yamashita, T., Honda, M., Miyamoto, K., Kubota, T., Kubota, N., Kadowaki, T., Kim, H.J., Lee, I.K., Minokoshi, Y., Saito, Y., Takahashi, K., Yamada, Y., Takakura, N., Kaneko, S., 2010. A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metab* 12 (5), 483–495.
- Moore, M., Cherrington, A., Wasserman, D., 2003. Regulation of hepatic and peripheral glucose disposal. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 17 (3), 343–364.
- Mootha, V., Lindgren, C., Eriksson, K.-F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstrale, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M., Patterson, N., Mesirov, J., Golub, T., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E., Hirschhorn, J., Altshuler, D., Groop, L., 2003. PGC-1 $\alpha$ -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34 (3), 267–273.
- Moustafa, M.E., Carlson, B.A., El-Saadani, M.A., Kryukov, G.V., Sun, Q.A., Harney, J.W., Hill, K.E., Combs, G.F., Feigenbaum, L., Mansur, D.B., Burk, R.F., Berry, M.J., Diamond, A.M., Lee, B.J., Gladyshev, V.N., Hatfield, D.L., 2001. Selective inhibition of selenocysteine tRNA maturation and selenoprotein synthesis in transgenic mice expressing isopentenyladenosine-deficient selenocysteine tRNA. *Mol Cell Biol* 21 (11), 3840–3852.
- Moylan, J.S., Smith, J.D., Chambers, M.A., McLoughlin, T.J., Reid, M.B., 2008. TNF induction of atrogin-1/MAFbx mRNA depends on Foxo4 expression but not AKT-Foxo1/3 signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* 295 (4), C986–993.
- Mueller, A.S., Bosse, A.C., Most, E., Klomann, S.D., Schneider, S., Pallauf, J., 2009a. Regulation of the insulin antagonistic protein tyrosine phosphatase 1B by dietary Se studied in growing rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 20 (4), 235–247.
- Mueller, A.S., Klomann, S.D., Wolf, N.M., Schneider, S., Schmidt, R., Spielmann, J., Stangl, G., Eder, K., Pallauf, J., 2008. Redox Regulation of Protein Tyrosine Phosphatase 1B by Manipulation of Dietary Selenium Affects the Triglyceride Concentration in Rat Liver. *J. Nutr.* 138 (12), 2328–2336.
- Mueller, A.S., Mueller, K., Wolf, N.M., Pallauf, J., 2009b. Selenium and diabetes: an enigma? *Free Radic. Res.*, 1–31.

- Mueller, A.S., 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), 548–560.
- Müller, C., Wingler, K., Brigelius-Flohé, R., 2003. 3'UTRs of glutathione peroxidases differentially affect selenium-dependent mRNA stability and selenocysteine incorporation efficiency. *Biol. Chem.* 384 (1), 11–18.
- Nadeau, K., Leitner, J., Gurerich, I., Draznin, B., 2004. Insulin regulation of sterol regulatory element-binding protein-1 expression in L-6 muscle cells and 3T3 L1 adipocytes. *J Biol Chem* 279 (33), 34380–34387.
- Nascimento, E.B.M., Ouwens, D.M., 2009. PRAS40: Target or modulator of mTORC1 signalling and insulin action? *Archives of Physiology and Biochemistry. Archives of Physiology and Biochemistry* 115 (4), 163–175.
- Nasr, M.A., Fedele, M.J., Esser, K., Diamond, A.M., 2004. GPx-1 modulates Akt und P70S6K phosphorylation und Gadd45 levels in MCF-7 cells. *Free Radic. Biol. Med.* 37 (2), 187–195.
- Nauser, T., Dockheer, S., Kissner, R., Koppenol, W.H., 2006. Catalysis of Electron Transfer by Selenocysteine†. *Biochemistry. Biochemistry* 45 (19), 6038–6043.
- Navarro-Alarcon, M., Cabrera-Vique, C., 2008. Selenium in food und the human body: A review. *Science of The Total Environment* 400 (1-3), 115–141.
- Navas Acien, A., Bleys, J., Guallar, E., 2008. Selenium intake und cardiovascular risk: what is new? *Current Opinion in Lipidology* 19 (1), 43–49.
- Noh, O., Park, Y., Chung, Y., Kim, I., 2010. Transcriptional regulation of selenoprotein W by MyoD during early skeletal muscle differentiation. *J Biol Chem* 285 (52), 40496–40507.
- Nuttall, K., 2006. Evaluating selenium poisoning. *Ann Clin Lab Sci* 36 (4), 409–420.
- Ogg, S., Ruvkun, G., 1998. The *C. elegans* PTEN homolog, DAF-18, acts in the insulin receptor-like metabolic signaling pathway. *Mol Cell* 2 (6), 887–893.
- Oster, O., Schmiedel, G., Prellwitz, W., 1988. The organ distribution of selenium in German adults. *Biol Trace Elem Res* 15, 23–45.
- Pagel-Langenickel, I., Bao, J., Joseph, J., Schwartz, D., Mantell, B., Xu, X., Raghavachari, N., Sack, M., 2008. PGC-1 $\alpha$  integrates insulin signaling, mitochondrial regulation, and bioenergetic function in skeletal muscle. *J Biol Chem* 283 (33), 22464–22472.
- Papp, L.V., Lu, J., Holmgren, A., Khanna, K.K., 2007. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal* 9 (7), 775–806.
- Park, J.-M., Kim, A., Oh, J.-H., Chung, A.-S., 2007. Methylseleninic acid inhibits PMA-stimulated pro-MMP-2 activation mediated by MT1-MMP expression and further tumor invasion through suppression of NF-kappaB activation. *Carcinogenesis* 28 (4), 837–847.
- Parsons, J.T., Martin, K.H., Slack, J.K., Taylor, J.M., Weed, S.A., 2000. Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* 19 (49), 5606–5613.

- Pardo, P.S., Mohamed, J.S., Lopez, M.A., Boriek, A.M., 2011. Induction of Sirt1 by mechanical stretch of skeletal muscle through the early response factor EGR1 triggers an antioxidative response. *J Biol Chem* 286 (4), 2559–2566.
- Patterson, J., Lei, X., Miller, D., 2008. The pig as an experimental model for elucidating the mechanisms governing dietary influence on mineral absorption. *Exp Biol Med (Maywood)* 233 (6), 651–664.
- Patti, M., Butte, A., Crunkhorn, S., Cusi, K., Berria, R., Kashyap, S., Miyazaki, Y., Kohane, I., Costello, M., Saccone, R., Landaker, E., Goldfine, A., Mun, E., DeFronzo, R., Finlayson, J., Kahn, C., Mandarino, L., 2003. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (14), 8466–8471.
- Pepper, M.P., Vatamaniuk, M.Z., Yan, X., Roneker, C.A., Lei, X.G., 2010. Impacts of Dietary Selenium Deficiency on Metabolic Phenotypes of Diet-Restricted GPX1-Overexpressing Mice. *Antioxidants & Redox Signaling*.
- Pereira, M.J., Carvalho, E., Eriksson, J.W., Crans, D.C., Aureliano, M., 2009. Effects of decavanadate and insulin enhancing vanadium compounds on glucose uptake in isolated rat adipocytes. *Journal of Inorganic Biochemistry* 103 (12), 1687–1692.
- Peshavariya, H.M., Dusting, G.J., Selemidis, S., 2007. Analysis of dihydroethidium fluorescence for the detection of intracellular and extracellular superoxide produced by NADPH oxidase. *Free Radical Research* 41 (6), 699–712.
- Petit, N., Lescure, A., Rederstorff, M., Krol, A., Moghadaszadeh, B., Wewer, U., Guicheney, P., 2003. Selenoprotein N: an endoplasmic reticulum glycoprotein with an early developmental expression pattern. *Hum Mol Genet* 12 (9), 1045–1053.
- Pinto, A., Speckmann, B., Heisler, M., Sies, H., Steinbrenner, H., 2011. Delaying of insulin signal transduction in skeletal muscle cells by selenium compounds. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105 (6). 812-20
- Plano, D., Ibanez, E., Calvo, A., Palop, J., Sanmartin, C., 2011. Novel library of selenocompounds as kinase modulators. *Molecules* 16 (8), 6349–6364.
- Pond, W.G., Mersmann, H.J., 2001. *Biology of the domestic pig*. Comstock Pub. Associates, Cornell University Press, Ithaca, N.Y, vii, 745.
- Powers, S.K., Talbert, E.E., Adhietty, P.J., 2011. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *Journal of Physiology* 589 (9), 2129–2138.
- Puig, O., Marr, M., Ruhf, M., Tjian, R., 2003. Control of cell number by Drosophila FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. *Genes Dev* 17 (16), 2006–2020.
- Puig, O., Tjian, R., 2005. Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1. *Genes Dev* 19 (20), 2435–2446.
- Raines, A., Sunde, R., 2011. Selenium toxicity but not deficient or super-nutritional selenium status vastly alters the transcriptome in rodents. *BMC Genomics* 12, 26.

