

**Aus der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Michael Roden

**Zur Lokalisation und Regulation von Selenoprotein P in
pankreatischen Betazellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von Anna-Lena Kim Hotze

(2014)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. N. Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Schinner

Zweitgutachterin: PD Dr. Cortese-Krott

„Alles Gelingen hat sein Geheimnis.“
(Joachim Kaiser)

Für Oli und meine Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

1. Steinbrenner H, Hotze AL, Speckmann B, Pinto A, Sies H, Schott M, Ehlers M, Scherbaum WA, Schinner S.: Localization and regulation of pancreatic selenoprotein P, Journal of Molecular Endocrinology. 50(1):31-42. 2013 doi: 10.1530/JME-12-0105.
2. Hotze AL, Schinner S, Speckmann B, Mülders-Opgenoorth B, Pinto A, Scherbaum WA; Sies H, Steinbrenner H; Expression und Regulation von Selenoprotein P in pankreatischen Betazellen, Postervortrag P 271, 45. Jahrestagung der DDG 2010, Stuttgart
3. Steinbrenner H, Hotze AL, Speckmann B, Pinto A, Sies H, Schott M, Ehlers M, Scherbaum WA, Schinner S: Lokalisation und regulation of pancreatic Selenoprotein P, Postervortrag Selenium Meeting 2013, Berlin

Zusammenfassung

Die Schädigung durch oxidative Noxen gilt als ein Mechanismus der Verringerung der Betazellmasse in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 (DM2). Betazellen des Pankreas gehören zu den am geringsten mit antioxidativen Enzymen ausgestatteten Zellen. Neben Superoxiddismutasen, Peroxiredoxinen und der Katalase gibt es eine Reihe von selenabhängigen Proteinen, darunter die Glutathionperoxidasen und das Selenoprotein P (SeP). SeP dient hauptsächlich als Selentransporter im Plasma. Zusätzlich stellt es ein antioxidatives Enzym dar. SeP könnte daher ein protektiver Faktor für pankreatische Betazellen vor oxidativem Stress sein. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Expression und die Regulation von SeP in pankreatischen Betazellen untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels *Realtime*-PCR die Expression des SeP im Pankreas nachgewiesen werden. Mittels *in-situ* Immunlokalisation konnte gezeigt werden, dass sich die Expression des Selenoprotein P auf den endokrinen Anteil des Pankreas beschränkt. SeP kommt hier sowohl in Alpha- als auch in Betazellen vor. Zusätzlich konnte die Expression auf Proteinebene durch Immunoblotting von Lysaten primärer Rattengewebe und der Ratten-Insulinoma Zelllinie INS-1 bestätigt werden. Hohe Glukosekonzentrationen supprimierten dosisabhängig den seleninduzierten Anstieg der SeP-Genexpression. Bei jedem der verwendeten Selendonoren erfolgte eine signifikante Abnahme der SeP-mRNA bei 16,7mM Glukose im Vergleich zu 5mM Glukose. Eine durch Hyperglykämie induzierte Abnahme der SeP-Expression konnte ebenfalls in primären murinen Inseln beobachtet werden. Die SeP-Promotoraktivität wurde durch Selen nicht signifikant verändert. Hochglukose verringerte jedoch die SeP-Promotoraktivität signifikant, wenn diese in Kombination mit Selenat zur Stimulation verwendet wurde. Die Effekte von Selenverbindungen und Glukose auf die INS-1-Zellen konnten auf Proteinebene mittels Western Blot bestätigt werden. Im Pankreas von Mäusen, welche zuvor mit dem Betazelltoxin Streptozotocin behandelt wurden, war SeP bei einer prädiabetischen Stoffwechsellage von 8mM Glukose im Blut vermehrt exprimiert. Mit progredienter diabetischer Stoffwechsellage und steigenden Blutzuckerwerten jedoch verminderte sich die pankreatische SeP-Expression parallel zum Untergang der Betazellmasse.

SeP könnte als antioxidatives Enzym, das vor oxidativem und nitrosativen Stress schützt, eine Rolle in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 spielen. Durch seine hohe Anzahl an Selenatomen könnte es zudem als Selendonor für die Biosynthese anderer Selenoproteine - wie z.B. die Glutathionperoxidasen - dienen und ein potentielles Therapieziel des Diabetes mellitus Typ 2 darstellen.

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat	GPx	Glutathionperoxidase
ATP	Adenosintriphosphat	GSIS	glukosestimulierte Insulinsekretion
Akt	Proteinkinase B	H₂O₂	Wasserstoffperoxid
AGE	advanced glycation end product	HNF4α	hepatocyte nuclear factor 4 α
ApoER2	Apolipoprotein E Rezeptor 2	HPRT	Hypoxanthin-Guanin- Phosphoribosyl-Transferase
BHP	<i>tert</i> -Buthylhydroperoxid	IAPP	Insel-Amyloid Polypeptid
BSA	bovines Serumalbumin	IFN-γ	Interferon γ
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	IL-1β	Interleukin 1 β
Ca²⁺	Calcium	IR	Insulinresistenz
cDNA	complementary DNA	K⁺	Kalium-Ion
DAG	Diacylglycerol	Kir	Kalium-Inward-Rectifier
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol	LDH	Laktatdehydrogenase
ddNTP	Didesoxyribonucleosidtriphosphat	LDL	low density Lipoprotein
DM2	Diabetes mellitus Typ 2	mRNA	messenger RNA
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat	MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5- (3-carboxymethoxyphenyl)-2- (4-sulfophenyl)-2H- Tetrazolium
DIO	Iodothyronindeiodinase	MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium Bromid
DMSO	Dimethylsulfoxid	NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
eEFSec	Sec-specific eukaryotic elongation factor	NFκB	nuclear factor kappa-B
FADH	Flavin-Adenin-Dinucleotid	NO	Stickstoffmonoxid
FGW	Fettgewebe	Nox	NAD(P)H Oxidase
FFS	freie Fettsäuren	PBS	Phosphate buffered saline
FKS	fetales Kälberserum	PDK1	phosphoinositolabhängige Kinase 1
FoxO1a	forkhead box O1a	PDX1	pancreatic duodenal homebox 1
G6Pase	Glukose-6-Phosphatase	PEPCK	Phosphoenolpyruvat- carboxykinase
Glc	Glukose	PGC	Peroxisomal proliferator activated receptor- γ - coactivator
GIP	gastroinhibitorisches Protein	PH- GPx	Phospholipid-Hydroperoxid Glutathionperoxidase
GLUT	Glukosetransporter	PI3 - Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase

PIP2	Phosphatidyl-Inositol-3,4 Bisphosphat	SECIS	selenocysteine insertion sequence
PKA	Proteinkinase A	SecS	Selenocystein-Synthase
PKB	Proteinkinase B	SeP	Selenoprotein P
PKC	Proteinkinase C	SFM	serumfreies Medium
PPARγ	peroxisome proliferator-activated receptor	SHIP2	Phosphatidylinositol-3,4,5- Triphosphat-5-Phosphatase 2
Pstk	Phosphoseryl-tRNA ^{Sec} Kinase	siRNA	small interfering RNA
PTP	Proteintyrosinphosphatase	SOD	Superoxiddismutase
PTEN	Phosphatase and tensin homolog	SPS2	Selenophosphat-Synthetase 2
RIA	Radioimmunoassay	STZ	Streptozotocin
RISC	RNA-induced silencing complex	SW	Stoffwechsel
RNS	reaktive Stickstoffspezies	TAE	Tris-Acetat-EDTA
ROS	reaktive Sauerstoffspezies	TBS	tris buffered saline
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion	TBST	tris buffered saline with Tween
SBP2	SECIS bindendes Protein 2	TNFα	Tumornekrosefaktor α
SD	Standardabweichung	tRNA	transfer RNA
SDS	sodium dodecyl sulfate	TrxR	Thioredoxinreduktase
Se	Selen		
Sec	Selenocystein		

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	II
INHALTSVERZEICHNIS	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 DIABETES MELLITUS	1
1.1.1 <i>Definition und Epidemiologie</i>	1
1.1.2 <i>Physiologie und Regulation der Glukosehomöostase</i>	1
1.1.3 <i>Insulinsekretion und Insulinwirkung</i>	4
1.1.4 <i>Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2</i>	8
1.1.5 <i>Aufbau, Masse und Anpassung der pankreatischen Betazelle</i>	8
1.2 NITROSATIVER UND OXIDATIVER STRESS	10
1.2.1 <i>Entstehung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies</i>	10
1.2.2 <i>Abwehrmechanismen gegen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies</i>	11
1.2.3 <i>Antioxidative Kapazität der Betazelle</i>	12
1.2.4 <i>Auswirkungen reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies auf die pankreatische Betazelle</i>	14
1.3 STREPTOZOTOCIN	16
1.4 DAS SPURENELEMENT SELEN	17
1.4.1 <i>Allgemeines</i>	17
1.4.2 <i>Selenstoffwechsel</i>	19
1.5 SELENOPROTEINE	20
1.6 SELENOPROTEIN P	24
1.6.1 <i>Allgemeines</i>	24
1.6.2 <i>Primärstruktur, Translation und Isoformen</i>	25
1.6.3 <i>Regulation</i>	26
1.6.4 <i>SeP als Selentransporter und antioxidatives Enzym</i>	27
2 ZIELE DER ARBEIT	30
3 MATERIAL UND METHODEN	32
3.1 MATERIALIEN	32
3.1.1 <i>Geräte</i>	32
3.1.2 <i>Puffer und Lösungen</i>	33
3.1.3 <i>Versuchstiere und Zellkulturmaterialien</i>	34
3.1.4 <i>Antikörper</i>	38
3.1.5 <i>Enzyme</i>	38
3.1.6 <i>Plasmide</i>	39
3.1.7 <i>Kits und Hilfsmaterialien</i>	39
3.2 METHODEN	40

3.2.1	<i>Kultivierung der INS-1-Zelllinie</i>	40
3.2.2	<i>Nachweis der Viabilität der INS-1-Zellen mittels MTS-Assay</i>	40
3.2.3	<i>Nachweis der Viabilität der INS-1-Zellen mittels Trypanblaufärbung</i>	41
3.2.4	<i>Transiente Transfektion von Plasmid-DNA und Dual Luciferase Assay</i>	41
3.2.5	<i>Immunologische Methoden</i>	42
3.2.6	<i>Western Blot</i>	43
3.2.7	<i>In-situ Immunlokalisation mittels Immunhistochemie</i>	44
3.2.8	<i>In-situ Immunlokalisation mittels Immunfluoreszenz</i>	45
3.2.9	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	45
3.2.10	<i>RNA-Isolierung</i>	46
3.2.11	<i>Reverse Transkription</i>	47
3.2.12	<i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>	47
3.2.13	<i>Realtime-PCR</i>	48
4	ERGEBNISSE	52
4.1	EXPRESSION UND LOKALISATION VON SEP IM PANKREAS.....	52
4.1.1	<i>Nachweis der mRNA-Expression von SeP in primären Rattengeweben</i>	52
4.1.2	<i>Nachweis der mRNA-Expression von SeP in der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-153</i>	
4.1.3	<i>Nachweis der Proteinexpression von SeP mittels in-situ Immunlokalisation in murinen und humanen Pankreata</i>	54
4.1.4	<i>Western-Blot-Etablierung</i>	56
4.1.5	<i>Nachweis der Proteinexpression von SeP im Immunoblot</i>	57
4.2	EINFLUSS DER VERWENDETEN STIMULANTIEN AUF DIE METABOLISCHE AKTIVITÄT DER INS-1-ZELLEN 60	
4.2.1	<i>Selenverbindungen</i>	60
4.2.2	<i>Glukose</i>	61
4.2.3	<i>Streptozotocin</i>	62
4.2.4	<i>Hydroperoxide</i>	64
4.3	REGULATION DER SEP-EXPRESSION IN PANKREATISCHEN BETAZELLEN.....	67
4.3.1	<i>Inhibition der SeP-Expression in INS-1-Zellen bei erhöhten Glukosekonzentrationen</i> 67	
4.3.2	<i>Destabilisierung der SeP-mRNA in INS-1-Zellen durch Hochglukose</i>	73
4.3.3	<i>Inhibition der SeP-Genexpression in murinen Inseln durch Hochglukose</i>	74
4.3.4	<i>Einfluss von Hydroperoxiden auf die SeP-Expression</i>	75
4.3.5	<i>Einfluss von Streptozotocin auf die SeP-Genexpression in INS-1-Zellen</i>	78
4.3.6	<i>Erhöhung der pankreatischen SeP-Expression in streptozotocinbehandelten Mäusen</i> 79	
5	DISKUSSION	81
5.1	DIE BEDEUTUNG REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES FÜR DIE PANKREATISCHE BETAZELLE .	81
5.2	DIE LOKALISATION UND EXPRESSION VON SEP IM PANKREAS.....	84
5.3	REGULATION DER SEP-EXPRESSION IN PANKREATISCHEN BETAZELLEN.....	85
5.3.1	<i>Regulation der SeP- Expression durch Selen- und Glukoseverbindungen</i>	85
5.3.2	<i>Regulation der SeP-Expression durch Streptozotocin</i>	88
5.4	INTERAKTION DES SELENS, SEP UND DIABETES MELLITUS TYP 2.....	89
6	SCHLUSSFOLGERUNGEN	93
7	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	95

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Intestinale Glukoseabsorption.....	3
Abb. 2: Molekularer Mechanismus der Insulinsekretion bei Nagern (vereinfacht)	6
Abb. 3: Hormonelle Einflüsse auf die Insulinsekretion in der Betazelle (Auszug)	7
Abb. 4: Produktion und Abbau von ROS/RNS in der pankreatischen Betazelle	12
Abb. 5: Wirkungen des STZ im Tiermodell.....	17
Abb. 6: Schematische Darstellung des Metabolismus von Selenverbindungen.....	20
Abb. 7: Darstellung der Biosynthese von Selenoproteinen in Eukaryonten	22
Abb. 8: Schematische Darstellung der mRNA des humanen Selenoprotein P	25
Abb. 9: Beispiel für Agarosegelbanden einer mRNA-Isolation unter UV-Licht	46
Abb. 10: Beispiel für eine Schmelzkurve der Realtime-PCR.....	50
Abb. 11: Agarosegelbanden einzelner PCR-Produkte unter UV-Licht	51
Abb. 12: Vergleich der Expression von SeP und GPx1 in primären Rattengeweben ..	53
Abb. 13: Nachweis von Selenoprotein P mittels quantitativer Realtime-PCR	54
Abb. 14: Immunhistochemie muriner Pankreata (40X).....	55
Abb. 15: Immunfluoreszenz muriner Pankreata (200X)	56
Abb. 16: Western Blot auf SeP an primären Rattengeweben und INS-1-Zellen	57
Abb. 17: Western Blot auf SeP an primären Rattengeweben und INS-1-Zellen	58
Abb. 18: Western Blot Etablierung auf SeP in INS-1-Zellen.....	58
Abb. 19: Einfluss der Selenverbindungen auf die Viabilität der Ratten-Insulinoma-Zellen	60
Abb. 20: Einfluss von Selenverbindungen auf die Viabilität der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1	61
Abb. 21: Einfluss von Glukose auf die Viabilität der INS-1-Zellen.....	62
Abb. 22: Einfluss der STZ-Konzentrationen auf die Viabilität der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1.....	63
Abb. 23: Einfluss der STZ-Konzentrationen auf die Viabilität der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1.....	64
Abb. 24: Einfluss der Hydroperoxide auf die Viabilität der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1	65
Abb. 25: Einfluss von tert-Buthylhydroperoxid auf die Viabilität der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1 bei Zugabe von Selenverbindungen.....	66
Abb. 26: Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Viabilität der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1 bei Zugabe von Selenverbindungen	67
Abb. 27: Modulation der SeP-Expression in der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1 durch Selenverbindungen und Glukose.....	69
Abb. 28: Modulation der PGC1 α -Expression in der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1 durch Selen und Glukose.....	69
Abb. 29: Modulation der GPx1-Expression in der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1 durch Selen und Glukose.....	70
Abb. 30: Regulation der SeP-Promotoraktivität durch Selen und Glukose	71
Abb. 31: Einfluss von Selenat und Glukose auf die SeP-Proteinexpression in INS-1-Zellen	72
Abb. 32: Proteinexpression des SeP in 40fach konzentrierten Überständen.....	73
Abb. 33: Destabilisierung der SeP-mRNA.....	74

<i>Abb. 34: Einfluss der Glukosekonzentrationen auf die SeP-mRNA-Expression in isolierten murinen Inseln</i>	<i>75</i>
<i>Abb. 35: Modulation der SeP-mRNA-Expression in der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1-Zellen durch Wasserstoffperoxid</i>	<i>76</i>
<i>Abb. 37: Modulation der PGC1α-mRNA-Expression in der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1-Zellen durch Wasserstoffperoxid</i>	<i>77</i>
<i>Abb. 36: Proteinexpression des SeP nach Stimulation mit H₂O₂</i>	<i>77</i>
<i>Abb. 38: Modulation der SeP-mRNA-Expression in INS-1-Zellen durch STZ</i>	<i>78</i>
<i>Abb. 39: Modulation der pankreatischen SeP-Expression in STZ-Mäusen.....</i>	<i>80</i>
<i>Abb. 40: Kausaler Zusammenhang zwischen erhöhten mitochondrialen ROS-Konzentrationen, oxidativem Stress, Betazell dysfunktion und Apoptose</i>	<i>82</i>

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Auswirkungen auf die Gesundheit, die mit unterschiedlichen Selenkonzentrationen im Blut verbunden sind (94)</i>	<i>19</i>
<i>Tabelle 2: Humane Selenoproteine und ihre Funktionen (Auswahl)</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 3: Primersequenzen für die konventionelle PCR von rat-HPRT und rat-SeP..</i>	<i>48</i>
<i>Tabelle 4: Primersequenzen für die Realtime-PCR Gene der Ratte</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 5: Primersequenzen für die Realtime-PCR Gene der Maus.....</i>	<i>50</i>

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Der Diabetes mellitus stellt eine Stoffwechselerkrankung mit dem Leitbefund der chronischen Hyperglykämie dar. Diese entsteht durch eine Störung der Insulinsekretion bzw. durch eine verminderte Insulinwirkung an den Zielgeweben (1). Der Typ 2 macht dabei mit über 90% den häufigsten Subtyp aus, wohingegen der Typ 1 lediglich für circa 5% der Erkrankungen verantwortlich ist (2). Die Hyperglykämie selbst stellt einen eigenständigen Risikofaktor für Gefäßkomplikationen dar, sodass kardiovaskuläre Ereignisse die häufigsten Todesursachen sind. Darüber hinaus ist der Diabetes mellitus die führende Ursache für Nierenerkrankungen, nicht-traumatische Amputationen der unteren Extremität sowie für neu aufgetretene Erblindung bei Erwachsenen (1). Die Mortalität ist in Abhängigkeit vom Ausmaß der Folgeerkrankungen um das Zweifache bis 27-fache erhöht (1). Aufgrund dieser Folgeerkrankungen und der stetigen Therapiebedürftigkeit der Patienten ergibt sich eine hohe volkswirtschaftliche Belastung. Trotz starker Bemühungen, die Inzidenz des Diabetes mellitus Typ 2 zu vermindern und die Erkrankung mittels Medikation und Lebensstiländerungen effektiver zu therapieren, hat die Prävalenz des Diabetes mellitus in den vergangenen Jahren stark zugenommen. Für 2010 wurde geschätzt, dass beinahe 30% der Menschen in den USA über 65 Jahren und fünf Prozent der Weltbevölkerung an Diabetes mellitus litten (3; 4). 2006 betrug die Prävalenz weltweit 246 Millionen. Bis 2030 wird sich diese Zahl schätzungsweise auf 439 Millionen Patienten erhöhen (5).