- Ramadan, W., Marsili, A., Huang, S., Larsen, P.R., Silva, J.E., 2011. Type-2 iodothyronine 5'deiodinase in skeletal muscle of C57BL/6 mice. I. Identity, subcellular localization, and characterization. *Endocrinology* 152 (8), 3082–3092.
- Rayasam, G.V., Tulasi, V.K., Sodhi, R., Davis, J.A., Ray, A., 2009. Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. *Br J Pharmacol* 156 (6), 885–898.
- Rayman, M.P., 2008. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. *Br J Nutr* 100 (2), 254–268.
- Rayman, M.P., Infante, H.G., Sargent, M., 2008. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. *Br J Nutr* 100 (2), 238–253.
- Reaven, G.M., 1995. Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiological Reviews* 75 (3), 473–486.
- Reeves, M.A., Hoffmann, P.R., 2009. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cell Mol Life Sci* 66 (15), 2457–2478.
- Reyna, S., Ghosh, S., Tantiwong, P., Meka, C., Eagan, P., Jenkinson, C., Cersosimo, E., Defronzo, R., Coletta, D., Sriwijitkamol, A., Musi, N., 2008. Elevated toll-like receptor 4 expression and signaling in muscle from insulin-resistant subjects. *Diabetes* 57 (10), 2595–2602.
- Richard, A.J., Stephens, J.M., 2011. Emerging roles of JAK–STAT signaling pathways in adipocytes. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 22 (8), 325–332.
- Rigobello, M.P., Folda, A., Citta, A., Scutari, G., Gandin, V., Fernandes, A.P., Rundlöf, A.-K., Marzano, C., Björnstedt, M., Bindoli, A., 2011. Interaction of selenite and tellurite with thiol-dependent redox enzymes: Kinetics and mitochondrial implications. *Free Radical Biology and Medicine* 50 (11), 1620–1629.
- Rigoulet, M., Yoboue, E.D., Devin, A., 2011. Mitochondrial ROS Generation and Its Regulation: Mechanisms Involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling* 14 (3), 459–468.
- Ristow, M., Zarse, K., Oberbach, A., Klötting, N., Birringer, M., Kiehntopf, M., Stumvoll, M., Kahn, C.R., Bläher, M., 2009. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (21), 8665–8670.
- RKI-Kommission., 2006. Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin: Selen in der Umweltmedizin. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitschutz* 49: 88–102. online verfügbar: [www.apug.de/archiv/pdf/Selen-BGBl-012006](http://www.apug.de/archiv/pdf/Selen-BGBl-012006)
- Roman, M., Lapolla, A., Jitaru, P., Sechi, A., Cosma, C., Cozzi, G., Cescon, P., Barbante, C., 2010. Plasma selenoproteins concentrations in type 2 diabetes mellitus—a pilot study. *Transl Res* 156 (4), 242–250.
- Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G., Hoekstra, W.G., 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179 (73), 588–590.
- Ryder, J.W., Yang, J., Galuska, D., Rincon, J., Bjornholm, M., Krook, A., Lund, S., Pedersen, O., Wallberg-Henriksson, H., Zierath, J.R., Holman, G.D., 2000. Use of a novel

- impermeable biotinylated photolabeling reagent to assess insulin- and hypoxia-stimulated cell surface GLUT4 content in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes* 49 (4), 647–654.
- Saito, Y., Yoshida, Y., Akazawa, T., Takahashi, K., Niki, E., 2003. Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. *J Biol Chem* 278 (41), 39428–39434.
- Sandri, M., Lin, J., Handschin, C., Yang, W., Arany, Z., Lecker, S., Goldberg, A., Spiegelman, B., 2006. PGC-1 $\alpha$  protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (44), 16260–16265.
- Sanil, M. Study of the relationship between selenium, diabetes and cardiovascular risk using the pig model, Guildford (2010).
- Sano, H., Kane, S., Sano, E., Mîinea, C.P., Asara, J.M., Lane, W.S., Garner, C.W., Lienhard, G.E., 2003. Insulin-stimulated Phosphorylation of a Rab GTPase-activating Protein Regulates GLUT4 Translocation. *Journal of Biological Chemistry* 278 (17), 14599–14602.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D., Ali, S., Sabatini, D., 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307 (5712), 1098–1101.
- Scheepers, A., Joost, H.-G., Schurmann, A., 2004. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 28 (5), 364–371.
- Schoenmakers, E., Agostini, M., Mitchell, C., Schoenmakers, N., Papp, L., Rajanayagam, O., Padidela, R., Ceron-Gutierrez, L., Doffinger, R., Prevosto, C., Luan, J., Montano, S., Lu, J., Castanet, M., Clemons, N., Groeneveld, M., Castets, P., Karbaschi, M., Aitken, S., Dixon, A., Williams, J., Campi, I., Blount, M., Burton, H., Muntoni, F., O'Donovan, D., Dean, A., Warren, A., Brierley, C., Baguley, D., Guicheney, P., Fitzgerald, R., Coles, A., Gaston, H., Todd, P., Holmgren, A., Khanna, K., Cooke, M., Semple, R., Halsall, D., Wareham, N., Schwabe, J., Grasso, L., Beck-Peccoz, P., Ogunko, A., Dattani, M., Gurnell, M., Chatterjee, K., 2010. Mutations in the selenocysteine insertion sequence-binding protein 2 gene lead to a multisystem selenoprotein deficiency disorder in humans. *J Clin Invest* 120 (12), 4220–4235.
- Schomburg, L., Schweizer, U., Holtmann, B., Flohe, L., Sendtner, M., Kohrle, J., 2003. Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *Biochem J* 370 (Pt 2), 397–402.
- Schrauzer, G.N., 2000. Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *J Nutr* 130 (7), 1653–1656.
- Schrauzer, G.N., 2001. Nutritional selenium supplements: product types, quality, and safety. *J Am Coll Nutr* 20 (1), 1–4.
- Schrauzer, G.N., Surai, P.F., 2009. Selenium in human and animal nutrition: Resolved and unresolved issues. A partly historical treatise in commemoration of the fiftieth anniversary of the discovery of the biological essentiality of selenium, dedicated to the memory of