1.1.2 Physiologie und Regulation der Glukosehomöostase

Die Glukosehomöostase wird über komplexe Interaktionen streng reguliert, um einen konstanten Nüchtern-Blutzuckerwert von 70-99 mg/dl aufrechtzuhalten. Beteiligt sind u.a. die pankreatischen Betazellen und Alphazellen, Organe wie

der Gastrointestinaltrakt, die Leber sowie das Fettgewebe und Hormone wie Insulin, Glukagon, Inkretine (GLP-1, GIP) und Amylin.

Unter physiologischen Bedingungen erfolgt die endogene Glukosefreisetzung zwischen den Mahlzeiten durch Abbau der gespeicherten Glykogenvorräte aus der Leber (6) und durch Glukoneogenese in den Nieren (7; 8). Im nüchternen Zustand erhält das Gehirn einen Anteil von ca. 45-60%, das Splanchnikusgebiet (Leber und Magendarmtrakt) ca. 25%. Weitere 25% werden insulinabhängigen Geweben, v.a. der Muskulatur und in geringerem Ausmaße dem Fettgewebe zugeführt (7). Die endogene Glukoseproduktion zur Aufrechterhaltung einer basalen Glukosezufuhr erfolgt zu ca. 85% in der Leber durch gleichmäßige Anteile von Glykogenolyse und Glukoneogenese, die restlichen 15% werden renal produziert (9). Diese Energielieferanten werden postprandial durch die nutritive Glukoseaufnahme ergänzt (10). Das Gehirn, die Skelettmuskulatur, die Nieren, das Fettgewebe, der Gastrointestinaltrakt und die Leber sind initial in die Regulation des Glukosehaushaltes involviert, indem sie die aus dem Darm absorbierte Glukose aufnehmen, speichern und bei Bedarf sezernieren. Dabei erhält in der postprandialen Phase die Leber auf direktem Weg ca. 30% der intestinal absorbierten Glukose, die übrigen 70% werden der systemischen Zirkulation zugeführt und von dort aus unter den weiteren Geweben und Organen, wie in Abb.1 dargestellt wird, aufgeteilt. Von der Glukose, welche in die systemische Zirkulation übertragen wird, wird wiederum ein Gesamtteil von 20% als Glukose oder Stoffwechselprodukte, wie z.B. Alanin, zurück zur Leber transportiert (7).



Abb. 1: Intestinale Glukoseabsorption

Nach der intestinalen Glukoseabsorption werden 30% der aufgenommenen Glukose der Leber zugeführt. Die restlichen 70% werden der systemischen Zirkulation zugeführt und von dort aus weiter in den angegebenen Mengen an die Organe verteilt. Adaptiert nach (7)

Die Glukoseaufnahme in die Zellen erfolgt über transmembranäre Transportproteine aus der Familie der GLUT (Glukosetransporter) und SGLT (natriumabhängige Glukosetransporter). 50% der endogenen und exogen bereitgestellten Glukose kommen dabei dem Gehirn zu Gute, 25% dem Splanchnikusgebiet und die letzten 25% stehen insulinabhängigen Geweben wie der Skelettmuskulatur und Fettgewebe zur Verfügung (9).

Glukose wird von der Skelettmuskulatur insulinabhängig entweder unmittelbar als Energielieferant verwendet oder in Form von Glykogen gespeichert (11). Das Fettgewebe reguliert die Freisetzung freier Fettsäuren und von gespeicherten Triacylglyceriden (TAG). Diese erhöhen die Glukoneogenese und beeinflussen die Insulinsensitivität in Leber und Muskulatur (9). Ebenfalls zur Glukoneogenese beitragend sind die Nieren. Ab einem Blutzuckerwert von 180 mg/dl entsteht eine Glukosurie (12).

Neben Insulin sind weitere Hormone in die Glukosehomöostase involviert. Nach nutritiver Glukosezufuhr wird durch die steigenden Blutzuckerwerte die Insulinsekretion stimuliert, welche die Glukoseaufnahme im Splanchnikusgebiet und peripher verstärkt und so die endogene Glukoseproduktion supprimiert. Insulin führt ferner zu einer akzelerierten Glukoseaufnahme in Skelettmuskulatur und Fettgewebe und vereinfacht die Konversion zu Speicherformen der Glukose (13). Glukagon, produziert von den pankreatischen Alphazellen, fördert als Gegenspieler von Insulin die Glukoneogenese und die Glykogenolyse (13). Adrenalin steigert die Glykogenolyse und die Glukoneogenese (14). Kortikosteroide erhöhen den Blutglukosespiegel, indem sie indirekt die Glukoneogenese steigern und die Glykolyse und Glukoseaufnahme in die Skelettmuskulatur vermindern (15). Die Inkretine GLP-1 (Glucagon-like Peptide 1) und GIP (Glucose-dependent insulinotropic polypeptide) stellen glukoseabhängige Hormone dar, welche nur sezerniert werden, wenn der Blutzucker postprandial ansteigt und stimulieren indirekt die Insulinsekretion zur Wiederherstellung normoglykämischer Werte (15).

1.1.3 Insulinsekretion und Insulinwirkung

Das Peptidhormon Insulin stellt das einzige Hormon dar, das den Blutzuckerspiegel senken kann. Es wird in den pankreatischen Betazellen gebildet und zum einen unabhängig von äußeren Faktoren, zum anderen abhängig von der Nahrungszufuhr in komplexen Signalwegen sezerniert. Den molekularen Mechanismus der Insulinsekretion bei Nagern zeigt Abbildung 2. Glukose gelangt v.a. durch den insulinunabhängigen Glukosetransporter GLUT2 beim Nager und durch GLUT1 und GLUT3 beim Menschen abhängig von der Höhe des Blutzuckerspiegels in die Betazelle (16; 17). Humane Betazellen exprimieren ebenfalls GLUT2, jedoch in ca. 100fach niedrigerer Menge als Ratten, sodass der Großteil des Glukosetransports über GLUT1 und GLUT3 erfolgt (16).

Der intrazelluläre Abbau der Glukose in der Betazelle erfolgt über verschiedene Stoffwechselwege (siehe Abb. 2). Dadurch steigt der Adenosintriphosphat

(ATP)-Spiegel in der Betazelle an. Die erhöhte ATP-Konzentration vermindert die Kaliumpermeabilität eines ATP-sensitiven Kalium-Kanalproteins, dem Kir (*Kalium-Inward-Rectifier*), mit konsekutiver erhöhter intrazellulärer Kaliumkonzentration. Eine Depolarisation wird ausgelöst (18; 19). Calcium gelangt spannungsabhängig in die Betazelle, welches eine Membranfusion der Insulinvesikel zur Folge hat. Beim Menschen kommen unterschiedliche spannungsabhängige Calciumkanäle vom T-Typ vor, welche einen transienten Calciumfluss verursachen (20) und in humanen Betazellen vermutlich eine Bedeutung als Schrittmacher für die Generierung von Aktionspotentialen (21) besitzen. Durch Calcium aktivierte Kaliumkanäle (BK-Kanäle) sind essentiell für die Repolarisation des Aktionspotentials in den humanen Betazellen. Sie öffnen sich zu Beginn der Depolarisation. Durch ihre Aktivierung wird ebenfalls eine Calciumkanalöffnung hervorgerufen. In Studien konnte gezeigt werden, dass Iberiotoxin, ein Ionenkanalgift, die glukosestimulierte Insulinsekretion (GSIS) über die spannungsabhängigen Kaliumkanäle K_v2 beeinflusst, sodass gerade diese Ionenkanäle ein pharmakologisches Ziel zur Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 sein könnten (22). Nach innen rektifizierende Kaliumkanäle verursachen durch hyperpolarisierende Spannungen einen zunehmend nach innen gerichteten Ionenstrom (23). Eine Inhibition verursacht eine Depolarisation und Stimulation von Aktionspotentialen in Betazellen, welche bereits gegenüber Glukose exponiert sind. Entgegengesetzt jedoch erhöht ein Polymorphismus von KCNJ15, welches für $K_{i,4.2}$ kodiert, das Risiko für DM2. Die mRNA-Level dieses Kanals sind erhöht, sodass durch die erhöhte Kaliumleitfähigkeit und die reduzierte Menge an Aktionspotentialen die Insulinsekretion vermindert wird und daher das Risiko für DM2 ansteigt (21).

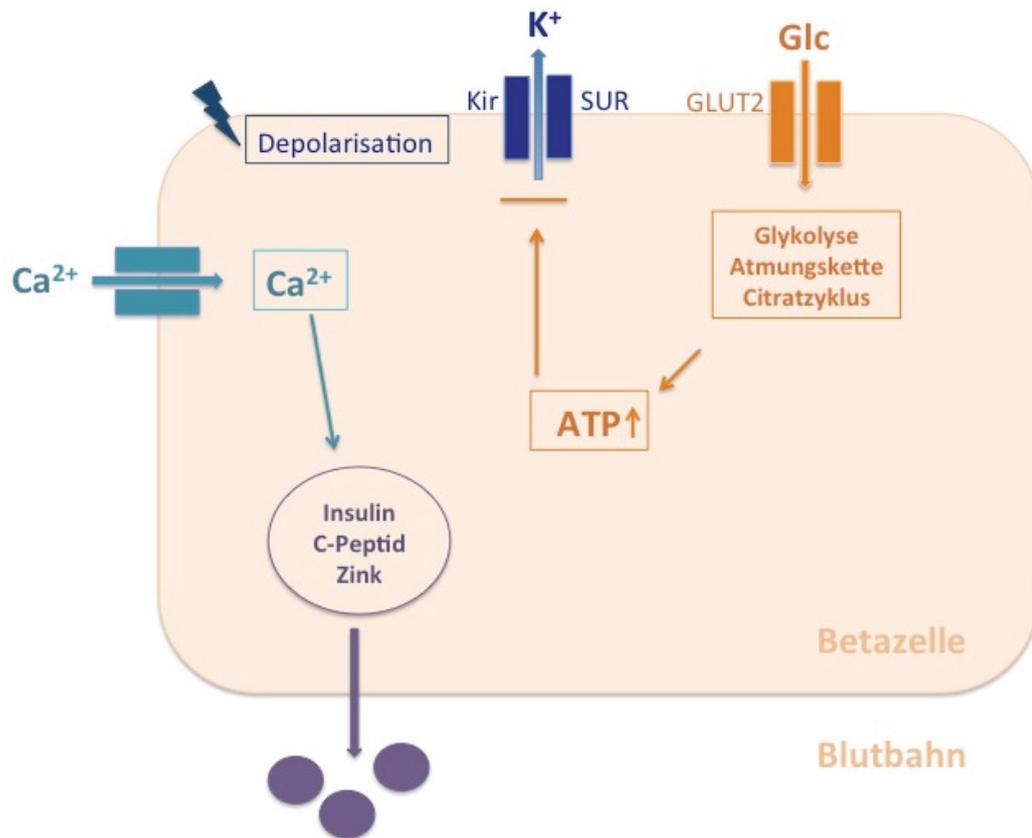


Abb. 2: Molekularer Mechanismus der Insulinsekretion bei Nagern (vereinfacht)

Kir: Kalium-Inward-Rectifier, GLUT2: Glukosetransporter Typ 2, ATP: Adenosintriphosphat
 Glukose gelangt durch GLUT 2 in die pankreatische Betazelle. Intrazellulär erfolgt ein Abbau über die Glykolyse, den Citratzyklus sowie über die Atmungskette. Dadurch steigen die Konzentrationen an ATP. Der ATP-Anstieg vermindert die Kaliumpermeabilität des Kir-Kanals. Dadurch vermindert sich die intrazelluläre Kaliumkonzentration und eine Depolarisation wird ausgelöst. Darauf gelangt Calcium in die Betazelle, welches eine Membranfusion der Insulinvesikel zur Folge hat. Der Vesikelinhalt (Insulin, Zink, C-Peptid) wird freigesetzt und gelangt in die systemische Zirkulation.

Neben Ionenkanälen stellen Hormone und Neurotransmitter eine weitere Komponente in der Regulation der Insulinsekretion dar. Sie modulieren in den Betazellen sowohl die Exozytose der Insulingranula als auch das Membranpotential bzw. die elektrische Aktivität (24). Somatostatin inhibiert die Insulinsekretion durch einen direkten Einfluss auf die Exozytose (Abb. 3). Das Hormon repolarisiert die Betazelle und inhibiert den Calciumeinstrom durch die P/Q-Calciumkanäle (25). Acetylcholin stimuliert die Insulinsekretion durch Aktivierung des muskarinergen Acetylcholinrezeptors M3, welcher wiederum die Phospholipase C aktiviert (26).

Als ein weiteres Hormon potenziert das Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) die glukosestimulierte Insulinsekretion (GSIS) in humanen pankreatischen Inseln

(27). Unter anderem steigert GLP-1 den inhibitorischen Effekt von Glukose auf die K_{ATP} -Kanal-Aktivität und verstärkt die calciumabhängige Exozytose durch eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration via Adenylatzyklase und Proteinkinase A (Abb.3) (28). Darüber hinaus steigern sowohl Glukose als auch GLP-1 die Transkription und damit die Biosynthese des Insulins. Konsekutiv erhöht sich auf diesem Weg ebenfalls die Insulinsekretion (29; 30; 23; 31).

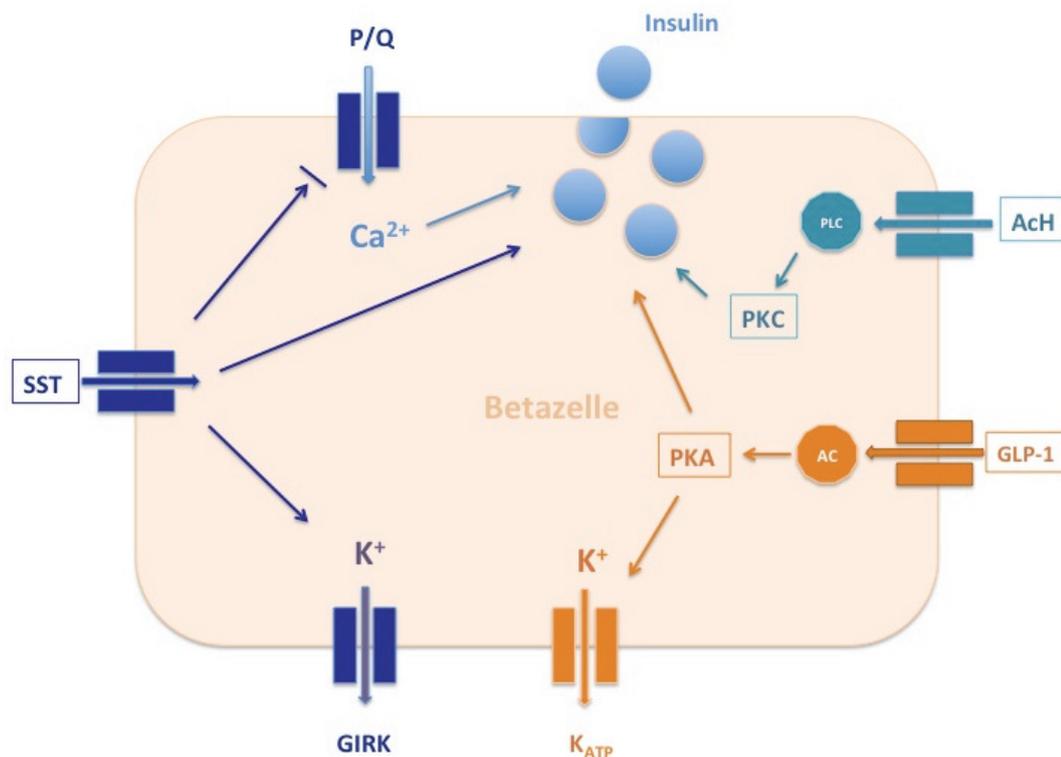


Abb. 3: Hormonelle Einflüsse auf die Insulinsekretion in der Betazelle (Auszug)

Somatostatin, Acetylcholin und GLP-1 beeinflussen die Insulinsekretion über Veränderungen der elektrischen Aktivität in der pankreatischen Betazelle und über direkte Beeinflussung der Insulingranula. Somatostatin repolarisiert über seine Rezeptoren (SST) bzw. über eine Aktivierung der GIRK-Kanäle (G-Protein gekoppelte einwärts rektifizierende Kaliumkanäle) die Betazelle. Darüberhinaus inhibiert Somatostatin den Calciumeinstrom durch P/Q-Calciumkanäle. Acetylcholin aktiviert den muskarinergen Acetylcholinrezeptor M3, welcher wiederum die Phospholipase C aktiviert. Diese hat direkten Einfluss auf die Sekretion der Insulingranula. GLP-1 führt durch Aktivierung der Adenylatzyklase zu einer Konzentrationssteigerung von cAMP, welches konsekutiv die Proteinkinase A aktiviert. Diese steigert den Kaliumausstrom durch K_{ATP} -Kanäle und stimuliert ebenso die Insulinsekretion. Modifiziert nach (21)

Störungen in jedem Unterbereich dieser komplexen Signalwege können initial zu einer gestörten Glukosetoleranz führen, welche bei Progredienz zu einem

Diabetes mellitus Typ 2 führen kann. Die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 setzt sich aus vielen komplexen Faktoren zusammen, die bis heute noch nicht alle bekannt sind.