- Klaus Schwarz (1914–1978) on the occasion of the thirtieth anniversary of his death. *Critical Reviews in Biotechnology* 29 (1), 2–9.
- Schubert, J.R., Muth, O.H., Oldfield, J.E., Remmert, L.F., 1961. Experimental results with selenium in white muscle disease of lambs and calves. *Fed Proc* 20, 689–694.
- Schwarz, K., Foltz, C.M., 1957. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *Journal of the American Chemical Society. J. Am. Chem. Soc* 79 (12), 3292–3293.
- Sharples, A., Stewart, C., 2011. Myoblast models of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14 (3), 230–236.
- Sheehan, T.M., Gao, M., 1990. Simplified fluorometric assay of total selenium in plasma and urine. *Clin Chem* 36 (12), 2124–2126.
- Shen, H.-M., Liu, Z.-g., 2006. JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med* 40 (6), 928–939.
- Shen, H.-M., Yang, C.-F., Ding, W.-X., Liu, J., Ong, C.-N., 2001. Superoxide radical-initiated apoptotic signalling pathway in selenite-treated HepG2 cells: mitochondria serve as the main target. *Free Radical Biology and Medicine* 30 (1), 9–21.
- Shepherd, P.R., Kahn, B.B., 1999. Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med* 341 (4), 248–257.
- Shilo, S., Aharoni-Simon, M., Tirosh, O., 2005. Selenium attenuates expression of MnSOD and uncoupling protein 2 in J774.2 macrophages: molecular mechanism for its cell-death and antiinflammatory activity. *Antioxid Redox Signal* 7 (1-2), 276–286.
- Shilo, S., Aronis, A., Komarnitsky, R., Tirosh, O., 2003. Selenite sensitizes mitochondrial permeability transition pore opening in vitro and in vivo: a possible mechanism for chemo-protection. *Biochem. J.* 370 (Pt 1), 283–290.
- Sies, H., 1986. Biochemistry of Oxidative Stress. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25, 1058–1071.
- Sies, H., 1991. Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Oxidants And Antioxidants: Pathophysiologic Determinants and Therapeutic Agents. The American Journal of Medicine* 91 (3, Supplement 3), S31.
- Sies, H., 1993. Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. *Free Radic Biol Med* 14 (3), 313–323.
- Sies, H.; Jones, D. 2007 Oxidative Stress. *Encyclopedia of Stress. Vol. 3*, 45–48.
- Sies, H., Sharov, V.S., Klotz, L.O., Briviba, K., 1997. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J Biol Chem* 272 (44), 27812–27817
- Sies, H., Stahl, W., Sevanian, A., 2005. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr* 135 (5), 969–972.
- Siddle, K., 2011. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *J Mol Endocrinol* 47 (1), R1–10.
- Solinas, G., Karin, M., 2010. JNK1 and IKK $\beta$ : molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB J.* 24 (8), 2596–2611.

- Speckmann, B., Sies, H., Steinbrenner, H., 2009. Attenuation of hepatic expression and secretion of selenoprotein P by metformin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387 (1), 158–163.
- Speckmann, B., Walter, P.L., Alili, L., Reinehr, R., Sies, H., Klotz, L.-O., Steinbrenner, H., 2008. Selenoprotein P expression is controlled through interaction of the coactivator PGC-1 $\alpha$  with FoxO1a and hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  transcription factors. *Hepatology* 48 (6), 1998–2006.
- Steinberg, G.R., Rush, J.W., Dyck, D.J., 2003. AMPK expression and phosphorylation are increased in rodent muscle after chronic leptin treatment. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284 (3), E648–54.
- Steinbrenner, H., Alili, L., Bilgic, E., Sies, H., Brenneisen, P., 2006. Involvement of selenoprotein P in protection of human astrocytes from oxidative damage. *Free Radical Biology and Medicine* 40 (9), 1513–1523
- Steinbrenner, H., Sies, H., 2009. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790, 1478–1485.
- Steinbrenner, H., Speckmann, B., Pinto, A., Sies, H., 2011. High selenium intake and increased diabetes risk: experimental evidence for interplay between selenium and carbohydrate metabolism. *J Clin Biochem Nutr* 48 (1), 40–45.
- Steinmann, D., Nauser, T., Koppenol, W.H., 2010. Selenium and Sulfur in Exchange Reactions: A Comparative Study. *The Journal of Organic Chemistry. J. Org. Chem* 75 (19), 6696–6699.
- Stitt, T., Drujan, D., Clarke, B., Panaro, F., Timofeyeva, Y., Kline, W., Gonzalez, M., Yancopoulos, G., Glass, D., 2004. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell* 14 (3), 395–403.
- St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J.M., Rhee, J., Jäger, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., Simon, D.K., Bachoo, R., Spiegelman, B.M., 2006. Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators. *Cell* 127 (2), 397–408.
- Stranges, S., Laclaustra, M., Ji, C., Cappuccio, F.P., Navas-Acien, A., Ordovas, J.M., Rayman, M., Guallar, E., 2010a. Higher Selenium Status is Associated with Adverse Blood Lipid Profile in British Adults. *J. Nutr.* 140 (1), 81–87.
- Stranges, S., Laclaustra, M., Ji, C., Cappuccio, F.P., Navas-Acien, A., Ordovas, J.M., Rayman, M., Guallar, E., 2010b. Higher Selenium Status is Associated with Adverse Blood Lipid Profile in British Adults. *J. Nutr.* 140 (1), 81–87.
- Stranges, S., Marshall, J.R., Natarajan, R., Donahue, R.P., Trevisan, M., Combs, G.F., Cappuccio, F.P., Ceriello, A., Reid, M.E., 2007. Effects of long-term selenium supplementation on the incidence of type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann Intern Med* 147 (4), 217–223.

- Stranges, S., Navas-Acien, A., Rayman, M.P., Guallar, E., 2010c. Selenium status and cardiometabolic health: State of the evidence. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 20 (10), 754–760.
- Stranges, S., Sieri, S., Vinceti, M., Grioni, S., Guallar, E., Laclaustra, M., Muti, P., Berrino, F., Krogh, V., 2010d. A prospective study of dietary selenium intake and risk of type 2 diabetes. *BMC Public Health* 10 (1), 564.
- Stump, C., Short, K., Bigelow, M., Schimke, J., Nair, K., 2003. Effect of insulin on human skeletal muscle mitochondrial ATP production, protein synthesis, and mRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (13), 7996–8001.
- Suh, K., Tatunchak, T., Crutchley, J., Edwards, L., Marin, K., Yuspa, S., 2003. Genomic structure and promoter analysis of PKC-delta. *Genomics* 82 (1), 57–67.
- Sunde, R., 2010. mRNA transcripts as molecular biomarkers in medicine and nutrition. *J Nutr Biochem* 21 (8), 665–670.
- Suzuki, K.T., Tsuji, Y., Ohta, Y., Suzuki, N., 2008. Preferential organ distribution of methylselenol source Se-methylselenocysteine relative to methylseleninic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology* 227 (1), 76–83.
- Taniguchi, C.M., Kondo, T., Sajan, M., Luo, J., Bronson, R., Asano, T., Farese, R., Cantley, L.C., Kahn, C.R., 2006. Divergent regulation of hepatic glucose and lipid metabolism by phosphoinositide 3-kinase via Akt and PKC $\lambda/\zeta$ . *Cell Metabolism* 3 (5), 343–353.
- Taskov, K., Chapple, C., Kryukov, G., Castellano, S., Lobanov, A., Korotkov, K., Guigo, R., Gladyshev, V., 2005. Nematode selenoproteome: the use of the selenocysteine insertion system to decode one codon in an animal genome? *Nucleic Acids Res* 33 (7), 2227–2238.
- Taylor, E., An, D., Kramer, H., Yu, H., Fujii, N., Roeckl, K., Bowles, N., Hirshman, M., Xie, J., Feener, E., Goodyear, L., 2008. Discovery of TBC1D1 as an insulin-, AICAR-, and contraction-stimulated signaling nexus in mouse skeletal muscle. *J Biol Chem* 283 (15), 9787–9796.
- Thanbichler, M., Bock, A., 2002. The function of SECIS RNA in translational control of gene expression in *Escherichia coli*. *EMBO J* 21 (24), 6925–6934.
- Toppo, S., Flohé, L., Ursini, F., Vanin, S., Maiorino, M., 2009. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochim Biophys Acta* 1790 (11), 1486–1500.
- Tran, H., Brunet, A., Griffith, E., Greenberg, M., 2003. The many forks in FOXO's road. *Sci STKE* 2003 (172), RE5.
- Trenerry, M., Gatta, P., Cameron-Smith, D., 2011. JAK/STAT signaling and human in vitro myogenesis. *BMC Physiology* 11 (1), 6.
- Tujebajeva, R.M., Copeland, P.R., Xu, X.M., Carlson, B.A., Harney, J.W., Driscoll, D.M., Hatfield, D.L., Berry, M.J., 2000. Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion. *EMBO Rep* 1 (2), 158–163.
- Ukropcova, B., McNeil, M., Sereda, O., de, J., Xie, H., Bray, G., Smith, S., 2005. Dynamic changes in fat oxidation in human primary myocytes mirror metabolic characteristics of the donor. *J Clin Invest* 115 (7), 1934–1941.