1.1.4 Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2

Physiologischerweise lässt mit zunehmendem Alter die Insulinsekretion nach und nimmt die Insulinresistenz zu, ohne dass sich ein manifestes Krankheitsbild entwickelt (6). Eine häufige Vorstufe des Diabetes mellitus Typ 2 stellt die Insulinresistenz im Rahmen des metabolischen Syndroms dar. Weitere Ursachen für dieses und damit für den Diabetes mellitus Typ 2 sind Übergewicht, eine verminderte Insulinwirkung, eine Insulinsekretionsstörung sowie eine erhöhte endogene Glukoseausgabe (EGO) (32).

Nach der WHO-Klassifikation von 1999 liegt ein metabolisches Syndrom vor, wenn entweder ein Diabetes mellitus, eine gestörte Glukosetoleranz oder ein pathologischer Nüchternblutzucker bzw. Insulinresistenz in Kombination mit einer Hypertonie, einer Dyslipoproteinämie oder einer viszeralen Adipositas auftritt. Es resultiert eine muskulär verminderte Insulinempfindlichkeit (6). Als Reaktion des Körpers erfolgt eine Hyperinsulinämie, die die erhöhten Blutzuckerwerte verhindern kann. Allerdings verstärkt diese Hyperinsulinämie die viszerale Adipositas, da durch die anabole Wirkung des Insulins eine Gewichtsreduzierung erschwert wird (6). Durch eine begleitende Dyslipoproteinämie erhöht sich bereits vor Manifestation des Diabetes mellitus Typ 2 das Risiko einer Arteriosklerose mit Makroangiopathie (6). Die Gründe für die Zunahme der Krankheitsprävalenz liegen zum einen in Überernährung und verminderter körperlicher Aktivität. Zum anderen ermöglicht es die verlängerte Lebenserwartung der Menschen, Diabetesmanifestationen im höheren Alter noch zu entwickeln (6).

1.1.5 Aufbau, Masse und Anpassung der pankreatischen Betazelle

Im humanen Pankreas kommen ca. 1.000.000 Inseln vor (33). 50% der dort vorhandenen Zellen sind Betazellen, 35% bis 40% Alphazellen und die

restlichen 10% bis 15% der Zellen produzieren Somatostatin (34). Die Inseln machen zwar nur 1-2% des pankreatischen Volumens aus, erhalten aber ca. 10% des Blutflusses (35). In humanen Pankreata befinden sich die Betazellen in direkter Nachbarschaft zu Nicht-Betazellen, sodass eine parakrine Interaktion erleichtert wird (24). Die Inselarchitektur der pankreatischen Betazellen beim Nager weist eine andere räumliche Anordnung auf: Ein Kern von Betazellen ist umgeben von einem diskontinuierlichen, ein- bis dreireihigen Mantel von Nicht-Betazellen. Im physiologischen Zustand machen die Betazellen 55% der murinen Inselmasse aus, wobei sich ca. 72 Betazellen pro Insel befinden (36).

Die Betazell-Masse verändert sich sowohl mit dem Alter als auch mit verschiedenen metabolischen Anforderungen im Laufe des Lebens (37). Sie wird hauptsächlich durch vier Faktoren reguliert:

1. Durch die Replikation, eine mitogene Teilung existierender Zellen.
2. Durch die Neogenese von „neuen“ Betazellen ausgehend von pankreatischen dukталen Epithelzellen (38; 39; 40).
3. Als dritter Faktor trägt die Betazell-Größe selbst zur Modulation der Masse bei.
4. Schließlich spielt die Apoptose der Betazellen bei der physiologischen Regulation und in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 eine bedeutende Rolle (39; 41; 42).

Bei Erwachsenen ist eine Apoptoserate von 0,5% der Betazellen physiologisch. Diese wird ausbalanciert durch Replikation und vereinzelte Neogenese (43; 44). Die Betazell-Größe bleibt relativ konstant und die Masse wird auf einem optimalen Level gehalten. Senioren weisen eine verminderte Betazell-Masse auf, da die Apoptoserate die Replikation bzw. Neogenese übersteigt. Dies wird als einer der Gründe für das erhöhte Risiko von Senioren betrachtet, an Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken. Ebenso ist die Betazell-Masse in der Lage, sich an verschiedene metabolische Anforderungen anzupassen. Bei Erwachsenen adaptiert sich die Betazell-Masse an Veränderungen der metabolischen Homöostase durch Übergewicht und anhaltende Insulinresistenz. Beim Diabetes mellitus Typ 2 findet man eine 40-60%ige Abnahme der Betazell-Masse (36) durch eine erhöhte Apoptoserate (45; 46).

Diese kann im weiteren Verlauf nicht ausgeglichen werden, da die Replikationsrate abnimmt (47; 42; 44; 48). Einen weiteren Schädigungsmechanismus der pankreatischen Betazellen stellt das Ungleichgewicht der Redoxreaktionen durch Glukolipotoxizität dar. Durch diese Mechanismen, auf die in Kapitel 1.2 noch genauer eingegangen wird, entstehen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies, welche mit den Signaltransduktionswegen der pankreatischen Betazelle interferieren und so zu einer Dysfunktion bis hin zur Apoptose der Zellen führen können (49).

1.2 Nitrosativer und oxidativer Stress

1.2.1 Entstehung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies

Als oxidativen Stress bezeichnet man ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien zugunsten der Oxidantien. Dadurch ist die Gefahr oxidativer Zellschädigungen gegeben, welche an der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen – z.B. Diabetes mellitus Typ 2 – beteiligt sind. Oxidativer Stress wird durch reaktive Sauerstoff- (ROS) und nitrosativer Stress durch reaktive Stickstoffspezies (RNS) hervorgerufen, welche aus endogenen und exogenen Quellen stammen. Sie sind in der Lage, Biomoleküle wie die DNA, Proteine oder Lipide zu oxidieren, ihre Funktion zu verändern und Zellen zu schädigen (50; 51). Darüber hinaus wird vermutet, dass ein Teil der schädlichen Effekte von chronischer Hyperglykämie auf die Betazellfunktion und Betazellintegrität, die sogenannte Glukotoxizität, durch oxidativen Stress verursacht wird (52; 53).

Der Elektronentransport in der mitochondrialen Atmungskette stellt eine Hauptquelle der endogenen Bildung von ROS dar (54). Durch den erhöhten metabolischen Fluss durch die Atmungskette bei hohen Glukose- und Lipidkonzentrationen wird das Superoxidanion vermehrt gebildet (Abb. 4) (54; 49; 55). Kann es nicht schnell genug durch die Superoxiddismutase zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid disproportioniert werden, reagiert es mit Stickstoffmonoxid, welches z.B. durch die von IL-1 β getriggerte iNOS produziert wird, zu Peroxynitrit (49). Als Endprodukte entstehen daraus Nitrat sowie das hochreaktive Hydroxylradikal. Die glukoseinduzierte Betazell-

Dysfunktion ist *in vivo* mit erhöhten mitochondrialen Konzentrationen dieses Radikals assoziiert (56). Des Weiteren erfolgt über die NADPH-Oxidase in phagozytären Zellen des Immunsystems wie den Makrophagen eine Produktion an Superoxid, um pathogene Organismen abzuwehren (54). Die genannten Stoffwechselwege werden durch eine Überproduktion an mitochondrialem Superoxid verstärkt. Durch Hyperpolarisation der Mitochondrien erfolgt eine partielle Inhibierung des Elektronentransportes im Komplex III der Atmungskette, wodurch sich im Coenzym Q Elektronen akkumulieren. Dies wiederum bedingt eine partielle Sauerstoffreduktion, woraus Superoxid entstehen kann (57; 58).

1.2.2 Abwehrmechanismen gegen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies

In Eukaryonten existieren verschiedene Hauptgruppen an antioxidativen Enzymen: Superoxiddismutasen (SOD), Katalase und Glutathionperoxidasen (GPx) (59). Als weitere wasserstoffperoxidabbauende Enzyme wurden in den letzten Jahren die Peroxiredoxine charakterisiert, welche vor allem in Mitochondrien und Cytosol von Bedeutung sind (60). Wie Abb. 4 zeigt, katalysiert die Superoxiddismutase die Disproportionierung des Superoxidanions zu Wasserstoffperoxid. Dieses kann nun entweder durch Glutathionperoxidasen oder durch die Katalase umgewandelt werden, sodass Wasser und Sauerstoff entstehen (51). Die Enzymaktivität der SOD, Katalase und z.T. der GPx ist von der Höhe der jeweiligen mRNA und von der Biosynthese der Enzyme in den einzelnen Geweben abhängig (55).

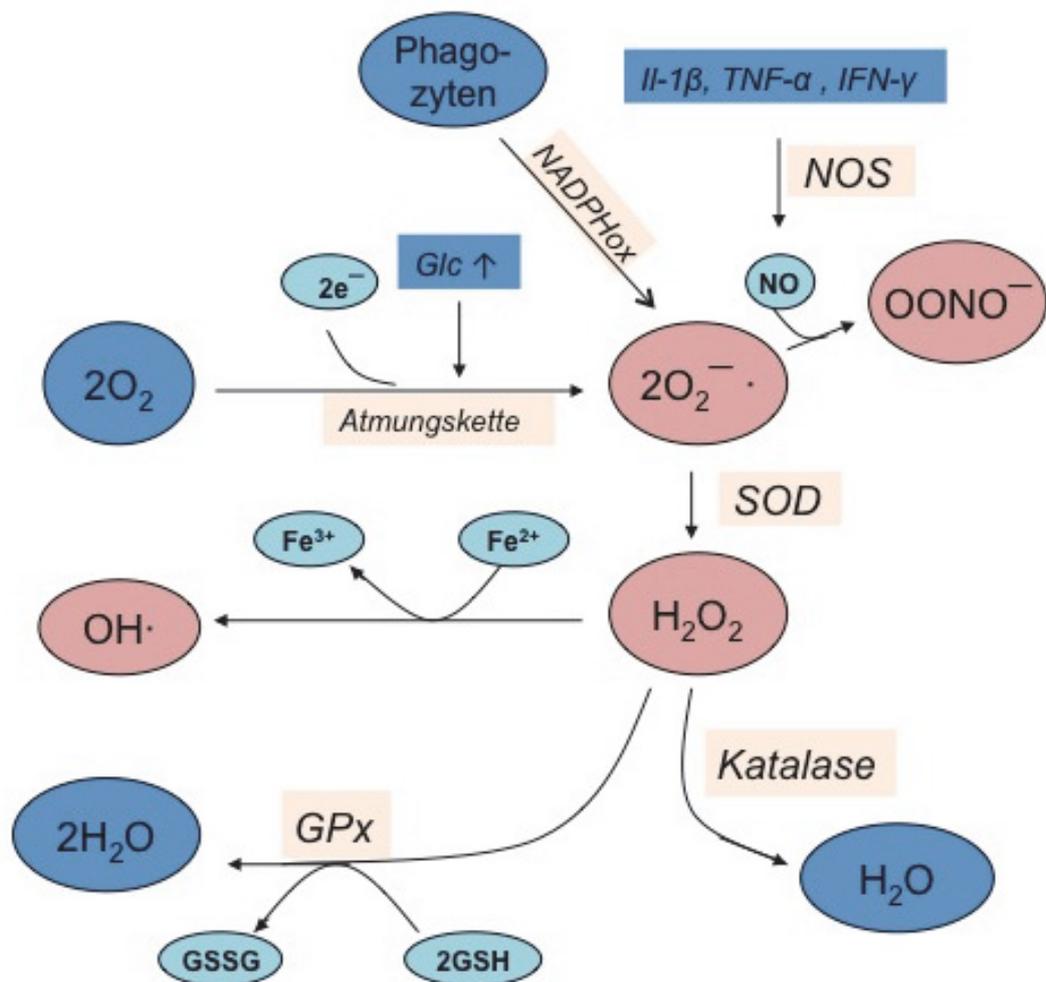


Abb. 4: Produktion und Abbau von ROS/RNS in der pankreatischen Betazelle

OH^\cdot :	Hydroxylradikal
H_2O_2 :	Wasserstoffperoxid
GSSG:	Glutathion oxidiert
GSH:	Glutathion reduziert
NADP/H:	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
SOD:	Superoxiddismutase
GPx:	Glutathionperoxidase
$O_2^{\cdot-}$:	Superoxid
$OONO^-$:	Peroxynitrit

1.2.3 Antioxidative Kapazität der Betazelle

Insulinproduzierende Betazellen sind nicht in der Lage, die Biosynthese ihrer Superoxiddismutasen, Katalase oder Glutathionperoxidasen durch eine verstärkte Genexpression an einen adäquaten Bedarf im Rahmen von

zellulärem Stress anzupassen (55). Sie gehören zu den am geringsten mit antioxidativen Enzymen ausgestatteten Zellen: Die Enzymaktivitäten von Katalase und Glutathionperoxidasen, welche im Stande sind, Wasserstoffperoxid zu entgiften, betragen nur 1% der in den Hepatozyten gemessenen Werte. Superoxiddismutasen (SOD) hingegen liegen demgegenüber in moderaten, aber physiologisch ausreichenden Mengen vor (55; 61; 62). Daher wird Wasserstoffperoxid schneller gebildet als es entgiftet werden kann und kann zu einer Zellschädigung führen.

Die geringe Expression und Aktivität der hauptsächlichen antioxidativen Enzyme können mit dafür verantwortlich sein, dass Betazellen sowohl für die Signalwirkung als auch die Zytotoxizität reaktiver Sauerstoffspezies in besonderem Maße sensitiv sind (55; 63; 64). Eine Überexpression der Glutathionperoxidase schützt Betazellen vor *Fas*-vermittelter Apoptose und erhöht den Widerstand gegenüber Hypoxie (65). Andererseits konnte im transgenen Mausmodell mit einer Überproduktion der zellulären GPx1 eine chronische Hyperinsulinämie ausgelöst werden, welche in einer Insulinresistenz und anderen Symptomen des metabolischen Syndroms resultierte (62). Paradoxerweise können eine erhöhte Expression bzw. Aktivität der GPx und anderer antioxidativer Enzyme in Betazellen unterschiedliche metabolische Effekte in Betazellen *in vivo* auslösen (64). Die Folgen sind u.a. abhängig vom Redoxstatus des Organismus bzw. Gewebes. Die Überexpression der Katalase z.B. verschlimmert den Ausbruch von Typ 1 Diabetes mellitus in normalgewichtigen diabetischen Mäusen. Durch eine globale Überexpression der GPx1 kann ein Phänotyp ähnlich dem des Diabetes mellitus Typ 2 induziert werden (64). Andererseits verbessert die betazellspezifische Überexpression der GPx1 die Hyperglykämie bei *db/db* Mäusen und schützt die Betazellen vor streptozotocininduzierten Schäden (66). Darüber hinaus trägt ein Anstieg der Expressionslevel antiapoptotischer Proteine und antioxidativen Enzymen wie GPx1 und SOD zum Überleben hypertrophischer Betazellen während chronischer Hyperglykämie bei (67).

In neueren Studien wurde zusätzlich die Gruppe der Peroxiredoxine charakterisiert, welche thioredoxinabhängige Peroxidreduktasen darstellen und

in den meisten Zelltypen u.a. in den pankreatischen Inseln exprimiert werden. Es konnte weiterhin beobachtet werden, dass diese Enzymfamilie in pankreatischen Betazellen durch Stimulation mit zellulären Stressoren wie Streptozotocin oder Alloxan vermehrt exprimiert werden und somit ein weiteres antioxidatives Abwehrsystem der pankreatischen Betazelle darstellen (60).

1.2.4 Auswirkungen reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies auf die pankreatische Betazelle

Eine hyperglykämieinduzierte Überproduktion des Superoxids ist das Bindeglied zwischen hohen Glukosekonzentrationen und den Stoffwechselwegen, welche zu oxidativen Schäden führen (68). In der pankreatischen Betazelle entstehen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies, die fortschreitende Zellschädigungen hervorrufen können u.a. durch chronische Hyperglykämie, proinflammatorische Zytokine (z.B. IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-1 β) und freie Fettsäuren (z.B. Palmitat). Superoxid, Hydroperoxide (z.B. Wasserstoffperoxid), Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit schädigen in hohen Konzentrationen die Betazellen. Dies führt über eine herabgesetzte Öffnungswahrscheinlichkeit der K_{ATP} -Kanäle zu einer verminderten ATP-Produktion, welche die glukosestimulierte Insulinsekretion (GSIS) (69; 70) verringert und eine Apoptose bedingen kann (55; 71; 72; 73). Durch geringe Konzentrationen an Wasserstoffperoxid von 1-4 $\mu\text{mol/l}$ bei 3 mM Glukose wird die Insulinsekretion allerdings stimuliert. Eine Zugabe von exogenen Radikalfängern wie Katalase und N-Acetyl-L-Cystein hemmt die glukosestimulierte Wasserstoffperoxid-Produktion und die GSIS (63). Wasserstoffperoxid erfüllt daher die Kriterien eines intrazellulären *second messengers* und ist eines der metabolischen Signale für die Insulinsekretion.

Aus Wasserstoffperoxid bildet sich als Produkt der Fenton-Reaktion das reaktivere Hydroxylradikal. Dieses kann nicht weit von seinem Bildungsort diffundieren, bevor es unselektiv reagiert und verursacht daher Schädigungen in unmittelbarer Nähe des Entstehungsortes (49).

Eine Hyperglykämie führt zusätzlich zu einer erhöhten enzymatischen Konversion von Glukose zu Sorbitol mit begleitender Abnahme von NADPH (58). NADPH stellt ein Reduktionsäquivalent der Glutathion-Disulfidreduktase bei der Regeneration der reduzierten Form des Glutathions dar. Mittels der Glutathion-Disulfidreduktase wird Glutathiondisulfid unter NADPH-Verbrauch zu zwei Molekülen Glutathion reduziert. Eine Abnahme an NADPH kann daher aufgrund der fehlenden Glutathionregeneration oxidativen Stress durch intrazelluläre ROS induzieren oder aggravieren (58).

Darüber hinaus vermindert eine Überproduktion von Superoxid die Aktivität der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, welche für die Bereitstellung von NADPH verantwortlich ist. Zudem wird Sorbitol mittels der Sorbitoldehydrogenase zu Fructose umgesetzt, wodurch sich das NADH/NAD⁺-Verhältnis erhöht. Dadurch entstehen erhöhte Konzentrationen an Triosephosphaten, die wiederum zu einer verstärkten Synthese von Diacylglycerinen (DAG) führen. Erhöhte DAG-Konzentrationen aktivieren die Proteinkinase C, welche für verschiedene Pathologien der diabetischen Komplikationen anderer Organe verantwortlich ist (58). Eine Erhöhung der PKC- β -Isoform bedingt z.B. über eine verminderte NO-Produktion oder eine erhöhte Endothelin-1-Aktivität einen pathologischen Blutfluss in der Retina und in den Nierenglomeruli (74). Darüber hinaus inhibiert eine aktivierte PKC die insulinstimulierte Expression der mRNA der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (75).

Zusammenfassend lassen die vorliegenden Studien darauf schließen, dass das zelluläre Redoxgleichgewicht einen grundlegenden Einfluss auf Funktion und Viabilität der pankreatischen Betazellen besitzt: Einerseits werden transient gebildete ROS in niedrigen Konzentrationen als metabolische Signale für die GSIS benötigt, andererseits ist die bei Entzündungsvorgängen und chronischer Hyperglykämie stark erhöhte Produktion von ROS/RNS an Dysfunktion und Zerstörung der Betazellen beteiligt. Daher spielen diese Stressoren eine bedeutende Rolle in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2. Für die pankreatische Betazelle ist es essentiell, diese Verbindungen in engen Konzentrationen konstant zu halten.

1.3 Streptozotocin

Das Betazelltoxin Streptozotocin bedingt mit steigenden Konzentrationen eine verringerte Viabilität der INS-1-Zellen (Abb. 19). Streptozotocin besitzt durch Nutzung des Glukosetransporters GLUT2 eine zytotoxische Wirkung v.a. auf pankreatische Betazellen (76; 77; 78; 79). Die pankreatischen Betazellen besitzen im Vergleich zu anderen Zellen wie z.B. den Hepatozyten und renalen Zellen eine besonders hohe Dichte an GLUT2, sodass sie anfälliger auf Streptozotocin als andere Zellen reagieren (80; 81). Insulinunabhängige Betazelllinien sind hingegen gegenüber Streptozotocin unempfindlich. (82).

Die Betazellschädigung erfolgt dabei v.a. durch die DNA-alkylierende Aktivität des Methylnitrosoharnstoffrests (Abb.33) (83; 84). Durch Transfer der Methylgruppe auf die DNA-Moleküle wird die DNA letztendlich fragmentiert. Zusätzlich erfolgt eine Proteinglykosylierung, welche die Zellschädigung verstärkt (85). Kompensatorisch wird die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase zur Reparatur von DNA-Schäden überstimuliert. Es resultiert ein NAD⁺-Verbrauch und schließlich ATP-Aufbrauch. Durch den Verlust der Energielieferanten resultiert eine Nekrose der Betazellen sowie die Inhibition der Insulinbiosynthese und Insulinsekretion (86; 87; 88).

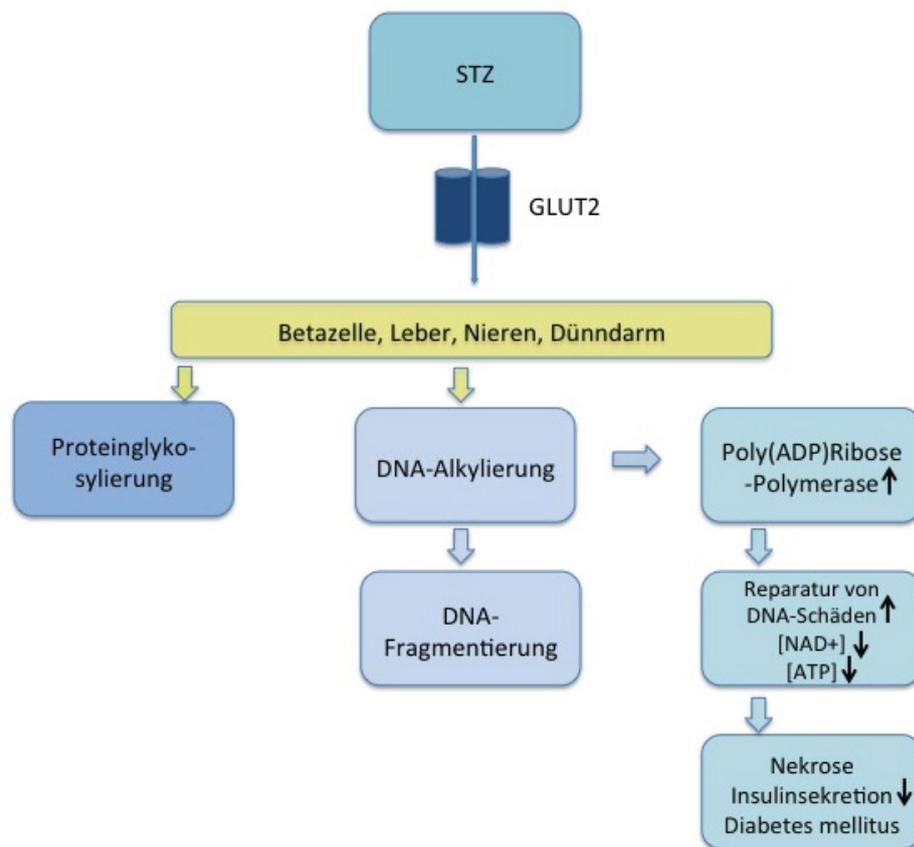


Abb. 5: Wirkungen des STZ im Tiermodell

Die Abbildung zeigt eine Auswahl verschiedener Wirkungen des Streptozotocins (STZ). STZ wird selektiv über den Glukosetransporter 2 (GLUT2) in die Betazelle, Leber, Nieren und Dünndarm aufgenommen. Es bedingt in den Zellen eine Proteinglykosylierung und eine DNA-Alkylierung. Durch die vermehrten Zellschäden wird die Poly(ADP)Ribose-Polymerase vermehrt stimuliert und DNA-Schäden repariert. Dies erfolgt jedoch unter Verbrauch von NAD⁺ und ATP, sodass die Zelle schließlich nekrotisch wird.

1.4 Das Spurenelement Selen

1.4.1 Allgemeines

Das Halbmetall Selen ist für den Menschen ein essentielles Spurenelement. Es wurde 1817 von dem Chemiker Jöns Jakob Berzelius entdeckt. Bereits moderate Mengen sind für den Menschen toxisch: die letale Dosis beträgt bei Erwachsenen 0,5-1g.

Erst Mitte des 20. Jahrhunderts wurden protektive Wirkungen des Selen auf den Organismus von Säugetieren bekannt. Durch Selensupplementation der Nahrung konnten Lebernekrosen bei Ratten verhindert werden (89; 90). In den 1970er Jahren wurde die Glutathionperoxidase 1 als erstes Selenoprotein in Säugetieren entdeckt.

Die Aminosäure Selenocystein (Sec) ist integraler Bestandteil der Glutathionperoxidase, die eine bedeutende Funktion beim zellulären Schutz vor oxidativen Noxen spielt (91; 92). Seitdem wurde die physiologische Funktion von Selen weiter erforscht und gegenwärtig sind 25 humane Selenocystein (Sec)-enthaltende Selenoproteine identifiziert, deren Funktionen nur zum Teil bekannt sind (93).

Hohe Konzentrationen von Selen finden sich in Fisch, Getreide und Gemüse wie z.B. Zwiebeln und Knoblauch (94). Die wesentliche Determinante des Selengehalts von Pflanzen ist der Selengehalt des Bodens, wodurch sich Unterschiede von 3 µg/d bis 7000 µg/d in der Selenversorgung von verschiedenen Bevölkerungen ergeben (94). In Deutschland beträgt die durchschnittliche Selenaufnahme ca. 35 µg pro Tag (95). Damit befindet sie sich im unteren Bereich der derzeit empfohlenen Tagesdosis von 30-70µg (94; 96; 97). Akute Selenmangelerkrankungen wie die Keshan-Krankheit, eine endemische Kardiomyopathie und Selenvergiftungen in Form einer Selenose treten selten auf (94). Weitere Effekte unterschiedlicher Selenkonzentrationen auf die menschliche Gesundheit zeigt Tabelle 1.

	Selen im Plasma [ng/ml]	Effekt(e)
Selenübersorgung	<i>>3200-7500</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ toxisch ▪ Tod
	<i><490-<640</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ selenbedingte Nebeneffekte ohne ernsthafte Toxizität
	<i>>250</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ selenbedingte Nebeneffekte ▪ Haarverlust, Dermatitis
	<i>160</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Schutz vor einigen Krebsarten ▪ erhöhtes Risiko für Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie
Adäquate Selenversorgung	<i>140</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Schutz vor einigen Krebsarten ▪ Reduktion totaler Mortalität
	<i>120</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Optimierung von SeP ▪ Schutz vor einigen Krebsarten ▪ Reduktion totaler Mortalität
	<i>80</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Optimierung der GPx
	<i>60</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Optimierung der DIO
Selendefizienz	<i>20</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <20-40ng/ml selendefiziente Krankheiten wie Keshan, Kashin-Beck, Kretinismus (mit Ioddefizienz)

Tabelle 1: Auswirkungen auf die Gesundheit, die mit unterschiedlichen Selenkonzentrationen im Blut verbunden sind (94)

1.4.2 Selenstoffwechsel

Der Metabolismus des Selen beim Menschen ist in Abb.5 vereinfacht dargestellt. Über die Nahrung aufgenommene organische Selenverbindungen (Selenocystein, Selenomethionin, Se-Methylselenocystein) sowie anorganische Selenverbindungen (Selenit und Selenat) werden über verschiedene Wege metabolisiert. Selenit und Selenat werden nicht-enzymatisch zu Selenodiglutathion und schließlich durch NADPH-abhängige Reduktasen zum zentralen Metaboliten Selenwasserstoff reduziert (98). Selenomethionin kann anstelle von Methionin unspezifisch in Proteine eingebaut werden. Abgebaut wird Selenomethionin mithilfe von Enzymen der Cysteinbiosynthese via Selenohomocystein und Selenocystathion zu Selenocystein (99). Selenocystein wiederum wird durch die Selenocystein-Lyase zu Alanin und Selenwasserstoff

weiter verstoffwechselt (100). Selen wird als 1- β -Methylseleno-N-acetyl-D-galactosamin und als Dimethylselenit sowie Trimethylselenium, einem Methylierungsprodukte des Selenwasserstoffs, ausgeschieden (101).

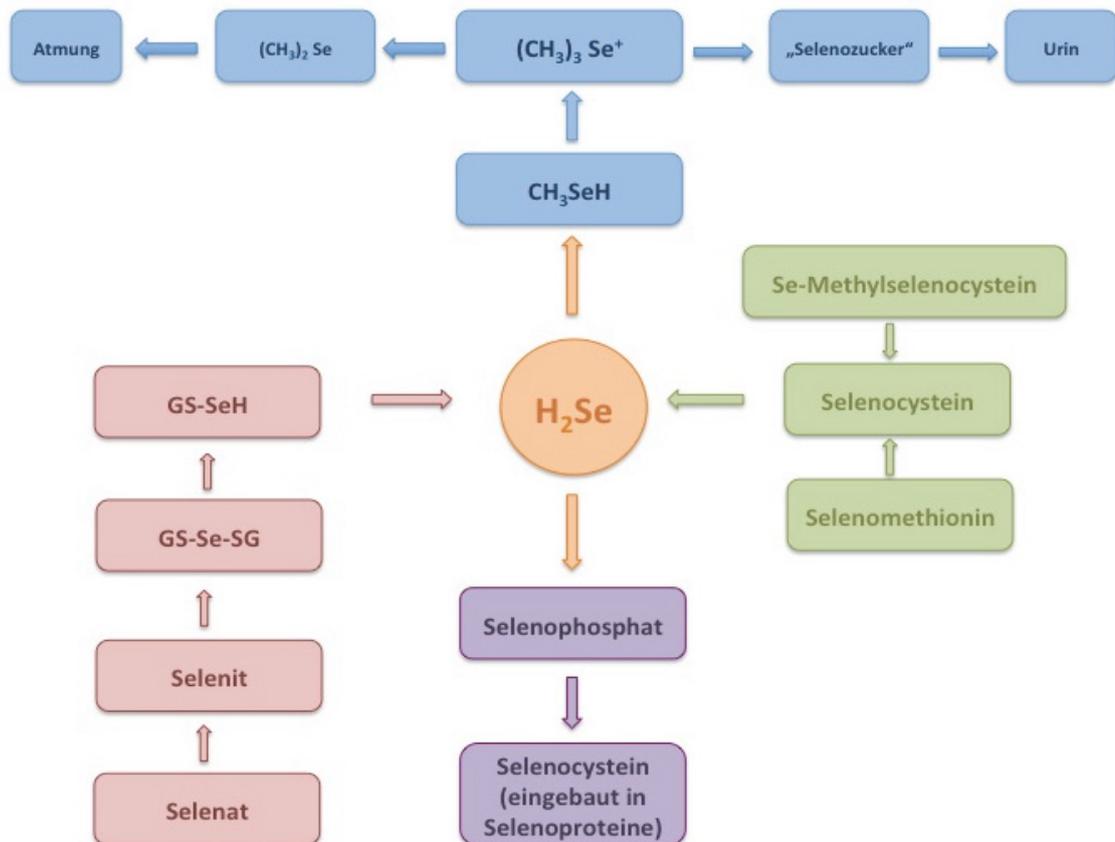


Abb. 6: Schematische Darstellung des Metabolismus von Selenverbindungen
modifiziert nach: (199) Einzelheiten siehe Text

1.5 Selenoproteine

Es existieren drei verschiedene Gruppen von Proteinen, die Selen enthalten:

1. Spezifische Selenoproteine, welche Selenocystein enthalten,
2. Proteine, welche Selenomethionin unspezifisch anstelle von Methionin eingebaut enthalten (98) und
3. selenbindende Proteine wie z.B. SLP-14 und SLP-56. Sie enthalten weder Selenocystein noch Selenomethionin, sondern sind durch ionische Wechselwirkungen mit Selen assoziiert (102; 103).

Selenoproteine sind Proteine, welche einen oder mehrere Selenocysteinreste im Protein und mindestens eine Selenocystein-Insertions-Sequenz (SECIS) in ihrer mRNA enthalten. Selenocystein wird durch das sogenannte *opal*-Stoppcodon UGA kodiert (Abb.7). Im Gegensatz zu allen anderen proteinogenen Aminosäuren wird Selenocystein direkt auf der tRNA synthetisiert. Im Regelfall wird am UGA-Codon die Translation terminiert. Die mRNA von Selenoproteinen bildet allerdings im nicht-codierenden 3`-Ende eine Haarnadelstruktur (SECIS-Element) aus. Das SECIS-Element interagiert mit dem *SECIS binding protein 2* (SBP2), mit dem Selenocystein-spezifischen Elongationsfaktor eEF^{Sec} und der Sec- tRNA^{Sec}. Dadurch wird das Stoppcodon UGA ignoriert und Selenocystein kann in Proteine eingebaut werden. Dieser Vorgang wird als Umkodierung bezeichnet. Selenoproteine sind oft Oxidoreduktasen und an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt. Sie dienen unter anderem der Detoxifikation reaktiver Sauerstoffmetabolite sowie dem Transport, der Speicherung und Metabolisierung von Selen (104). In Versuchen mit *Knockout*-Mäusen wurde die essentielle Bedeutung der Selenoproteine für Säugetiere bewiesen: Eine Deletion des tRNA^{Sec}-Gens resultiert im frühen Embryonaltod der Mäuse (105).