- Valdiglesias, V., Pásaro, E., Méndez, J., Laffon, B., 2009. In vitro evaluation of selenium genotoxic, cytotoxic, and protective effects: a review. *Archives of Toxicology*, Epub ahead of print.
- Verma, N., Rettenmeier, A., Schmitz-Spanke, S., 2011. Recent advances in the use of *Sus scrofa* (pig) as a model system for proteomic studies. *Proteomics* 11 (4), 776–793.
- Vendeland, S.C., Deagen, J.T., Butler, J.A., Whanger, P.D., 1994. Uptake of selenite, selenomethionine and selenate by brush border membrane vesicles isolated from rat small intestine. *Biometals* 7 (4), 305–312.
- Vinceti, M., Maraldi, T., Bergomi, M., Malagoli, C., 2009. Risk of chronic low-dose selenium overexposure in humans: insights from epidemiology and biochemistry. *Rev Environ Health* 24 (3), 231–248.
- Viollet, B., Horman, S., Leclerc, J., Lantier, L., Foretz, M., Billaud, M., Giri, S., Andreelli, F., 2010. AMPK inhibition in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45 (4), 276–295.
- Wang, M., Bohmann, D., Jasper, H., 2005. JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling. *Cell* 121 (1), 115–125.
- Wang, S., Basson, M.D., 2011. Akt directly regulates focal adhesion kinase through association and serine phosphorylation: implication for pressure-induced colon cancer metastasis. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 300 (3), C657–C670.
- Wang, S., Weaver, J., Zhang, S., Lei, X., 2011. Knockout of SOD1 promotes conversion of selenocysteine to dehydroalanine in murine hepatic GPX1 protein. *Free Radic Biol Med* 51 (1), 197–204.
- Wang, X.D., Vatamaniuk, M.Z., Wang, S.K., Roneker, C.A., Simmons, R.A., Lei, X.G., 2008. Molecular mechanisms for hyperinsulinaemia induced by overproduction of selenium-dependent glutathione peroxidase-1 in mice. *Diabetologia* 51 (8), 1515–1524.
- Ward, R.J., Peters, T.J., 1992. The antioxidant status of patients with either alcohol-induced liver damage or myopathy. *Alcohol Alcohol* 27 (4), 359–365.
- Weiller, M., Latta, M., Kresse, M., Lucas, R., Wendel, A., 2004. Toxicity of nutritionally available selenium compounds in primary and transformed hepatocytes. *Toxicology* 201 (1-3), 21–30.
- Welcker, M., Singer, J., Loeb, K.R., Grim, J., Bloecher, A., Gurien-West, M., Clurman, B.E., Roberts, J.M., 2003. Multisite Phosphorylation by Cdk2 and GSK3 Controls Cyclin E Degradation. *Molecular Cell* 12 (2), 381–392.
- Whanger, P.D., 2000. Selenoprotein W: a review. *Cell Mol Life Sci* 57 (13-14), 1846–1852.
- Whanger, P.D., Butler, J.A., 1988. Effects of various dietary levels of selenium as selenite or selenomethionine on tissue selenium levels and glutathione peroxidase activity in rats. *J Nutr* 118 (7), 846–852.
- Wong, R., Sul, H., 2010. Insulin signaling in fatty acid and fat synthesis: a transcriptional perspective. *Curr Opin Pharmacol* 10 (6), 684–691.

- Wu, J.J., Roth, R.J., Anderson, E.J., Hong, E.-G., Lee, M.-K., Choi, C.S., Neuffer, P.D., Shulman, G.I., Kim, J.K., Bennett, A.M., 2006. Mice lacking MAP kinase phosphatase-1 have enhanced MAP kinase activity and resistance to diet-induced obesity. *Cell Metabolism* 4 (1), 61–73.
- Xia, Y., Hill, K., Byrne, D., Xu, J., Burk, R., 2005. Effectiveness of selenium supplements in a low-selenium area of China. *Am J Clin Nutr* 81 (4), 829–834.
- Xu, X.-M., Mix, H., Carlson, B.A., Grabowski, P.J., Gladyshev, V.N., Berry, M.J., Hatfield, D.L., 2005. Evidence for Direct Roles of Two Additional Factors, SECp43 and Soluble Liver Antigen, in the Selenoprotein Synthesis Machinery. *Journal of Biological Chemistry* 280 (50), 41568–41575.
- Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S.J., Smerdon, S.J., Cantley, L.C., 1997. The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* 91 (7), 961–971.
- Yamada, K., Noguchi, T., 1999. Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *Biochem J* 337 (Pt 1), 1–11.
- Yang, S.J., Hwang, S.Y., Choi, H.Y., Yoo, H.J., Seo, J.A., Kim, S.G., Kim, N.H., Baik, S.H., Choi, D.S., Choi, K.M., 2011. Serum Selenoprotein P Levels in Patients with Type 2 Diabetes and Prediabetes: Implications for Insulin Resistance, Inflammation, and Atherosclerosis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*.
- Yeh, J.-Y., Ou, B.-R., Forsberg, N.E., Whanger, P.D., 1997. Effects of selenium and serum on selenoprotein W in cultured L8 muscle cells. *BioMetals* 10 (1), 11–22.
- Ying, J., Clavreul, N., Sethuraman, M., Adachi, T., Cohen, R.A., 2007. Thiol oxidation in signaling and response to stress: Detection and quantification of physiological and pathophysiological thiol modifications. *Free Radical Biology and Medicine* 43 (8), 1099–1108.
- Zaid, H., Talior-Volodarsky, I., Antonescu, C., Liu, Z., Klip, A., 2009. GAPDH binds GLUT4 reciprocally to hexokinase-II and regulates glucose transport activity. *Biochem J* 419 (2), 475–484.
- Zangar, R.C., Davydov, D.R., Verma, S., 2004. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Mechanisms Regulating Enzymes Involved in Xenobiotic Disposition: A Tribute to Ed Bresnick. Toxicology and Applied Pharmacology* 199 (3), 316–331.
- Zenimaru, Y., Takahashi, S., Takahashi, M., Yamada, K., Iwasaki, T., Hattori, H., Imagawa, M., Ueno, M., Suzuki, J., Miyamori, I., 2008. Glucose deprivation accelerates VLDL receptor-mediated TG-rich lipoprotein uptake by AMPK activation in skeletal muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 368 (3), 716–722.
- Zhang, J.L., Li, J.L., Huang, X.D., Bo, S., Rihua, W., Li, S., Xu, S.W., 2011. Dietary selenium regulation of transcript abundance of selenoprotein N and selenoprotein W in chicken muscle tissues. *Biometals*.