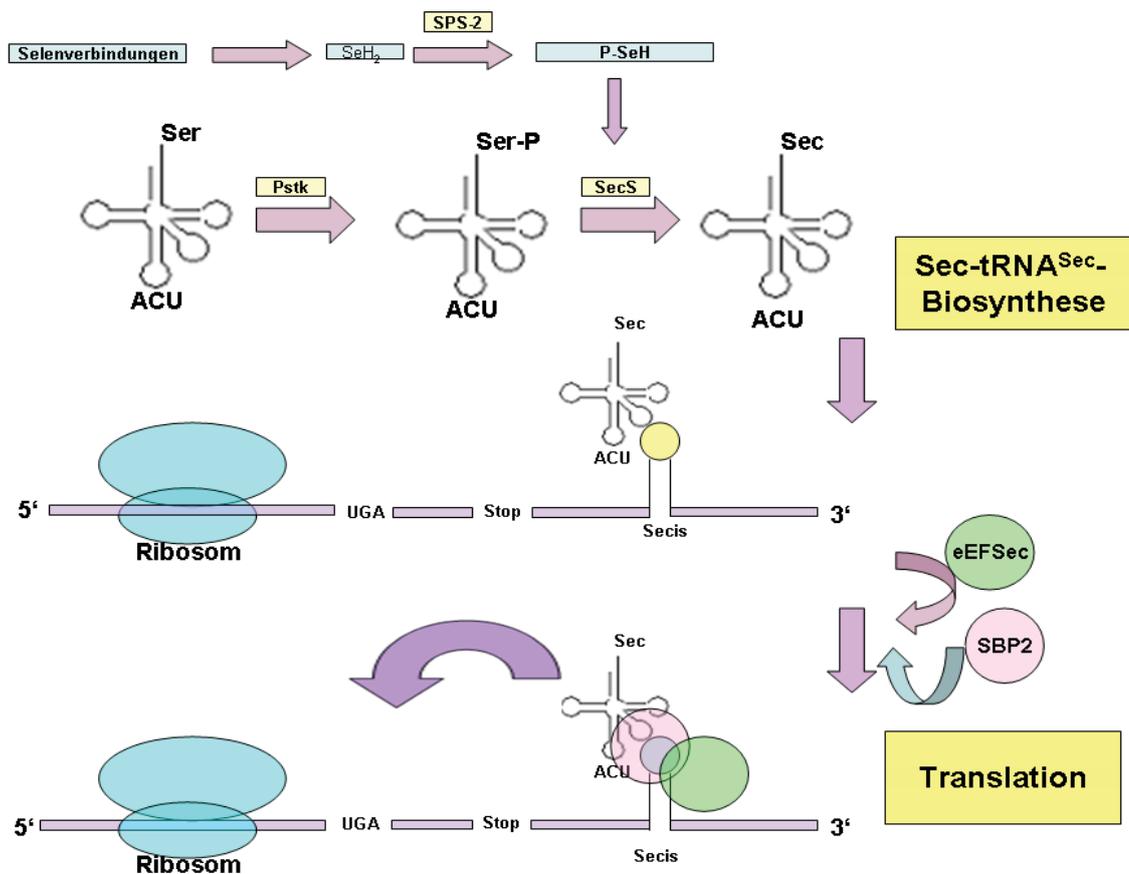


Abb. 7: Darstellung der Biosynthese von Selenoproteinen in Eukaryoten

modifiziert nach: (203)

SPS-2: Selenophosphat-Synthetase 2

Pstk: Phosphoserin-tRNA^{Sec} Kinase

SecS: Selenocystein-Synthase

SECIS: Selenocysteine Insertions

Sequenz

eEFSec: Sec-specific eukaryot elongation factor

SBP2: SECIS binding protein 2

Durch die Reaktion von ATP mit Selenwasserstoff, katalysiert durch die Selenophosphat-Synthetase 2, wird der aktive Selendonator Selenophosphat generiert. Dieses wird durch die Selenocystein-Synthase auf Phosphoserin-tRNA^{Sec} übertragen. Nach Abspaltung von Phosphat entsteht hieraus Selenocysteyl-tRNA^{Sec} (Sec-tRNA^{Sec}). Die tRNA^{Sec} wird darauf mit Serin beladen und der Serinrest durch die Phosphoserin-tRNA^{Sec} Kinase phosphoryliert. Danach entsteht das aktivierte tRNA-Substrat der Selenocystein-Synthase, welches mit dem Anticodon ACU an das UGA-Codon der mRNA bindet.

Durch bioinformatische Untersuchungen des menschlichen Genoms auf Transkripte mit putativen SECIS-Elementen, konnten 25 Selenoproteine ermittelt werden (93). Es gibt zwei Haupt-Redoxsysteme, das Glutathionsystem und das Thioredoxinsystem, an denen Selenoproteine beteiligt sind. Die bekanntesten und bestuntersuchten Selenoproteine sind die Glutathionperoxidasen (GPx), die Thioredoxinreduktasen (TrxR) sowie die

Iodothyronideiodinasen (DIO). Glutathionperoxidasen sind überaus wichtig bei der Prävention von oxidativen Zellschädigungen (siehe Tabelle 2). Thioredoxinreduktasen sind in der Lage, eine Vielzahl an Substraten unter NADPH-Verbrauch zu reduzieren. Sie sind die einzigen Enzyme, welche Thioredoxin zu reduzieren vermögen, das selbst als Redoxintermediat bei der Umwandlung von Ribose zu Desoxyribose im Rahmen der DNA-Synthese eine wichtige Rolle spielt (104). Thioredoxin stellt einen Kofaktor von verschiedenen Enzymen wie z.B. Peroxiredoxinen dar und beeinflusst die Aktivität einiger Proteine, u.a. ASK-1, PTEN (94). Iodothyronideiodinasen sind in die Aktivierung der Schilddrüsenhormone involviert (94). Weitere Selenoproteine mit bekannter Funktion sind ebenfalls in Tabelle 2 aufgeführt.

Selenoenzym	Funktion	Lokalisation
Glutathionperoxidasen	<i>Reduktion von Hydroperoxiden</i>	
GPx1	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidans • Redox-Signaling • Insulinsekretion 	<ul style="list-style-type: none"> • ubiquitär • cytosolisch
GPx2	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidans im GIT 	<ul style="list-style-type: none"> • verschiedene Tumore • Epithelzellen in Darmkrypten
GPx3	<ul style="list-style-type: none"> • evtl. extrazelluläres Antioxidans 	<ul style="list-style-type: none"> • Plasma • GIT
GPx4	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidans • Strukturprotein in Spermien • Redox-Signaling 	<ul style="list-style-type: none"> • ubiquitär • Spermien
Thioredoxinreduktasen	<i>Reduktion von Thioredoxin und zahlreichen anderen Substanzen</i>	
TrxR1	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidans • Redoxregulation • Reduktion der Ribonucleotidreduktase 	<ul style="list-style-type: none"> • ubiquitär • cytosolisch • nucleär
TrxR2	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidans • Redoxregulation 	<ul style="list-style-type: none"> • ubiquitär • mitochondrial
TGR (TrxR3)	<ul style="list-style-type: none"> • unbekannt 	<ul style="list-style-type: none"> • Testes
Iodothyronindeiodinasen	<i>Reduktion der Thyroidhormone</i>	
DIO1	<ul style="list-style-type: none"> • Generierung und Abbau von T3 sowie rT3 ((revers)-Triiodthyronin) 	<ul style="list-style-type: none"> • Leber • Niere • Schilddrüse • Hypophyse
DIO2	<ul style="list-style-type: none"> • Generierung von T3 • Abbau von rT3 	<ul style="list-style-type: none"> • Plazenta • ZNS • Schilddrüse • Muskel • braunes Fettgewebe
DIO3	<ul style="list-style-type: none"> • Generierung von rT3 • Abbau von T3 	<ul style="list-style-type: none"> • Gehirn • Plazenta • Uterus

Tabelle 2: Humane Selenoproteine und ihre Funktionen (Auswahl)

Die Angaben sind Übersichtsarbeiten entnommen (94; 104)

1.6 Selenoprotein P

1.6.1 Allgemeines

Das extrazelluläre Glykoprotein Selenoprotein P (SeP) wurde 1977 in Ratten entdeckt (106) und nach seinem Hauptvorkommen im Plasma (P) benannt (107). Es enthält die Mehrheit des Plasmaselens und ist der hauptsächliche

Selenlieferant extrahepatischer Gewebe. SeP kommt bei Wirbeltieren in extrazellulären Flüssigkeiten (108) sowie gebunden an Endothelzellen vor (109). Es gibt Hinweise auf intrazellulär vorliegendes SeP in Astrozyten (110) und in Adipozyten (111). Die Leber produziert circa 75% des Plasma-SeP und verteilt dieses anschließend im gesamten Körper (112), jedoch exprimieren alle Gewebe SeP-mRNA (113). 25% des Gesamtseleus zirkuliert als SeP innerhalb eines Tages durch das Plasma (113). Hohe Konzentrationen an SeP-mRNA finden sich in Leber, Niere und Herz (108), wohingegen in Lunge, Gehirn, Skelettmuskel und Hoden geringere Konzentrationen gefunden wurden.

1.6.2 Primärstruktur, Translation und Isoformen

Das Selenoprotein P der Ratte besteht aus 366 Aminosäureresten. SeP enthält im Gegensatz zu den anderen Selenoproteinen bis zu zehn Selenocysteinreste beim Mensch und der Ratte (113). Die Umkodierung der zehn UGA-Codons erfolgt über zwei SECIS-Elemente im 3'-untranslatierten Bereich der mRNA (Abb.9). SECIS-2 dient dabei der Insertion des ersten Selenocysteins in der N-terminalen Domäne des Proteins (114). Dieser geschwindigkeitsbestimmende Schritt erfolgt nur, wenn alle weiteren Komponenten für die folgende Selenoproteinsynthese vorhanden sind, bevor die selenreiche Domäne produziert wird. Falls diese nicht in ausreichender Menge vorkommen, wird die Translation an dieser Stelle abgebrochen. SECIS-1 ist für die Insertion der restlichen Selenocysteinreste verantwortlich. Durch vorzeitige Terminierung der Translation an unterschiedlichen UGA-Codons entstehen verkürzte SeP-Isoformen (113).

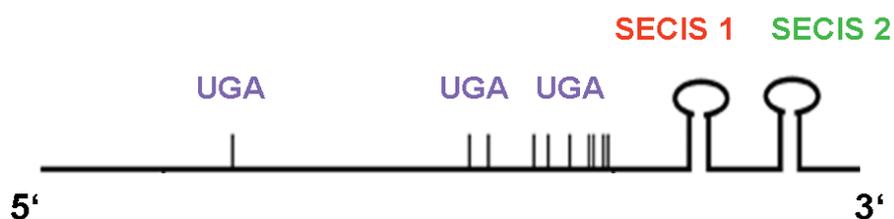


Abb. 8: Schematische Darstellung der mRNA des humanen Selenoprotein P

SeP lässt sich in zwei Domänen einteilen. Die erste Domäne reicht vom N-Terminus bis zum zweiten UGA-Codon (Reste 1-244). Sie ist die größere

Domäne und beinhaltet ein Selenocystein sowie sieben Cysteinreste. Diese erste Domäne ist enzymatisch bei Redoxreaktionen aktiv und besitzt Heparinbindungseigenschaften (106; 115). Die kleinere zweite Domäne erstreckt sich vom zweiten Selenocysteinrest bis hin zum C-Terminus (Reste 245-366). Es kommen neun Selenocysteine und zehn Cysteinreste vor, d.h. 90% der gesamten Selenocysteine und 59% der Cysteinreste. Die C-Domäne dient dem Selentransport (113).

Neben einem SeP mit voller Länge sind drei kürzere Isoformen bekannt. Alle weisen den gleichen N-Terminus auf. Bei den kürzeren Isoformen des Ratten-SeP endet der C-Terminus am zweiten, dritten bzw. siebten UGA-Codon. Der Name der jeweiligen Isoform gibt die Anzahl der Selenatome an (SeP1, SeP2, SeP7) (116).

1.6.3 Regulation

Die Expression der Selenoproteine unterliegt einer Hierarchie, welche vom Selenstatus des Körpers bedingt wird. Bei Selendepletion wird das im Körper verfügbare Selen zunächst in bestimmte Selenoproteine eingebaut. Es sind dabei zwei Subtypen an Proteinen zu unterscheiden: Zum einen Selenoproteine, welche langsam auf eine Selendeprivation reagieren und bei Resupplementation beschleunigt wieder produziert werden. Zum anderen Selenoproteine, welche direkt und schnell auf Selenentzug reagieren und sich erst verzögert von diesem wieder erholen. Diese Arten von Selenoproteinen scheinen daher verschieden wichtige physiologische Bedeutung für den Organismus zu besitzen (117).

Das Gehirn stellt ein Gewebe dar, welches auch in Zeiten längeren Selenmangels eine vergleichsweise nur geringfügig verringerte Produktion an Selenoproteinen zeigt. Jedoch weist es eine lokale Produktion von Selenoprotein P auf und ist daher bezüglich dieses Proteins nicht vom SeP-Gehalt des Körpers abhängig (118). An zweiter Stelle wird das Rückenmark mit Selen versorgt, gefolgt von der Hypophyse und der Schilddrüse (119; 120).

Die Transkription von SeP in der Leber ist nicht vom Selenstatus des Organismus abhängig (108). Die Translation und die Sekretion des

Selenoprotein P in Hepatozyten hingegen sind stark selenabhängig. Der hepatische SeP-Promotor besitzt putative Bindungsstellen für viele Transkriptionsfaktoren inklusive gewebespezifischer Transkriptionsfaktoren, welche vermutlich für die unterschiedliche Expression von SeP in verschiedenen Geweben verantwortlich sind (121; 122). Die Promotoraktivität wird in Hepatozyten durch die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin- β (IL-1 β) inhibiert. Die verringerte hepatische SeP-Produktion bei Inflammation wird auch durch eine verringerte Biosynthese von Komponenten des Selenoprotein-Translationskomplexes wie z.B. den selenocystein-spezifischen Elongationsfaktor (EFsec) hervorgerufen (123). Daher wurde SeP als ein negatives Akute-Phase-Protein postuliert (121; 124). In HepG2-Zellen verstärkt eine transiente Überexpression des PGC1 α durch eine Koaktivierung der Transkriptionsfaktoren FoxO1a und HNF4 α stark die Aktivität des SeP-Promotors. Die glukokortikoidinduzierte Stimulation von PGC1 α erhöht die SeP-mRNA-Level sowie die SeP-Sekretion. Ebenso stimuliert Glukose die SeP-Produktion in Hepatozyten. Insulin hingegen inhibiert vermittelt über FoxO1a die SeP-Transkription (125). Während des Fastens steigt die Menge der SeP-mRNA wiederum an (126), um nach erneuter Nahrungszufuhr zu fallen (127). Daher ähnelt die Regulation des SeP in Hepatozyten derer glukoneogenetischer Enzyme (128).

1.6.4 SeP als Selentransporter und antioxidatives Enzym

Viele Selenoproteine, wie z.B. die Glutathionperoxidasen oder die Thioredoxinreduktasen, sind Enzyme, die Redoxreaktionen katalysieren. Auch die Primärstruktur des SeP beinhaltet viele potentielle Redoxzentren in Form von Cystein- und Selenocysteinresten. Die Reste 40-43 verfügen über die klassische UxxC-Sequenz (129), welche eine Peroxidaseaktivität vermittelt (130). SeP katalysiert die Reduktion von Phospholipidhydroperoxiden unter Oxidation von Glutathion oder Thioredoxin (131). Die Phospholipid-Hydroperoxid-Peroxidase-Aktivität und seine Fähigkeit an Zellmembranen zu binden ermöglichen es SeP, extrazelluläre Strukturen vor oxidativem Stress zu schützen. Die Zugabe von SeP verzögerte z.B. Schäden an LDL durch freie Radikale (132) und verhinderte eine Nitrosylierung durch Peroxynitrit (133). Die

Synthese des Selenoprotein P schützt hepatisches Gewebe gegen das Superoxidanion, welches durch den Abbau des Herbizids Diquat entsteht (134) und eine Apoptose der Hepatozyten verursachen kann (135). Die antioxidativen Eigenschaften des SeP konnten in weiteren Studien unterlegt werden: Ein durch *siRNA* induzierter *Knockdown* des SeP in Astrozyten verstärkt den oxidativen Stress der Zellen (110). Ein *Knockdown* des SeP in Adipozyten erhöht die Expression proinflammatorischer Zytokine, sodass ebenfalls vermehrter oxidativer Stress und letzten Endes eine Insulinresistenz resultiert (111).

Bei Selenmangel besitzen einige Organe –allen voran das Gehirn– Mechanismen, um Selen in Form von SeP und anderer Selenoproteine zu erhalten. Gehirn und Hoden verfügen über den SeP-Rezeptor ApoER2, der die Aufnahme des SeP in diese Gewebe vermittelt (136). *SeP-Knockout*-Mäuse zeigen eine Spastik, abnorme Bewegungen sowie verminderte Motorik. Bei einer zusätzlichen selenarmen Diät entwickeln sich schwere irreversible neurologische Beeinträchtigungen (137). Ähnliche neurologische Abnormalitäten zeigen sich bei *ApoER2-Knockout*-Mäusen. Als prinzipielle Ursache der Schädigungen ist die verminderte Selenaufnahme des Gehirns zu sehen, nicht der Mangel an SeP selbst. Daraus ergibt sich, dass SeP für die adäquate Selenbereitstellung für Gehirn, Hoden und Fetus essentiell ist. Mutationen im SeP selbst oder den vermeintlichen Rezeptoren in Gehirn und Hoden könnten die Selenanlieferung beeinflussen und eine Rolle bei Krankheiten dieser Gewebe spielen (137). Im Tierversuch sinkt die Plasma-Glutathionperoxidase-Aktivität unter Selendefizienz auf 1% im Vergleich zum Zustand optimaler Selenversorgung ab. SeP selbst fällt dabei nur auf 5-10% ab (113). Dies bedeutet, dass auch bei schwerer Mangelversorgung eine beachtliche Menge des verfügbaren Selens für die Synthese des SeP verwendet wird. Daher wird SeP eine bedeutende Rolle im Organismus zugeschrieben, die bis heute noch nicht völlig erforscht ist. In den Nieren finden sich SeP-Vesikel in den proximalen Tubuluszellen (PCT). SeP wird dabei dem glomerulären Filtrat entnommen. Die Zellen weisen aufgrund ihrer Glutathion-Peroxidase-3-Sekretion einen besonderen Selenbedarf auf. Das Protein Megalin befindet sich am Bürstensaumen und erleichtert die Endozytose vieler

glomerulär filtrierter Proteine wie dem SeP und Liganden und ist somit für die SeP-Aufnahme der PCT aus dem glomerulären Filtrat verantwortlich (136).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass SeP vielfältige Eigenschaften besitzt. Es dient dem Organismus als ein Antioxidanz. Darüber hinaus ist es für die Selenbereitstellung in Gehirn, Hoden und Fetus essentiell (136).

2 Ziele der Arbeit

In der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 spielt das sekundäre Betazellversagen eine bedeutende Rolle. Die Betazellmasse ist bereits vor der Erstmanifestation der Erkrankung vermindert und nimmt während des weiteren Krankheitsverlaufs progredient ab. Der Betazellverlust wird durch verschiedene Faktoren bedingt. Einen Mechanismus stellt die Schädigung durch oxidative und nitrosative Noxen dar.

Die insulinproduzierenden Betazellen des Pankreas enthalten nur sehr geringe Mengen an antioxidativen Enzymen und sind daher gegenüber reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS/RNS) besonders anfällig. Eine chronische Hyperglykämie und erhöhte freie gesättigte Fettsäuren im Rahmen des metabolischen Syndroms bzw. des Diabetes mellitus Typ 2 induzieren eine verstärkte Bildung von ROS und RNS. Diese werden durch verschiedene antioxidative Enzyme wie die Katalase, Superoxiddismutasen und Glutathionperoxidasen entgiftet. Bei letzteren handelt es sich um Selenoproteine. Selen und verschiedene weitere Selenoproteine könnten an den antioxidativen Schutzmechanismen der pankreatischen Betazelle beteiligt sein. Ein weiteres Selenoprotein, das Selenoprotein P, wurde bereits in verschiedenen anderen Geweben nachgewiesen. In humanen Astrozyten beispielsweise konnte mittels *RNAi*-vermitteltem *Knockdown* von SeP nachgewiesen werden, dass SeP die Zellen vor oxidativem Stress schützt (110). Obwohl die Reaktivität von SeP gegenüber Hydroperoxiden im Vergleich zu den Glutathionperoxidasen sehr niedrig ist (138), wirkt SeP auch *in vivo* antioxidativ. Daher wird eine wichtige Rolle von Selenoprotein P im Redoxmetabolismus der pankreatischen Betazellen postuliert, für die es folgende Anhaltspunkte gibt: Zum einen lassen Expressionsstudien auf eine endogene Synthese von SeP in Betazellen schließen (139; 62). Des Weiteren ist SeP in der Lage, Phospholipidhydroperoxide und Peroxynitrit zu entgiften (140). Darüber hinaus ist die Enzymaktivität der Glutathionperoxidasen in Betazellen extrem gering (55). Daher wird vermutet, dass SeP anstelle der GPx einen basalen antioxidativen Schutz der Betazellen gewährleistet, wobei

aufgrund der niedrigen Enzymaktivität von SeP eine ausreichende Konzentration der als Signalmoleküle für die GSIS benötigten ROS erhalten bleibt (63).

In der vorliegenden Arbeit soll deshalb die Hypothese geprüft werden, ob SeP in murinen und humanen pankreatischen Betazellen exprimiert und durch metabolische Stimuli in der Expression reguliert wird. Es soll zunächst die Expression von Selenoprotein P im Pankreas der Ratte und in pankreatischen Betazellen anhand der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1 untersucht werden. Das genaue Expressionsmuster von SeP soll an kryofixierten Pankreasgewebeschnitte der Maus und des Menschen ermittelt werden.

Zudem soll untersucht werden, ob die Expression des Selenoprotein P durch verschiedene Stimulantien modifiziert werden kann. In Hepatozyten der Ratte konnte durch hohe Glukosekonzentrationen eine erhöhte hepatische Genexpression und Sekretion des Selenoprotein P beobachtet werden (126). Daher soll in dieser Arbeit der Einfluss von unterschiedlich hohen Glukosekonzentrationen auf die SeP-Expression und Stabilität der SeP-mRNA ermittelt werden.

Das Spurenelement Selen ist für seinen Einfluss auf die pankreatische Betazelle bekannt. Selenverbindungen wirken in niedrigen Dosen durch die Stimulation von Selenoenzymen antioxidativ. Daher soll untersucht werden, ob durch Zugabe von Selenverbindungen eine Modifikation der Höhe der SeP-Expression eintritt und diese mit der Expression der Glutathionperoxidase 1 und dem Koaktivator *peroxisomal proliferator activated receptor- γ coactivator 1 α* (PGC1 α) verglichen werden.

Zusätzlich soll ermittelt werden, in wie weit sich die SeP-Expression im Pankreas unter diabetischen Stoffwechselbedingungen, z.B. nach Induktion eines Diabetes mellitus durch das Betazelltoxin Streptozotocin, verändert.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Gerät	Firma, Ort
Axioskop	Zeiss, Göttingen
antair BSK	GKS Klima-Service GmbH, Stuhr
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Binder Inkubator 37°C, 5% CO ₂	Binder, Tuttlingen
Blockheizier	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Countess™ automated cell counter	Invitrogen, Darmstadt
Cryostat Jung Frigocut 2800 E	Leica, Bensheim
Fluoreszenz-/Lichtmikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen
Diana III Raytest-Kamera	Raytest, Straubenhardt
Laminait Flow cabinet class 100	Flo laboratories, Meckenheim
Light Cycler	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Magnet-Rührer	Janke & Kunkel IKAMAK®RCT, Staufen
Magellan Standard	Tecan, Männedorf, Schweiz
Microcomputer Electrophoresis Power Supply	Fröbel Laborgeräte, Lindau
Consort	
Mikroskop Diavert	Wild MPS 12, Heerbrugg, Schweiz
Mikrowelle	Braun, Melsungen
MS1 Minishaker	IKA®, Staufen
Neubauer Zählkammer	Brand, Göttingen
Nikon digital camera DXM 1200	Nikon, Amsterdam, Niederlande
Nikon eclipse TE300	Nikon, Amsterdam, Niederlande
Oberflächen TEMP Heizplatte	IKAMG® RCT, Staufen
Pipettus akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipetten reference	Eppendorf, Wesseling
Power Pac HC	Biorad, München
RM-5-Assistant Rollschüttler	Braun, Melsungen
Schüttler Rotamax 120	Heidolf, Schwabach
Schüttler Swip	Edmund Bühler, Hechingen
Sterilwerkbank Lamin Air® HB2472K	Heraeus, Hanau
T Gradient Cycler	Biometra, Göttingen
Trans-Blot SD semi-dry transfer cell	Biorad, München
Universal 30 RF	Hettich, München
UV/VUS Spectrometer Lambda 2	Perkin Elmer, Rodgau
Victor 1420 Multilabel Counter	Perin Elmer Wallac, Freiburg
Vortexer VF2	Janke & Kunkel IKA® Labortechnik, Staufen
Wasserbad GFL 1083	Köttermann, Düsseldorf

X Cell Sure Lock Novex Mini-cell
Zentrifuge Universal 30 RF

Invitrogen, Darmstadt
Hettich, Tuttlingen

3.1.2 Puffer und Lösungen

Western Blot	Anodenpuffer I	300mM Tris
		10% (v/v) MeOH
	Anodenpuffer II	25mM Tris
		10% (v/v) MeOH
	Blockierlösung	5% (w/v) Trockenmilchpulver in TBST
	Gel-Ladepuffer (4x) für Proteine	300mM Tris-HCl pH 6.8
		8% SDS
		40% Glycerin
		400mM β - Mercaptoethanol
		0.04% (w/v) Bromphenolblau
	Kathodenpuffer	25mM Tris
		10% (v/v) MeOH
		40mM Glycin
	Laufpuffer (für SDS-PAGE)	50mM Tris
		500mM Tris
		0,1% (w/v) SDS
	PBS	137mM NaCl
		2.7mM KCl
		8mM Na_2HPO_4
		1.47mM KH_2PO_4 (pH 7.4)
	TBS	5 mM Tris-HCl (pH 7.5)
		15mM NaCl
		0.01% (v/v) Tween-20
	Polyacrylamidgel (für SDS-Page)	
	5% Sammelgel	720 μ l Rotiphorese Gel 40 (37,5:1)
		650 μ l Tris 1 M, pH 6,8
		3.5ml Wasser
		50 μ l SDS 10% (w/v)
50 μ l APS 10% (w/v)		
5 μ l TEMED		
10% Trenngel	2.5ml Rotiphorese Gel 40 (37,5:1)	
	2.5ml 1,5 M Tris, pH 8,8	
	4.8ml Wasser	
	100 μ l SDS 10% (w/v)	
	100 μ l APS 10% (w/v)	
	5 μ l TEMED	
Ponceau-S-Lösung	Sigma	
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth	

Agarosegele	TAE	40mM Tris
		20mM Essigsäure
		1mM EDTA (pH 8.0)
	1% Agarose	Invitrogen
	Ethidiumbromid	Roth
Immunhistochemie/Immunfluoreszenz	TBST	0,05M Tris-HCl
		0,3M NaCl
		0,1% Tween (pH7,6)
	Aqua dest Laborwasser	Merck
	Swine Serum	Dako
	AEC Substrate Chromogen Ready-to-use	Dako
	Biotin-Avidin-Block	Dako
	ABC Elite	Vector
	Tissue Tec	Saturek
	Endogenous Peroxidase Block	Dako
	Faramount Aqueous Mounting medium, Ready-to-use	Dako
	Hämatoxillin II	Merck
	Aceton	Merck
	DAPI	Dako
	TBS	Tris-Pufferarm - Roth
		Natriumchlorid - Merck
Aqua dest		
HCL (zum pH einstellen)		

3.1.3 Versuchstiere und Zellkulturmaterialien

a) Behandlung von C57Bl/6-Mäusen mit Streptozotocin

Wir erhielten freundlicherweise aus der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Schott des Universitätsklinikums Düsseldorf kryofixierte pankreatische Gewebeschnitte von mittels Streptozotocin behandelten Mäusen. Zur Durchführung der Versuche wurden – nach Genehmigung des Vorhabens durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (AZ 8.87-50.10.34.08.145)- Mäuse der Linie C57Bl/6 von der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf verwendet. Die Tiere wurden gemäß der Tierschutzverordnung (Fassung 31.05.2006) gehalten und mittels Kohlenstoffdioxid getötet. Die anschließende Präparation der Versuchstiere erfolgte in den Sektionsräumen der Tierversuchsanlage.

Zur Blutglukosebestimmung wurde dreimal wöchentlich aus einer Schwanzvene von nicht nüchternen Mäusen zwischen neun Uhr und elf Uhr Blut entnommen. Die Messung wurde mit Hilfe des Messgeräts Ascensia Contour® unter Nutzung des Enzym/Koenzym-Systems Glukosedehydrogenase/Pyrrrolchinolinchinon durchgeführt. Ein Versuchstier galt ab einem Blutglukosewert $\geq 300\text{mg/dl}$ als diabetisch. Ein schwerer Diabetes wurde bei mindestens zweimaliger Messung eines Blutglukosewertes von 600mg/dl definiert. Streptozotocin wurde zur Induktion des Diabetes mellitus in den C57Bl/6-Versuchsmäusen benutzt. Diese Mäuse erhielten im Alter von vier Wochen eine intraperitoneale Streptozotocin-Injektion mit einer Dosierung von 40mg STZ/kg Körpergewicht. Diese Injektion erfolgte an fünf aufeinanderfolgenden Tagen.

b) Herstellung der Kryoschnitte

Wir erhielten freundlicherweise Kryoschnitte aus der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Schott des Universitätsklinikums Düsseldorf. Nach Tötung der Versuchstiere gemäß des Tierschutzgesetzes erfolgte die Präparation der Pankreata am geöffneten Abdomen. Nach entsprechender Fixierung wurden die Pankreatateilschnitte bei -196°C gefroren und konnten anschließend mit Hilfe des Cryostat Jung Frigocut 2800 E geschnitten und auf Objektträger aufgenommen werden.

c) Gewinnung muriner Langerhan'scher Inseln (Aktenzeichen O25/07)

Wir erhielten freundlicherweise cDNA muriner Langerhan'scher Inseln aus der Arbeitsgruppe PD Dr. Schinner des Universitätsklinikums Düsseldorf. Murine Langerhan'sche Inseln wurden aus Wildtyp-Mäusen der Linien C57BL/6J isoliert. Diese wurden gemäß dem Tierschutzgesetz (Fassung 31.05.2006) gehalten und im Alter von drei Monaten mit reinem Kohlenstoffdioxid getötet. Es erfolgte die Fixierung auf einem Sezierbrett mit 70%igem Ethanol (Merck, Darmstadt) mit anschließender Eröffnung des Abdomens zur Präparation der Inseln. Hierzu wurde die duodenale Gallengangspapille abgeklemmt und eine Kanüle in den Gallengang nahe der Leberpforte eingeführt. Es wurden 2ml Kollagenase

(Collagenase NB 8 Broad Range from *Clostridium histolyticum*, Serva Electrophoresis, Heidelberg) gelöst in HBSS (Pan Biotech GmbH, Aidenbach) retrograd in den Pankreasgang injiziert und das Pankreas herauspräpariert. In einem 15ml Röhrchen wurde das Pankreas mit 1ml der Kollagenaselösung bedeckt und auf Eis gekühlt, um die Aktivität der Kollagenase zu inhibieren. Darauf wurden die Pankreata für acht Minuten in einem 37°C warmen Wasserbad erwärmt, geschüttelt und einzeln mit einer Pasteurpipette (Ratiolab GmbH, Dreieich) auf Eis homogenisiert. Ein weiterer Kollagenaseverdau wurde durch das Hinzufügen von 6ml HBSS mit 10% FKS verhindert. Die Pankreata wurden gevortext und für zwei Minuten bei 1200rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde mit frischem HBSS-Medium wiederholt und das Medium anschließend durch RPMI-Medium 1640 mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10% FKS ersetzt.

Durch die Kollagenaseaktivität war es anschließend möglich, die aus dem exokrinen Pankreas gelösten Langerhans'schen Inseln unter einem Binokular (Zoom 2000, Leica, Wetzlar) mit einer Pipette zu ernten. Zur Verminderung von exokrinen Anteilen wurde das Ernten zwei weitere Male wiederholt, bevor die Langerhans'schen Inseln in Krebs-Ringer-Puffer kultiviert wurden.

d) Primäre Rattengewebe (Aktenzeichen O/73/93)

Die primären Rattengewebe erhielten wir freundlicherweise von Herrn Dr. Bidmon aus dem Cécile und Oskar Vogt-Institut für Hirnforschung der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die Organentnahme wurde unter dem Aktenzeichen O/73/93 genehmigt.

e) Humane Pankreata

Wir erhielten freundlicherweise kryofixierte Schnitte humaner Pankreata von Herrn G. Jennemann am Institut für Anatomie der Universität Marburg (Arbeitsgruppe, Prof. Seitz). Ein Ethikvotum zum Studiumprotokoll mit der Studiennummer 4478 wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich Heine Universität Düsseldorf erteilt.

f) Zellkultur INS-1

INS-1-Zellen stellen eine immortalisierte Insulinoma Zelllinie der Ratte dar, die aus einem transplantierten, Röntgenstrahlen-induzierten Tumor entwickelt wurde (141). Die stabilen, hochdifferenzierten Zellen sind aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber Glukose und anderen Stimulantien der Insulinsekretion ein geeignetes *in-vitro* Modell, um verschiedene molekulare Aspekte der Funktion der Betazelle zu untersuchen. Die Zellen wurden von Prof. Dr. Seissler (München) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wachsen adherent und wurden in Passagen 3 – 17 für Versuche verwendet.

g) Zellkulturmedien

INS1-Zellen	Kulturmedium	RPMI-1640 Sigma-Aldrich, R7509
		2mM L-Alanyl-L-Glutamin, „Glutamax“, Invitrogen
		Pen/Strep 1x, 100 U/ml Penicillin
		100µg/ml Streptomycin, PAA
		10% (v/v) fötales Rinderserum, PAA
	Versuchsmedium	RPMI-1640 without Glc, Gibco
		2mM L-Alanyl-L-Glutamin, „Glutamax“, Invitrogen
		Pen/Strep 1x, 100 U/ml Penicillin
100µg/ml Streptomycin		
murine Langerhans'sche Inseln	Kulturmedium	HBSS (Hank's Buffered Salt Solution)
		HBSS (Hank's Buffered Salt Solution)
	Versuchsmedium	10% fetales Kälberserum
		1% Penicillin-Streptomycin-Lösung

3.1.4 Antikörper

primäre Antikörper	SeP	Selenoprotein P C-14: sc-22639, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
	Humanes SeP	Eurogentec, Seraing, Belgien
	Ratten SeP	Eurogentec, Seraing, Belgien
	PGC-1α	polyclonal rabbit anti-human PGC-1 (H-300) (Santa Cruz, sc-13067)
	HNF-4α	polyclonal rabbit anti-human HNF-4 α (H-171) (Santa Cruz, sc-8987)
	β-Aktin	anti- β -Actin (Sigma–Aldrich, #A5441)
	α-Tubulin	anti- α -Tubulin (H-300), sc 5546, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
	Insulin	Guinea pig polyclonal anti-Insulin, abcam, Cambridge, UK
	Glukaon	rabbit polyclonal anti-Glucagon (Gen Tex®, Inc.)