- Zhang, Y., Chen, X., 2010. Reducing selenoprotein P expression suppresses adipocyte differentiation as a result of increased preadipocyte inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*
- Zhao, X., Gan, L., Pan, H., Kan, D., Majeski, M., Adam, S.A., Unterman, T.G., 2004. Multiple elements regulate nuclear/cytoplasmic shuttling of FOXO1: characterization of phosphorylation- and 14-3-3-dependent and -independent mechanisms. *Biochem. J.* 378 (3), 839–849.
- Zhao, X., Guan, J.-L., 2011. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Target Cell Movement in Tumor and Cardiovascular Diseases. Advanced Drug Delivery Reviews* 63 (8), 610–615.
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., Moller, D.E., 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108 (8), 1167–1174.
- Zhou, J.-C., Zhao, H., Li, J.-G., Xia, X.-J., Wang, K.-N., Zhang, Y.-J., Liu, Y., Zhao, Y., Lei, X.G., 2009. Selenoprotein gene expression in thyroid and pituitary of young pigs is not affected by dietary selenium deficiency or excess. *J. Nutr.* 139 (6), 1061–1066.
- Zielonka, J., Kalyanaraman, B., 2010. Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: another inconvenient truth. *Free Radic Biol Med* 48 (8), 983–1001.

## 8 Appendix

### 8.1 Primer

Tabelle 8.1. Real-Time PCR-Primer für Ratten-mRNA

Gen	<i>Forward</i> Primer	<i>Reverse</i> primer
GPx1	cgacatcgaacccgatataga	atgccttaggggttgctagg
HPRT	gaccggttctgtcatcatgtcg	acctggttcatcatcactaatcac
Sel W	tcagtgccagtgagcccta	gacatttcagtccttctgtcat
Desmin	gatcaaccttccgatccaga	ttgctcagggtggtttct
Sel N	cgcggagaaactgacagg	gggcttctatggtaagagtctcc
Glut 4	tgcagtgcctgagtcttcttt	ccagtcactcgctgctga
PDK4	gagctgttctcccgtacag	agttctctcacaggcattttctg
Atrogin	gaagaccggctactgtggaa	atcaatcgcttgcggatct
PGC-1 $\alpha$	gcagtcgcaacatgctca	gggtcatttgggtgactctgg

Tabelle 8.2. Real-Time PCR-Primer für humane mRNA

Gen	<i>Forward</i> Primer	<i>Reverse</i> Primer
DUSP1	cgaggccattgacttcataga	ctggcagtggaacacacc
EGR1	agccctacgagcacctgac	ggtttggctgggtaactg
PRKCD	tgaaccaagtcaccagaga	aacctgatatacceaacagg
PDK4	cagtgcaattggtaaagctg	cagtgcaattggtaaagctg
SREBF1	cgctctccatcaatgaca	tgcgcaagacagcagattta
HPRT1	gaccagtcaacaggggacat	gtgtcaattatatctccacaatcaag
ACTB	ccaaccgcgagaagatga	ccagaggcgtacagggatag
GPX1	caaccagttgggcatcag	gttcacctgcacttctcg

**Tabelle 8.3. Real-Time PCR-Primer für *Sus scrofa* mRNA**

<b>Sus Scrofa</b>			
<b>No.</b>	<b>Gen</b>	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>
1	HMGR	aaatgaccagaaattccacaca	caacttttctttctctgtttatcctg
2	ADIPOQ	gatgagcactgccaaactcag	gtctcctaatagactgaagacctc
3	PNPLA2	gcccttgacagctgccacaaa	gcaggctccgtgggctccatg
4	ACTB	cccaaagccaacctgagaa	ccacgtacatggctgggggtg
5	MLXIPL	ttggaggggaattactggaa	tagatgcccacttgtggta
6	CAT	gcgtgatggcccatgtgct	gccgaatgcgtctgttcggga
7	DGAT	ctgctggctctgatggctca	gacgtcccgttaggagaac
8	FOXO1	ggaggctctctccatcat	tagaatgcacatccccgttt
9	G6PC	gaatgggtccacatcgaca	gagggtccccacgttctt
10#	GPX1	gatatcgacctgacatcgaa	gggcactctaggcactgct
11	GSR	cgagcgacccccagcctaca	ggtacgccgctgtggcaat
12#	GAPDH	cagcaatgcctctgtacca	ccacgatgccgaagtgtc
13	HMOX1	gcgaggtcacccgagaaggc	gaggggctgttagaccgggt
14	HNF4A	ctctcgaggctgaggctc	gtccccgttgattccagag
15	LIPE	cactgctgacttctgcgcgag	gatggcgggctgaaactggaag
16	SLC2A4	gtgggccattctctcttg	aagccgagatggggtagg
17	LEP	gtcaccggtttggacttcat	ggtccatcttgacaaactca
18	LPL	ggcggttgaatttagctatcc	gtgggctccaaggctgtat
19	PPARG	tgaagctccaggactacaaaa	aataataaggcggggacaca
20	PPARGC1	tgaaagggccaagcagag	ccaacataaatcacacgacgtt
21	PCK1	gatggttcagcctagggaca	gctacagcagaagggcaaaa
22	PTPN1	agtcagaaggcgggtcgt	ctctccttgggtgggtgat
23	PDK4	ctggctcctggttccccga	ttctgaaccgaagtccagcagct
24	PKM2	tggaaaagtgtgacgagaatgt	acatccaccaccttgagat
25#	Selenbp1	ttggaggaccaggagctaaa	tactcgtttccccttgacca
26#	SEPHS2	ttaaccaaaccctaggaacc	ttcaggattatccagccattg
27#	SELK	caggaaacccccctagaagaa	ctcatccaccggccattg
28#	SEPP1	agacagggctcactctgagaactg	ttttctgtggaagagaaagttgt
29#	SELS	gagaagctaagacagctcgaaga	acgctgtcccatctttcaat
30#	SEPW1	tggtccttcctgatgttct	aggcaaagaccaaggggtgt
31	SREBF1	ggctctggctgacgaatgg	ccggctctccatagacaaag
32	SREBF2	agctcttgaaaggcatcgac	caatcttcagggtccacgtca

<b>Sus Scrofa</b>			
<b>No.</b>	<b>Gen</b>	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>
<b>33</b>	SOD1	<b>ggccgcacaatggtggccat</b>	<b>cacaggccaaacgacttccagca</b>
<b>34</b>	SOD2	<b>agcccgccggctggaattct</b>	<b>gattcctgctcgagctgcacgc</b>
<b>35#</b>	TNRXD1	<b>gatttaacaagcgggtcatggt</b>	<b>caacctacattcacacagttcct</b>
<b>36</b>	UCP2	<b>agggacctcacccaatgtcgct</b>	<b>aggtcggccttcaggagcgt</b>
<b>37</b>	UCP3	<b>ccgtgggtccgcgcacataa</b>	<b>ttccgagtcggcggcaagt</b>
<b>38</b>	TNF	<b>gagccaccacgctcttctgcta</b>	<b>acgtgggcgacgggcttacc</b>
<b>39</b>	IL6	<b>cactgatccagaccctgaggca</b>	<b>tccagcaggccggcatttgt</b>

Mit # markierte Primer stammen von Zhou, J. C., Zhao, H., Li, J. G. et al (2009) J Nutr 139, 1061–1066.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

ACTB	β-Aktin
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ALT	Alaninaminotransferase
ApoER2	Apolipoprotein E Rezeptor 2
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
BSO	L-Buthioninsulfoximin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
Da	Dalton
DCF	2',7-Dichlorofluorescein
DHE	Dihydroethidium
DIO	Deiodinase
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Egr	<i>Early Growth Response</i>
EFSec	<i>Sec-specific eukaryotic elongation factor</i>
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
Erk	Extrazellulär regulierte Kinase
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FKS	Fötale Kelberserum
FoxO	<i>forkhead box class O</i>
GLUT4	Glucosetransporter 4
Gpx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
GSK3	Glycogensynthasekinase 3
H <sub>2</sub> Se	Selenwasserstoff
HBSS	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HOMA-IR	<i>homeostatic model assessment insulin resistance</i>
HPRT1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	Meerrettichperoxidase
HSKMC	Humane Skelettmuskelzellen
IgG	Immunglobulin G
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
InsR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KO	Knockout
LB	Luria-Bertani Medium
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
M	Molar
MSeA	Methylseleninsäure
mTORC	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MTT	3-[4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazoliumbromid
MAPK	Mitogen aktivierte Phosphokinase
MKP-1	MAP-Kinase Phosphatase-1

Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Natriumselenit
Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>	Natriumselenat
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotid-2'-phosphat
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
Nox	NADPH-Oxidase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDK1	<i>Phospho-Inositid-dependent Kinase 1</i>
PGC-1 $\alpha$	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PTP1B	Proteintyrosinphosphatase-1B
PTEN	<i>phosphatase und tensin homolog on chromosome 10</i>
RIPA-Puffer	<i>Radio Immuno Precipitation Assay-Puffer</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Reaktive Stickstoff Spezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s.u.	siehe unten
SBP2	<i>SECIS binding protein 2</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Se	Selen
SeCys (U)	Selenocystein
SECIS	Selenocystein-Insertionssequenz
SecS,	Selenocystein-Synthase
SELECT	<i>Selenium und Vitamin E Cancer Prevention Trial</i>
SelN	Selenoprotein N
SelP	Selenoprotein P
SelW	Selenoprotein W
SeMet	L-Selenomethionin
SOD	Superoxiddismutase
SPS	Selenophosphat-Synthetase
SREBF	<i>Sterol Regulatory Binding Faktor</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
tRNA	Transfer-RNA
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAG	Triacylglyzeride
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBST	TBS + Tween-20
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxinreduktase
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
u.a	Unter anderem
WMD	<i>White muscle disease</i>

## 10 Abbildungsverzeichnis

Abbildungsnr.	Titel	Seite
1.1	<u>Schematische Darstellung des Selenmetabolismus im Menschen</u>	2
1.2	<u>Schema der Selenocysteininsertion</u>	4
1.3	<u>Übersicht über den insulinstimulierten PI3K/Akt-Signalweg</u>	10
1.4	<u>Zelluläre Funktionen von Akt-Substraten</u>	11
1.5	<u>Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf Insulinsignaltransduktion</u>	13
1.6	<u>Intervention von Selenverbindungen und Selenoproteine in der Insulinsignalkaskade</u>	23
3.1	<u>In der Zellkultur eingesetzte Selenverbindungen</u>	29
4.1	<u>Differenzierung von L6-Myoblasten zu Myotuben</u>	47
4.2	<u>ROS-Messung mit DCF in L6-Myoblasten und Myotuben</u>	48
4.3	<u>Wirkung von Selenverbindungen auf die Viabilität von L6-Myoblasten und Myotuben</u>	48
4.4	<u>Expression von SelW und GPx1 bei Selensupplementation in L6-Myotuben</u>	50
4.5	<u>Genexpression von Selenoprotein N</u>	51
4.6	<u>Proteinexpression von SelW und MnSOD</u>	51
4.7	<u>Phosphorylierung des Ser473 der Akt in L6-Myoblasten</u>	52
4.8	<u>Insulinabhängige Phosphorylierung der Akt an Ser473 in L6-Myotuben</u>	53
4.9	<u>Densitometrische Auswertung der insulinabhängigen Akt-Phosphorylierung</u>	54
4.10	<u>Immunoblot der Akt-Phosphorylierung nach 5 min Insulinstimulation</u>	55
4.11	<u>BSO hebt die Inhibition der Akt-Phosphorylierung durch Selenit auf</u>	55
4.12	<u>Darstellung des elektrophoretischen Mobilitätsshift der PTEN</u>	57
4.13	<u>Phosphorylierung von FoxO1a/3</u>	58
4.14	<u>Proteinexpression von FoxO3 bei Inkubation mit 1 <math>\mu</math>M niedermolekularen Selenverbindungen.</u>	59
4.15	<u>Translokation von EGFP-Foxo1a in L6-Myoblasten</u>	59
4.16	<u>Insulinabhängige Glucoseaufnahme unter Einfluss von Selenverbindungen in L6-Myotuben</u>	61
4.17	<u>Einfluss von Selenverbindungen auf die basale und durch Insulinstimulation erzeugte ROS-Produktion in L6-Zellen</u>	62
4.18	<u>Detektion von Superoxid mittels DHE im 96-Well-Format</u>	64
4.19	<u>Bestimmung der spezifischen Oxyethidiumfluoreszenz mittels RP-HPLC</u>	65
4.20	<u>Darstellung der relativen GLUT4-Expression</u>	66
4.21	<u>Selenit-abhängige Phosphorylierung der MAP-Kinasen P38 und Erk1/2 sowie der AMPK</u>	67
4.22	<u>Einfluss von Selenit auf die Expression von PGC-1<math>\alpha</math> in L6-Myotuben</u>	68
4.23	<u>Nachweis der Induktion von SelW durch verschiedene Selenverbindungen und Selenoprotein P in L6-Myotuben</u>	69
4.24	<u>Einfluss von Selenoprotein P auf die Akt-Phosphorylierung in L6-Zellen</u>	70
4.25	<u>Phosphorylierung der Akt an Serin 473 nach 6 h oder 24 h</u>	72

<b>Abbildungsnr.</b>	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
	<u>Inkubation mit Selenoprotein P in HSKMC</u>	
4.26	<u>Selenoprotein P induzierte Inhibition der Akt-Phosphorylierung in HSKMC unter Insulinstimulation</u>	72
4.27	<u>Einfluss niedermolekularer Selenverbindungen auf die Aktivierung der Akt in HSKMC</u>	73
4.28	<u>Akt-Aktivität nach Insulinstimulation und Inkubation mit Selenoprotein P</u>	73
4.29	<u>Phosphorylierung von FoxO1a/FoxO3 an T24/32 unter 6h Selenoprotein P-Einfluss</u>	75
4.30	<u>Protein und Genexpression der GPx1</u>	76
4.31	<u>Phosphorylierung der P38 an T180/Y182 und der Erk1/2 an T202/Y204</u>	77
4.32	<u>Phosphorylierung von STAT3 an Y705 und der JNK an T183/T185</u>	78
4.33	<u>Phosphorylierung der FAK an Y397 (A) und der GSK3<math>\alpha</math> an S21/9</u>	79
4.34	<u>Phosphorylierung der AMPK an T172 unter 6 h Selenoprotein P Einfluss</u>	80
4.35	<u>Genexpression des Transkriptionsfaktors Egr1</u>	80
4.36	<u>Bestimmung des Glycogengehalts in Skelettmuskel und Leber mit dem Biovision Oxiredprobe Assay</u>	84
4.37	<u>Proteinexpression der GPx1 und TrxR1 in Leber, Skelettmuskel und viszeralem Fettgewebe</u>	85
4.38	<u>Aktivitäten der GPx und TrxR in Leber, Skelettmuskel und viszeralem Fettgewebe</u>	86
4.39	<u>Phosphorylierung von Akt, Erk1/2 und P38, sowie Expression der AMPK<math>\alpha</math> in Skelettmuskel.</u>	88
4.40	<u>Phosphorylierung von Akt, AMPK<math>\alpha</math>, Erk1/2 und P38, in viszeralem Fett</u>	89
4.41	<u>Phosphorylierung von Akt, AMPK<math>\alpha</math>, Erk1/2 und P38 in Leber</u>	90
4.42	<u>Intervention der Se(+IV)-Verbindungen Methylseleninsäure und Selenit innerhalb der Insulinsignaltransduktion von L6-Myotuben</u>	102
5.1	<u>Interventionen von Selenoprotein P in den Insulin- und Zytokinsignalweg</u>	107
5.2	<u>Einfluss der Selensupplementation auf den Metabolismus von Sus Scrofa</u>	111