sekundäre Antikörper	Immuno-blotting	donkey anti-goat IgG	HRP horseradish peroxidase coupled IgG (Dianova)
		anti-rabbit IgG	polyclonal goat anti-rabbit HRP (horseradish peroxidase) coupled IgG, Dianova
	Immunhisto-chemie	anti-rabbit iGG	polyclonal goat anti-rabbit Alexa-Fluor 546-coupled IgG, Invitrogen, Darmstadt
		anti-guinea pig IgG	anti-guinea pig (Abcam)
		sheep anti-rabbit IgG coupled to biotin	AbD Serotec, Düsseldorf

3.1.5 Enzyme

Enzym

Firma

Superscript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase

Invitrogen, Darmstadt

Restriktionsenzyme

NotI

Fermentas, St. Leon Rot

PmeI	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
XbaI, Hind III	Roche , Mannheim
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
DNase I	Qiagen, Hilden
Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Darmstadt

3.1.6 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pGL3	Leervektor, Edukt von SeP-luc	Promega
Renilla-Luciferase	36kDa großes monomeres Protein, genetischer Reporter	Promega
Firefly-Luciferase	61kDa großes monomeres Protein, genetischer Reporter	Promega
SeP-Promotor (Ratte)	Promotorregion des Ratten-SeP (homolog zum humanen SeP-Promotor)	diese Arbeit

3.1.7 Kits und Hilfsmaterialien

Produkt	Firma
High Fidelity PCR System	Invitrogen, Darmstadt
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Reaction Mix	Roche, Mannheim
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, Bonn
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Mannheim
CellTiter 96R AQueous Non-Radioactive cell proliferation assay	Promega, Mannheim
Plasmid Miniprep Kit (GeneJET™)	Fermentas, St. Leon Rot
CellLytic™ Mammalian Tissue Lysis/Extraction Reagent	Sigma-Aldrich, Hamburg
ProteoJET™ Mammalian Cell Lysis Reagent	Fermentas, St. Leon Rot

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung der INS-1-Zelllinie

Die Zellkulturarbeiten wurden ausnahmslos an einem Sterilarbeitsplatz ausgeführt. Die INS-1-Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 99% relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (Heraeus) kultiviert. Alle drei bis fünf Tage wurden die Zellen in Abhängigkeit ihrer Konfluenz passagiert und bis zur 17. Passage für Versuche verwendet. Für Experimente wurden die Zellen in 6-Well, 24-Well oder 96-Well Platten nach Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer (Brand) ausgezählt und in einer Dichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen, $2,5 \cdot 10^5$, oder $2,5 \cdot 10^4$ Zellen pro Well ausgesät. Für die Langzeitkonservierung wurden die INS-1-Zellen in 80% FKS und 20% DMSO bei -196°C gelagert.

3.2.2 Nachweis der Viabilität der INS-1-Zellen mittels MTS-Assay

Die relative Zellviabilität der INS-1-Zellen wurde mittels MTS-Assay (CellTiter 96R AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega) in 96-Well Platten ermittelt. Pro Well wurden $2,5 \cdot 10^4$ Zellen in RPMI-Medium mit 10% FKS ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen mit verschiedenen Stimulationsmedien entsprechend dem Versuchsaufbau behandelt. Nach 24stündiger Inkubation mit den Stimulationsmedien wurden 20µl einer 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium), Inner Salt und Phenazin Methosulfat-Lösung im Verhältnis 1:20 mit einer Mehrfachpipette dazugegeben. Das wasserlösliche Tetrazoliumsalz wird von den lebenden, metabolisch aktiven INS-1-Zellen unter Verwendung von NADH⁺ durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase zu einem roten löslichen Formazansalz reduziert. Die Zellen inkubierten für 60 bis 120 Minuten mit MTS/PMS im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂, bis der rote Farbstoff zu erkennen war. Die photometrische Auswertung erfolgte bei einer Wellenlänge von 490nm. Die Absorption bei 490nm ist dabei proportional zur Anzahl metabolisch aktiver Zellen. Die so ermittelten Absorptionen wurden auf den Wert unbehandelter Kontrollzellen normiert. Im Vergleich behandelter mit kontrollbehandelten Zellen ist die Bildung des Tetrazoliumsalzes ein Maß für die relative Zellviabilität.

3.2.3 Nachweis der Viabilität der INS-1-Zellen mittels Trypanblaufärbung

Darüber hinaus wurde die relative Zellviabilität der INS-1-Zellen mittels einer Trypanblaufärbung am *Countess Automated Cell Counter* (Invitrogen) in 6-Well Platten untersucht. Pro Well wurden 10^6 Zellen in 1000 μ l RPMI-Medium mit 10% FKS Zellen ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1000 μ l verschiedener Stimulationsmedien behandelt. Nach 24 Stunden wurde das Stimulationsmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Darauf wurden die Zellen trypsiniert. 10 μ l der Zellsuspension wurden mit 10 μ l Trypanblau gemischt und in eine Zählkammer gegeben. Die Auszählung blaugefärbter und ungefärbter Zellen erfolgte automatisch, wodurch durch Normierung auf die Gesamtzellzahl die Zellviabilität berechnet werden konnte.

3.2.4 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA und *Dual Luciferase*

Assay

Initial erfolgte die Klonierung des SeP-Promotors der Ratte. Sequenzinformationen des Ratten-SeP-Gens wurden der *Rat Genome Database* entnommen (142). Ein 1500bp großes genomisches DNA-Fragment, welches sich direkt aufwärts der prädominanten Ratten SeP1-Transkriptvariante 1 (Gen Bank Einstellungsnummer NM_019192) befindet, wurde in den Firefly Luciferase Reporter Genvektor pGL3basic (Promega) kloniert. Genomische DNA wurde mittels *PureLink Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen) von INS-1-Zellen isoliert. Anschließend wurde eine PCR mittels *Pfu* DNA Polymerase (Fermentas, St Leon-Rot, Deutschland) mit den Primern 5'-ATCAAGTCCGTTTACATTTCC-3' und 5'-AACCCCTTCAGACTAGCTTG-3' durchgeführt. Das PCR-Produkt diente als Vorlage für eine folgende PCR mit Primern, welche Erkennungseinheiten für Kpn1 und Xho1 enthalten. Nach dem Restriktionsverdau wurde das Produkt der zweiten PCR in die Kpn1 und Xho1 Restriktionsseiten des pGL3basic-Vektors kloniert. Das entstandene Plasmidkonstrukt wurde sequenziert und als ratSepp1-luc bezeichnet. Die DNA-Sequenz des putativen Ratten-SeP-Promotor-Fragments (-1904/-16) wurde bei der GenBank eingereicht (Einstellungsnummer: JQ082498). INS-1-Zellen

wurden mit $2,5 \cdot 10^5$ Zellen pro Well in 24-Well Platten ausgesät. Am folgenden Tag – bei einer Konfluenz von 70-80% - wurden sie mit den folgenden Plasmiden transfiziert:

Pro Well:

- 0,1 µg pRLTK (*Renilla*)
- 0,5 µg SeP-Promotor

Pro µg Plasmid DNA:

- 3,2 µl Nanofectamin als lipophiles Transfektionsreagenz

Das Kontrollwell wurde anstelle des SeP-Promotors mit dem Leervektor *pGL3basic* transfiziert. Pro Well wurden 100 µl dieses Transfektionsmediums tropfweise zentral auf das Well gegeben und die Zellen anschließend über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und mit 300 µl Stimulationsmedium pro Well ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Bestimmung der SeP-Promotoraktivität mittels des *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega). Dazu wurden die Zellen mit 100 µl pro Well 1x PLB-Puffer für zehn bis 20 Minuten auf einem Schüttler lysiert und anschließend mit einer Pipettenspitze vom Well abgelöst. Nach Angaben des Herstellers wurden 5 µl der jeweiligen Probe mit 25 µl LAR gemischt und die *Firefly*-Messung durchgeführt. Bei dieser wird durch die Oxidation von D-Luciferin eine Photoemission erreicht, welche gestoppt wird, sobald das Substrat und das Enzym vermischt werden. Es folgte die Zugabe von 25 µl *Stop ,n' Glow* und die *Renilla*-Messung wurde vorgenommen. Bei dieser Messung wird mit Coelenterazine als Edukt eine lumineszente Reaktion durchgeführt, katalysiert durch die *Renilla* Luciferase. Die Aktivität der *Firefly*-Luciferase wurde auf die Aktivität der *Renilla*-Luciferase normiert und dieser Wert als relative Promotoraktivität auf die Aktivität des promotorlosen *Firefly*-Luciferasekonstrukts *pGCL3basic* bezogen.

3.2.5 Immunologische Methoden

Spezifische Proteine wurden in komplexen Proteingemischen oder in kryofixierten Pankreasschnitten der Maus mittels Western Blot bzw. *in-situ* Immunlokalisation nachgewiesen.

3.2.6 Western Blot

INS-1-Zellen wurden mit 10^6 Zellen pro Well in 6-Well-Platten ausgesät und entsprechend dem Versuchsaufbau stimuliert. Die Zellen wurden mit 200µl 1%igem SDS (sodium dodecyl sulfate) lysiert und anschließend mit Ultraschall (8 microns für 15 Sekunden) homogenisiert. Die isolierten Rattengewebe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, anschließend gemahlen und mit 500µl pro 100mg Gewebe *ProteoJet Mammalian Cell Lysis Reagent* lysiert. Die Suspension inkubierte bei Raumtemperatur für zehn Minuten auf einem Schüttler und wurde darauf bei 20.000g für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei 8 microns für 15 Sekunden mittels Ultraschallbehandlung homogenisiert. Mittels Photometer wurden nach der Lowry-Methode die Proteinkonzentrationen mit dem DC-Assay (BioRad) ermittelt. Bei einer Wellenlänge von 750nm wurde die Absorption gemessen und die Proteinkonzentration der Lösung aus einer mit Rinderserumalbumin erstellten Kalibriergeraden berechnet. Pro Versuch wurden von den INS-1-Zellen 20-35µg Protein und von den primären Rattengeweben 50µg Protein mit SDS-Probenaufragpuffer 1:4 vermischt und für fünf Minuten bei 65°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf ein 10%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Darauf erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (HyBond-C Extra, GE Healthcare) bei 1,5mA/cm² Gel für 1,5 Stunden mit Hilfe eines semi-dry Blots. Es wurde ein Transfertest mittels Ponceau-S-Lösung zum Nachweis der Banden durchgeführt und dieses anschließend mit PBS abgewaschen. Durch einstündiges Blocken der Membran in 5% Milch/TBST auf einem Schüttler bei Raumtemperatur wurden unspezifische Proteinbindestellen gesättigt. Die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper erfolgte in 5% Milch/TBST oder in 5% BSA/TBST über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler. Es folgte ein dreimaliger Waschvorgang à 15 Minuten mit TBST. Ein HRP-gekoppelter Sekundärantikörper wurde in fünf ProzentMilch/TBST verdünnt und die Membran für zwei Stunden mit diesem bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Es folgte erneut ein dreimaliger Waschvorgang à 15 Minuten

mit TBST. Mit Hilfe der Chemilumineszenz konnten die HRP-markierten Proteine detektiert werden. Zu diesem Zweck wurde die Membran für fünf Minuten mit einer Lösung aus Wasserstoffperoxid und Luminol (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce) nach Angaben des Herstellers inkubiert, überschüssige Reagenzien mit Whatman-Filterpapier abgenommen und das aufgrund der Peroxidasereaktion emittierte Licht auf einem photographischen Film (Bio-Max-Film, Kodak) detektiert.

3.2.7 *In-situ* Immunlokalisation mittels Immunhistochemie

Mit Hilfe der *in-situ* Immunlokalisation erfolgte an Kryoschnitten muriner und humaner Pankreata eine Detektion von Insulin, Selenoprotein P und Glukagon.

Die Kryoschnitte wurden auf Objektträger aufgenommen und nach dem Trocknen für zehn Minuten in Aceton bei -20°C fixiert. Es folgte ein dreimaliger Waschvorgang à fünf Minuten in TBST. Die Objektträger wurden dann in eine feuchte Kammer gelegt und abhängig vom späteren Sekundärantikörper wie folgt geblockt: Bei einem biotinylierten Sekundärantikörper (Insulin, Glukagon) erfolgte zunächst ein 10minütiger Avidin-Block (Dako) gefolgt von einem zehnminütigem Biotin-Block (Dako). Die Objektträger wurden dann erneut drei Mal für fünf Minuten in TBST gewaschen und anschließend wurde ein zehnminütiger Peroxidase-Block (Dako) durchgeführt. Wenn der spätere Sekundärantikörper HRPO-gekoppelt (SeP) war, erfolgte nur der Peroxidase-Block mit dem nachfolgenden Waschvorgang. Darauf wurde ein 30minütiger Proteinblock in der feuchten Kammer mittels 5% *normal swine serum* in *Aqua dest* (Dako) durchgeführt. Anschließend wurde der jeweilige Primärantikörper in *Antibody diluent* (Dako) der entsprechenden Verdünnung auf den Positivschnitt gegeben. Die Negativkontrolle wurde lediglich mit *Antibody diluent* bedeckt. Der Primärantikörper inkubierte über Nacht bei 4°C. Am darauf folgenden Tag erfolgte ein dreimaliger Waschvorgang à fünf Minuten in TBST, um den Primärantikörper abzuwaschen. Anschließend wurden alle Schnitte inklusive der Negativkontrollen für 60 Minuten mit dem passenden Sekundärantikörper in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert und darauf erneut drei Mal mit TBST gewaschen. Im Falle eines biotinylierten Sekundärantikörper wurden

dann die Schnitte für 30 Minuten mit *ABC-Elite* (Vector) in einer 1:100 Verdünnung inkubiert und darauf ebenfalls drei Mal mit TBST gewaschen. Unter Mikroskopkontrolle wurde das Substrat *AEC* (Dako) auf die Schnitte gegeben. Sobald eine deutliche Anfärbung der murinen Inseln erkennbar war, wurde die Reaktion in *Aqua dest* gestoppt. Die Gegenfärbung erfolgte für eine Minute in Hämatoxylin II. Die Schnitte wurden mit Wasser klar gespült und mit *Faramount* (Dako) luftblasenfrei eingedeckelt.

3.2.8 *In-situ* Immunlokalisation mittels Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der *in-situ* Immunlokalisation erfolgte an Kryoschnitten muriner Pankreata eine immunfluoreszenzgekoppelte Detektion von Insulin, Selenoprotein P und Glucagon. Die Kryoschnitte wurden auf Objektträger aufgenommen und nach dem Trocknen für zehn Minuten in Aceton bei -20°C fixiert. Es folgte ein dreimaliger Waschvorgang à fünf Minuten in TBS, gefolgt von einem zweifachen Waschen à fünf Minuten in TBST. Es folgte eine 60minütige Proteinblockierung in der feuchten Kammer mittels 5% Schweineserum in *Aqua dest* (Dako). Anschließend wurde mit dem jeweiligen Primärantikörper (SeP, Insulin, Glucagon) in Antibody diluent (Dako) in 1:1500facher Verdünnung über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag erfolgte ein dreimaliger Waschvorgang à fünf Minuten in TBS, um den Primärantikörper abzuwaschen. Anschließend wurden alle Schnitte inklusive der Negativkontrollen für 60 Minuten mit dem passenden Sekundärantikörper in einer 1:1000fachen Verdünnung in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert und darauf erneut drei Mal mit TBS gewaschen. Es folgte die Eindeckelung mit *DAPI*. Nach drei bis vier Stunden konnten die gefärbten Objektträger unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und ausgewertet werden.

3.2.9 Molekularbiologische Methoden

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten molekularbiologischen Methoden erläutert.

3.2.10 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolation erfolgte mit Hilfe des *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). INS-1-Zellen wurden mit 10^6 Zellen pro Well in 6-Well-Platten ausgesät und entsprechend dem Versuchsaufbau stimuliert. Am Tag der RNA-Isolation wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit 350µl RLT-Puffer mit β -Mercaptoethanol lysiert und in den *QIA-Schredder* überführt. Das Lysat wurde für zwei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Homogenat wurde mit dem gleichen Volumen 70%igen Ethanol verdünnt und auf die *QIA-Säule* gegeben. Die Nukleinsäuren binden in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen an diese Silicamembran, von welcher DNA, Proteinverunreinigungen und Salze in drei weiteren Waschschrritten mittels 700µl RW1-Puffer und zwei Mal 500µl RPE-Puffer entfernt wurden. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe von RNase-freiem Wasser von der Matrix eluiert.

Die Konzentration der RNA wurde daraufhin durch eine photometrische OD_{260} -Messung mit der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260nm (OD_{260}) entspricht dem Absorptionsmaximum von DNA und RNA, die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280nm (OD_{280}) dem Absorptionsmaximum von Proteinen. Aus dem Quotienten OD_{260}/OD_{280} ist es möglich, die Reinheit der isolierten RNA zu bestimmen. Bei reiner RNA beträgt dieses Verhältnis etwa zwei. Nach der Isolation wurde die RNA mit 6X Loading Buffer 1:5 verdünnt auf ein dreiprozentiges Agarosegel mit 1µg/ml Ethidiumbromid in 1X TAE-Puffer bei einer Spannung von 5V/cm Elektrodenabstand elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden konnten unter UV-Licht detektiert werden und wurden photographisch dokumentiert.