## 11 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle</b>	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
1.1	Lokalisation und Funktion von humanen Selenoproteinen	6
3.1	Eingesetzte primäre Antikörper	26
3.2	Eingesetzte sekundäre Antikörper	28
3.3	GPx-Assay-Puffer	36
3.4	Eingesetzte Plasmide	44
4.1	Metabolische Charakteristika aus Plasmaproben von Schweinen	83
4.2	Genexpression der Selenoproteine in Leber, Skelettmuskel und Viszeraalfettgewebe	87
4.3	Genexpression von Enzymen und Transkriptionsfaktoren des Kohlenhydrat und Lipidstoffwechsels	91
4.4	Genexpression von Proteinen der Redoxhomöostase in Leber, Skelettmuskel und viszeralem Fettgewebe	93
4.5	Genexpression von Zytokinen des viszeralem Fettgewebe	94
8.1	Real-Time PCR-Primer für Ratten-mRNA	147
8.2	Real-Time PCR-Primer für humane mRNA	147
8.3	Real-Time PCR-Primer für Sus Scrofa-mRNA	148

## 12 Publikationen

### Publikationen zu dieser Arbeit

Pinto, A., Speckmann, B., Heisler, M., Sies, H., Steinbrenner, H., 2011. Delaying of insulin signal transduction in skeletal muscle cells by selenium compounds. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105 (6). 812-20

Pinto, A.; Juniper D.T.; Sanil M.; Linda M.; Clark L.; Sies H.; Rayman M.P.; Steinbrenner H., 2012. A supranutritional selenium diet induces alterations in molecular targets related to energy metabolism in skeletal muscle and visceral adipose tissue of pigs. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *submitted*

#### *Review:*

Steinbrenner, H., Speckmann, B., Pinto, A., Sies, H., 2011. High selenium intake and increased diabetes risk: experimental evidence for interplay between selenium and carbohydrate metabolism. *J Clin Biochem Nutr* 48 (1), 40–45.

### Kongressbeiträge

Male pigs fed a supranutritional selenium diet may develop a predisposition to type 2 diabetes. Antonio Pinto, Mert Sanil, Margaret Rayman, Linda Morgan, Helmut Sies, Darren Juniper, Lynne Clark, Holger Steinbrenner. TEMA14, Enshi, Hubei, China, 19.-24. September (2011), Poster.

Delaying of insulin signal transduction in skeletal muscle cells by selenium compounds. Antonio Pinto, Bodo Speckmann, Helmut Sies, Holger Steinbrenner. TEMA14, Enshi, Hubei, China, 19.-24. September (2011), Poster.

#### Expression und Regulation von Selenoprotein P in pankreatischen Betazellen

Anna-Lena Hotze, Bodo Speckmann, Birgit Mülders-Opgenoorth, Antonio Pinto, Werner A. Scherbaum, Helmut Sies, Sven Schinner, Holger Steinbrenner. DDG-Tagung Stuttgart 12-15. Mai (2010), Poster

Down-regulation of selenoprotein P expression by pro-inflammatory cytokines in intestinal epithelial cells and in ulcerative colitis Bodo Speckmann, Antonio Pinto, Meike Winter, Irmgard Förster, Helmut Sies, Holger Steinbrenner. 9th international Symposium on Selenium in Health and Medicine, Kyoto, Japan 31. Mai bis 4. Juni (2010), Poster

## 13 Danksagung

Herrn Professor Dr. Dr. Helmut Sies danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, sowie für das Interesse an meiner Dissertationsarbeit, wie auch für die finanzielle Förderung durch sein Forschungsvorhaben bei der *National Foundation for Cancer Research* (NFCR, Bethesda, USA).

Herrn PD Dr. Holger Steinbrenner danke ich, für die kompetente Einführung in die komplexe Thematik der Selenoproteine und des Typ 2 Diabetes und für die vielen Ratschläge und Diskussionen, die maßgeblich zur Gestalt dieser Arbeit beigetragen haben. Gern habe ich an seinem DFG-Forschungsprojekt „Selenhomöostase und Kohlenhydratmetabolismus in insulin-sensitiven Zellen“ (STE 1782/2-1) mitgearbeitet.

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

Außerdem danke ich Professor Wilhelm Stahl für die Möglichkeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie I promovieren zu können.

Professor Dr. Margaret Rayman, Dr. Darren Juniper, Professor Dr. Linda Morgan, Mert Sanil und Dr. Lynne Clark danke ich für gute Zusammenarbeit und fruchtbare Diskussionen im Rahmen der Sus Scrofa Studie.

Andrea Borchardt danke ich für die hervorragende Unterstützung im Labor und praktische Ratschläge.

Für die zur Verfügung gestellten Hepatozyten bedanke ich mich bei Professor Dr. Roland Reinehr und Elisabeth Winands.

Bei Dr. Niloofar Ale-Agha bedanke ich mich herzlich für die Versorgung mit Antikörpern.

Dr. Bodo Speckmann danke ich für Erörterungen praktischer und theoretischer Fragestellung und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

PD Dr. Sven Schinner und Birgit Mülders-Ogenooth danke ich für den Zugang zu den Räumlichkeiten der Endokrinologie und für die Möglichkeit mit Tritium arbeiten zu dürfen, sowie für die Einblicke in die klinische Diabetologie.

Peter Graf danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Superoxidbestimmung per HPLC.

Bei Martin Heisler bedanke ich mich für seinen tatkräftigen Einsatz am LightCycler.

Marlies Scholtes danke ich für die Unterstützung in allen organisatorischen Fragen

Thomas Becher möchte ich für die guten Tips bei Computerfragen und die Hilfestellung bei technischen Ausfällen danken.

Bei Dr. Esra Bilgic, Edwin Vasquez und Melanie Engels bedanke ich mich für den Austausch über die ischämische Reperfusion.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern und Kollegen des Lehrstuhls für ihre ständige Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima.

Ganz besonders danke ich meiner Familie und meiner Freundin Christine für ihre volle Unterstützung während der Promotion.

## ERWEITERTES INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 DAS ESSENTIELLE SPURENELEMENT SELEN	1
1.2 SELENOPROTEINE	3
1.3 INSULINSIGNALTRANSDUKTION	8
1.3.1 Akt-Signaling	9
1.3.2 Funktion von reaktiven Sauerstoffspezies bei der Insulinsignalkaskade	12
1.4 INSULINWIRKUNG UND INSULINRESISTENZ IM SKELETTMUSKEL	14
1.4.1 Insulinwirkung im Skelettmuskel	14
1.4.2 Insulinresistenz im Skelettmuskel	16
1.5 SELEN UND SELENOPROTEINE IN DER SKELETTMUSKULATUR	18
1.6 MOLEKULARE MECHANISMEN DER PRO- UND ANTIDIABETISCHEN WIRKUNGEN VON SELEN	21
<b>2 ZIELE DER ARBEIT</b>	<b>24</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>25</b>
3.1 MATERIALIEN	25
3.1.1 Puffer und Lösungen	25
3.1.2 Kits und Hilfsmaterialien	26
3.1.3 Antikörper	26
Primäre Antikörper	26
Sekundäre Antikörper	28
3.1.3 Verwendete niedermolekulare Selenverbindungen	28
3.2 ZELLKULTUR	29
3.2.1 Zellen	29
3.2.2 Zellkulturmedien	30
3.2.3 Kultivierung von Zellen aus Mensch und Ratte	32
3.2.4 Bakterienzellkultur	33
3.2.5 Gewinnung von angereichertem Selenoprotein P	33
3.3 SELENSUPPLEMENTATIONSMODELL SUS SCROFA	33
3.3.1 Tierhaltung	33
3.3.2 Sammeln von Blut- und Gewebeproben	34
3.3.3 Ethische Bestimmungen	34
3.4 BIOCHEMISCHE METHODEN	34
3.4.1 Western Blot	34
3.4.2 Bestimmung des Selengehaltes mit 2,3-Diaminonaphthalin	35
3.4.3 GPx-Aktivitätsbestimmung in Zellkultur- und Gewebelysaten	36
3.4.4 Thioredoxinreduktase-Aktivitätsmessung in Zellkultur- und Gewebelysaten	37
3.4.5 Akt-Aktivitätsmessung	37
3.4.6 Alanin-Aminotransferase Aktivität	38
3.4.7 Bestimmung des Glycogengehalts aus Gewebe	38
3.5 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	38
3.5.1 Insulinabhängige Glucoseaufnahme	38
3.5.2 Lokalisation von EGFP-FoxO1a in Myoblasten per Fluoreszenz-Mikroskopie	39
3.5.3 Promotoraktivitätsbestimmung durch Luziferaseassay	39
3.5.4 Nachweis intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies durch 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat	40
3.5.5 Nachweis von intrazellulärem Superoxid mit Dihydroethidium	40
3.5.6 Bestimmung der Zellviabilität mittels MTT oder Resazurin Viabilitätstest	41
3.6 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	41
3.6.1 Enzyme	41
3.6.2 Klonierungsstrategie für die Umklonierung des Ratten-GLUT4 Promotors	41
3.6.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	42
3.6.4 Restriktionsverdau von DNA	42
3.6.5 Ligation von Plasmid und DNA-Fragmenten	42
3.6.6 Transformation von E.coli-Zellen	43
3.6.7 Präparation von Plasmid-DNA aus E.coli und DNA-Sequenzierung	43
3.6.8 eingesetzte Plasmide	43
3.6.9 RNA-Isolierung und reverse Transkription	44
3.6.10 Real-Time PCR	45
3.6.11 Primerdesign für Real-Time PCR	45
<b>4 ERGEBNISSE</b>	<b>46</b>
4.1 EINFLUSS VON NIEDERMOLEKULAREN SELENVERBINDUNGEN AUF DIE INSULINSIGNALTRANSDUKTION IN L6 MUSKELZELLEN	46
4.1.1 Etablierung des L6.C11 Skelettmuskelzellsystems	46
4.1.2 Induktion der Selenoproteine durch Selensupplementation	49
4.1.3 Phosphorylierung der Akt in Myoblasten bei Supplementation mit Selenverbindungen	52

4.1.4	<i>Insulinabhängige Phosphorylierung der Akt in Myotuben unter Einfluss von Selenverbindungen</i>	53
4.1.5	<i>Einfluss von Selenverbindungen auf FoxO1a/3 in L6-Muskelzellen</i>	57
4.1.6	<i>Glucoseaufnahme unter Einfluss von Selenverbindungen in Myotuben</i>	60
4.1.7	<i>Einfluss der Selenverbindungen auf die intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies</i>	61
4.1.8	<i>Superoxidproduktion in Myotuben bei Selensupplementation</i>	63
4.1.9	<i>GLUT4-Genexpression bei Selenitinkubation</i>	65
4.1.10	<i>Einfluss von Selenverbindungen und Insulin auf weitere Kinasen des Energiestoffwechsels in Myotuben</i>	66
4.1.11	<i>Einfluss von Selenit auf die Expression von PGC-1<math>\alpha</math> in L6-Myotuben.</i>	68
4.1.12	<i>Selenoprotein W-Induktion in L6-Myotuben durch Inkubation mit Selenoprotein P</i>	68
4.1.13	<i>Einfluss von Selenoprotein P auf die Aktivierung der Akt in L6-Myotuben</i>	69
4.2	<b>EINFLUSS DES SELENTTRANSPORTPROTEINS SELENOPROTEIN P AUF DIE INSULINSIGNALTRANSDUKTION IN HUMANEN SKELETTMUSKELZELLEN</b>	71
4.2.1	<i>Beeinflussung der Akt Phosphorylierung durch humanes Selenoprotein P in HSKMC</i>	71
4.2.2	<i>Induktion der GPx1 durch Selenoprotein P in HSKMC</i>	74
4.2.3	<i>Nachweis insulinabhängiger Phosphorylierung von Proteinen unter Einfluss von Selenoprotein P</i>	75
4.2.4	<i>Einfluss von Selenoprotein P auf die insulinabhängige Genexpression</i>	79
4.3	<b>EINFLUSS VON SELENSUPPLEMENTATION AUF DIE SIGNALTRANSDUKTION UND GENEXPRESSION IN INSULINZIELGEWEBEN VON SUS SCROFA.</b>	81
4.3.1	<i>Veränderung von systemischen Parametern durch Selensupplementation</i>	81
4.3.2	<i>Regulation der Selenoproteine durch Selensupplementation</i>	84
4.3.3	<i>Einfluss der Selensupplementation auf den Phosphorylierungsstatus von Kinasen des Energiestoffwechsels im Skelettmuskel</i>	87
4.3.4	<i>Einfluss der Selensupplementation auf den Phosphorylierungsstatus von Kinasen des Energiestoffwechsels im Fettgewebe</i>	88
4.3.5	<i>Einfluss der Selensupplementation auf den Phosphorylierungsstatus von Kinasen des Energiestoffwechsels in der Leber</i>	90
4.3.6	<i>Beeinflussung der Genexpression von Transkriptionsfaktoren und Enzymen des Energiestoffwechsels durch Selensupplementation.</i>	91
4.3.7	<i>Quantifizierung der Genexpression antioxidativer Enzyme und Proteine</i>	92
4.3.8	<i>Quantifizierung der Genexpression von Zytokinen des viszeralem Fettgewebe</i>	93
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>95</b>
5.1	<b>NATRIUMSELENIT UND METHYLSELENINIGE SÄURE BEEINTRÄCHTIGEN DIE INSULINSENSITIVITÄT VON SKELETTMUSKELZELLEN IN L6-ZELLEN</b>	96
5.1.1	<i>Toxizität der Selenverbindungen</i>	96
5.1.2	<i>Einfluss der Selenverbindungen auf die Signaltransduktion, Glucoseaufnahme und reaktive Sauerstoffspezies</i>	97
5.1.3	<i>Selenoproteinexpression und Einfluss von Selenoprotein P</i>	100
5.2	<b>SELENOPROTEIN P BEEINFLUSST DIE PHOSPHORYLIERUNG VON INSULINABHÄNGIGEN SIGNALMOLEKÜLEN IN HUMANEN SKELETTMUSKELZELLEN</b>	102
5.2.1	<i>Phosphorylierung von Signalmolekülen der Insulinsignaltransduktion durch Selenoprotein P</i>	103
5.2.2	<i>Steigerung der GPx1-Expression durch Selenoprotein P</i>	105
5.2.3	<i>Selenoprotein P unterdrückt die insulinabhängige Egr1-Genexpression</i>	106
5.2.4	<i>Mögliche Mechanismen der durch SelP veränderten Signaltransduktion</i>	106
5.3	<b>EINFLUSS EINER SUPPLEMENTATION MIT SELEN AUF DEN ENERGIESTOFFWECHSEL IN SKELETTMUSKULATUR UND VISZERALEM FETTGEWEBE IM TIERMODELL SUS SCROFA</b>	107
5.3.1	<i>Genexpression der Selenoproteine und antioxidativen Enzyme in Sus Scrofa</i>	108
5.3.2	<i>Einfluss der Selensupplementation auf die Genexpression und die Kinasen des Skelettmuskels</i>	109
5.3.3	<i>Einfluss der Selensupplementation auf die Genexpression und die Kinasen des Fettgewebes</i>	110
5.4	<b>POTENTIALBEWERTUNG VON SELEN ALS RISIKOFAKTOR FÜR TYP 2 DIABETES MELLITUS</b>	112
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>116</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>118</b>
<b>8</b>	<b>APPENDIX</b>	<b>147</b>
8.1	<b>PRIMER</b>	147
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>150</b>
<b>10</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>152</b>
<b>11</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>154</b>
<b>12</b>	<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>155</b>
	<i>Publikationen zu dieser Arbeit</i>	155
	<i>Kongressbeiträge</i>	155
<b>13</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>156</b>



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.

Düsseldorf, den 02.02.2012

---

(Antonio Pinto)