Abb. 9: Beispiel für Agarosegelbanden einer mRNA-Isolation unter UV-Licht

3.2.11 Reverse Transkription

Die RNA wurde mit Hilfe einer modifizierten MMLV-Reversen Transkriptase (*Superscript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase*, Invitrogen) zu komplementärer DNA (cDNA) umgeschrieben.

Dazu wurde 1µg Gesamt-RNA mit 1µM *Oligo(dT)₁₅-Primer* mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 10µl aufgefüllt. Dieses wurde für fünf Minuten bei 65°C im Thermocycler denaturiert und darauf auf Eis abgekühlt. Zu diesem Volumen wurden 10µl des folgenden Reaktionsmixes pipettiert

- 4,0µl 5X First-Stand Buffer (Invitrogen)
- 2,0µl DTT (100 mM)
- 1,0µl dNTP-Mix (je 10 mM)
- 2,5µl RNase freies Wasser
- 0,5µl Reverse Transkriptase (200 U/µl, Invitrogen)

Mit Hilfe des *Thermocyclers* konnte die reverse Transkription für eine Stunde bei 42°C durchgeführt werden. Sie wurde durch Denaturieren der Reversen Transkriptase bei 65°C für fünf Minuten beendet. Die so erhaltene cDNA wurde direkt für die PCR und, nach Verdünnung mit Wasser im Verhältnis 1:5, für die Real-Time PCR verwendet.

3.2.12 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgte mit Hilfe der *Taq DNA Polymerase* von Invitrogen. In PCR-Reaktionsgefäße wurden 2µl der komplementären cDNA entsprechend 100ng der revers-transkribierten RNA vorgelegt. Folgende Reagenzien wurden auf Eis in die *Tubes* pipetiert:

- 2,0µl 10X PCR Buffer minus Mg
- 0,4µl dNTP-Mixture (je 10 mM)
- 0,6µl MgCl₂ (50 mM)
- 0,2µl forward Primer (50 µM)
- 0,2µl reverse Primer (50 µM)
- 0,1µl Taq DNA Polymerase (5 U/µl)
- auf 100µl aufgefüllt

Die PCR wurde in einem *Thermocycler* mit folgenden Reaktionsschritten durchgeführt:

- Initiale Denaturierung: 3 min bei 95°C

- Zyklische Wiederholung von
 - *Denaturierung* (20s bei 95°C)
 - *Annealing* (30s bei 55°C) und
 - *Elongation* (40s bei 72°C)
- Gesamtzyklenzahl: 30
- Finale Elongation: 5 min bei 72°C

Nach der PCR wurden die Produkte mit *6X Loading Buffer* 1:5 verdünnt auf ein einprozentiges Agarosegel mit 1µg/ml Ethidiumbromid in 1X TAE-Puffer bei einer Spannung von 5V/cm Elektrodenabstand elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden konnten unter UV-Licht detektiert werden und wurden photographisch dokumentiert. Die Spezifität der PCR unter Verwendung des jeweiligen Primerpaars wurde durch Analyse des Molekulargewichts des Amplifikats und durch die Abwesenheit anderer, unspezifisch amplifizierter DNA-Fragmente überprüft und bestätigt.

Gen	Primersequenz 5'-3' (F, forward; R, reverse)
HPRT1	F: GACCGTTCTGTCATGTCG
	R: ACCTGGTTCATCATCACTAATCAC
SeP	F: GACAGTGGTTGCTCTTCTTCAA
	R: TCGCAGGTCTTCCAATCTG

Tabelle 3: Primersequenzen für die konventionelle PCR von rat-HPRT und rat-SeP

3.2.13 *Realtime-PCR*

Die quantitative *Realtime-PCR* erfolgte mit Hilfe des *Light Cycler 2.0* (Roche) unter Verwendung des *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Reaction Mix* (Roche). Bei der *Realtime-PCR* wird durch Einlagerung des Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green* die amplifizierte DNA Menge gemessen. Dadurch ist es möglich, die amplifizierte DNA in Echtzeit durch Messung der Fluoreszenzintensität des sich in den DNA-Doppelstrang einlagernden Fluoreszenzfarbstoffs *SYBR Green* zu detektieren. Aus der zum Erreichen eines bestimmten Fluoreszenzschwellenwertes benötigten Zykluszahl wird die relative Menge der in der Probe ursprünglich vorhandenen cDNA des Zielgens berechnet. Die Quantifizierung der mRNA-Expression der untersuchten Gene

erfolgte dabei relativ unter Verwendung der Expression eines Referenzgens (HPRT1 oder β -Aktin).

Für den Reaktionsansatz wurden folgende Reagenzien vermischt und in Glaskapillaren pipettiert:

- 3,0 μ M MgCl₂
- 0,5 μ M *forward Primer*
- 0,5 μ M *reverse Primer*
- 2,0 μ l 10fach Reaktionspuffer (*LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I*)
- 4,0 μ l 1:5 mit Wasser verdünnte cDNA (entsprechend 40ng revers-transkribierte RNA)
- Gesamtvolumen: 20 μ l

Die quantitative *Realtime*-PCR erfolgte mit folgendem Temperatur- und Zeitprofil:

- Initiale Denaturierung der DNA und Hitzeaktivierung der Taq DNA-Polymerase: 10min bei 95°C
- Zyklische Wiederholung von
 - *Denaturierung* (10s bei 95°C)
 - *Annealing* (10s bei primerspezifischer Temperatur) und
 - *Elongation* (primerspezifische Elongationszeit bei 72°C)
- Gesamtzyklenzahl: 50

Die Sequenzen der für die *Realtime-PCR* verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 angegeben.

Gen (Ratte)	Primersequenz 5'-3' (F, forward; R, reverse)
HPRT1	F: GACCGTTCTGTCATGTCTG R: ACCTGGTTCATCATCACTAATCAC
SeP	F: GACAGTGGTTGCTCTTCTTCAA R: TCGCAGGTCTTCCAATCTG
GPx1	F: CGACATCGAACCCGATATAGA R: ATGCCTTAGGGGTTGCTAGG
PGC1 α	F: GCAGTCGCAACATGCTCA R: GGGTCATTTGGTGACTCTGG
HNF4 α	F: GGAGCTGCCAGAGTAAAGC R: ACATTGCTGGGGTTGTCAC
β -Aktin	F: CCCGCGAGTACAACCTTCT R: CGTCATCCATGGCGAACT

Tabelle 4: Primersequenzen für die *Realtime-PCR* Gene der Ratte

Gen (Maus)	Primersequenz 5'-3' (F, forward; R, reverse)
HPRT1	F: TCCTCCTCAGACCGCTTTT
	R: CCTGGTTCATCATCGCTAATC
SeP	F: GGTGCGGAAACTGCAATC
	R: TTTGTTGTGGTGTGGTGGTG

Tabelle 5: Primersequenzen für die *Realtime*-PCR Gene der Maus

Zur Überprüfung der Amplifikatsspezifität wurde nach jeder PCR eine Schmelzkurve (60-95°C) aufgenommen (Abb. 9).

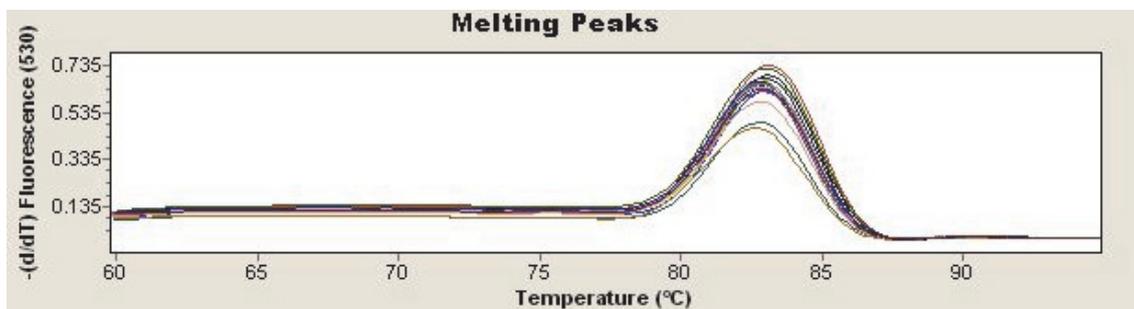


Abb. 10: Beispiel für eine Schmelzkurve der *Realtime*-PCR

Als Maß für die Quantifizierung der initial vorhandenen DNA Mengen wurde das *Delta Delta Crossing point* Berechnungsmodell verwendet. In der quantitativen PCR werden dabei CP-Werte (*crossing point*) ermittelt. Diese entsprechen der Anzahl der PCR-Zyklen, welche notwendig sind, um ein konstant messbares Fluoreszenzniveau zu amplifizieren. Zur weiteren Berechnung wurden die CP-Werte des *housekeeping*-Gens (HPRT bzw. β -Aktin) von den CP-Werten des zu untersuchenden Gens abgezogen ($\Delta CP = CP$ (Zielgen) $- CP$ (Referenzgen)). Im nächsten Schritt wurde der CP-Wert der unbehandelten Kontrolle von dem CP-Wert der behandelten Probe subtrahiert ($\Delta\Delta CP = \Delta CP$ Behandlung $- \Delta CP$ Kontrolle). Das *concentration-ratio* CR wurde schließlich über folgende Formel berechnet:

$$CR = 2^{-\Delta\Delta CP}$$

Die Produkte der PCR wurden zur internen Kontrolle auf einem einprozentigem Agarosegel aufgetragen (Abb. 10).

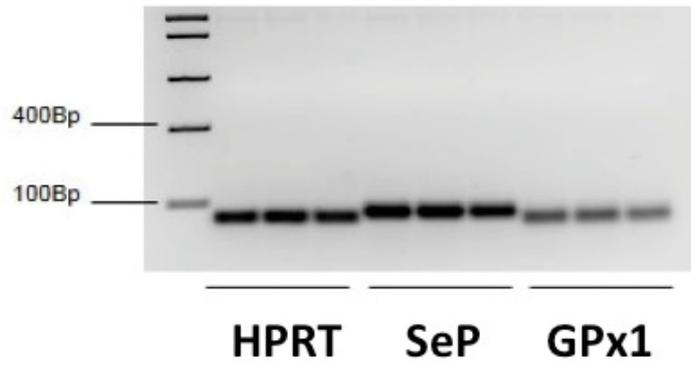


Abb. 11: Agarosegelbanden einzelner PCR-Produkte unter UV-Licht

4 Ergebnisse

4.1 Expression und Lokalisation von SeP im Pankreas

Die Schädigung durch oxidative Noxen gilt als ein Mechanismus der Verringerung der Betazellmasse in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2. Betazellen gehören zu den am geringsten mit antioxidativen Enzymen ausgestatteten Zellen. Neben den Glutathionperoxidasen wurde die Expression weiterer Selenoproteine –wie z.B. Thioredoxin-Reduktase, Deiodinase und Selenoprotein P- im endokrinen Pankreas und in Betazelllinien nachgewiesen (143). SeP-mRNA wurde in der Insulinoma-Zelllinie β TC3 detektiert (144). Neben seiner Hauptrolle als Selentransporter ist SeP ein antioxidatives Enzym und könnte daher am Schutz der Betazellen vor oxidativem Stress beteiligt sein. Daher sollte zunächst die Expression und Lokalisation von SeP im Pankreas und in Betazellen näher charakterisiert werden.

4.1.1 Nachweis der mRNA-Expression von SeP in primären Rattengeweben

SeP und GPx1 sind auf mRNA-Ebene in Leber und Nieren der Maus hoch exprimiert (145). Mittels *Realtime*-PCR wurde die mRNA-Expression von SeP in Leber, Nieren und Pankreas von Ratten im Vergleich zur Expression von GPx1 bestimmt. Die Ratten erhielten eine selenadäquate Standarddiät, um Effekte von Selendefizienz bzw. Selensupplementation auf die Expression der Selenoproteine auszuschließen. Hierbei zeigte sich die höchste Genexpression beider Selenoproteine in der Leber, gefolgt von Nieren und Pankreas (Abb. 11). Im Pankreas wurde SeP stärker exprimiert als GPx1. Die SeP-mRNA im Rattenpankreas betrug 58% im Vergleich zur Expression in der Leber, wohingegen die GPx1-mRNA im Pankreas nur 22% des Expressionslevels der Leber ausmachte.

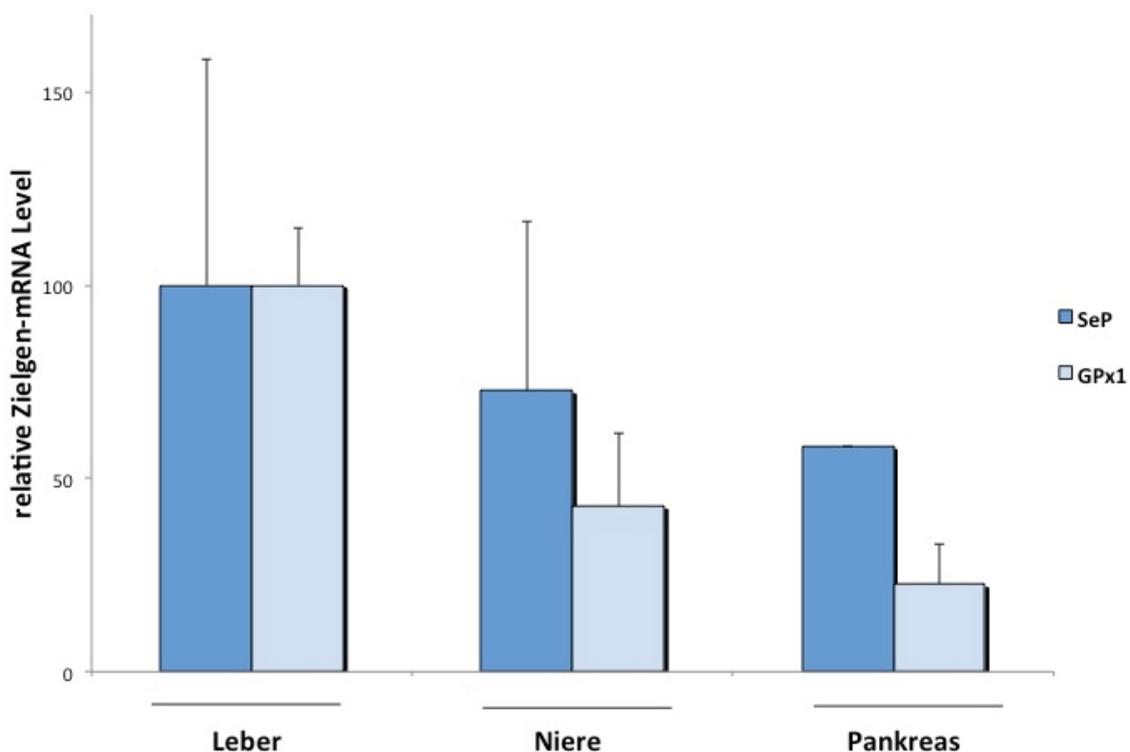


Abb. 12: Vergleich der Expression von SeP und GPx1 in primären Rattengeweben

SeP- und GPx1-mRNA Level wurden mittels Realtime-PCR untersucht und auf HPRT1 normalisiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD von drei Tieren angegeben. Die SeP- und GPx1-mRNA Level des Pankreas und der Nieren wurden in Relation zu den Werten in der Leber (=100%) berechnet.

4.1.2 Nachweis der mRNA-Expression von SeP in der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1

Daraufhin wurde die SeP-Expression in der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1 mittels quantitativer *Realtime*-PCR nachgewiesen. Um einen Vergleich mit anderen Zellen ziehen zu können, wurden neben INS-1-Zellen zusätzlich primäre Rattenhepatozyten auf SeP untersucht. Des Weiteren wurde die Hamsterzelllinie INR1G9, welche eine immortalisierte Zelllinie der pankreatischen Alphazellen darstellt, parallel getestet. Der Gehalt der INS-1-Zellen an SeP-mRNA lag berechnet nach dem *Delta Delta Crossing Point Modell* bei 28% des zum Vergleich in Hepatozyten bestimmten Wertes, der der Alpha-Zelllinie INR1G9 hingegen nur bei 8% (Abb. 13).

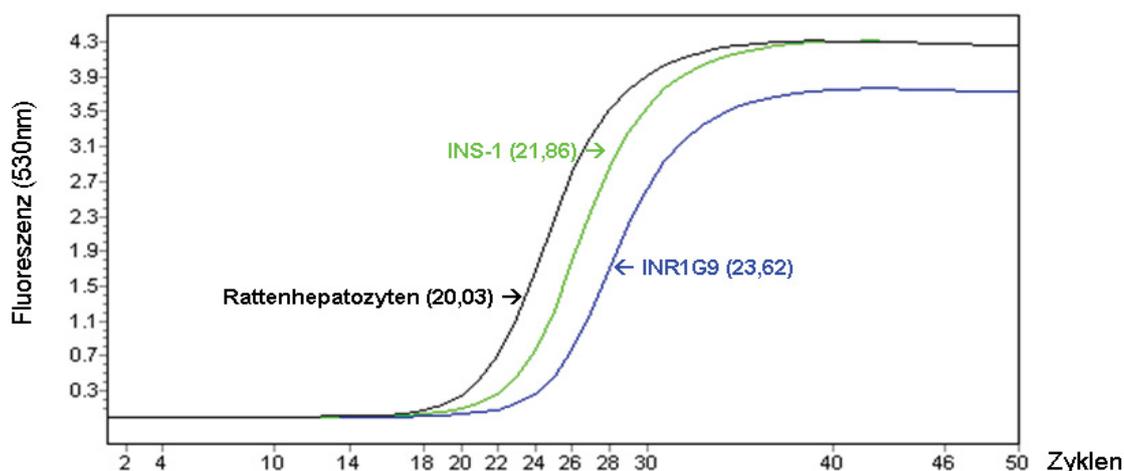


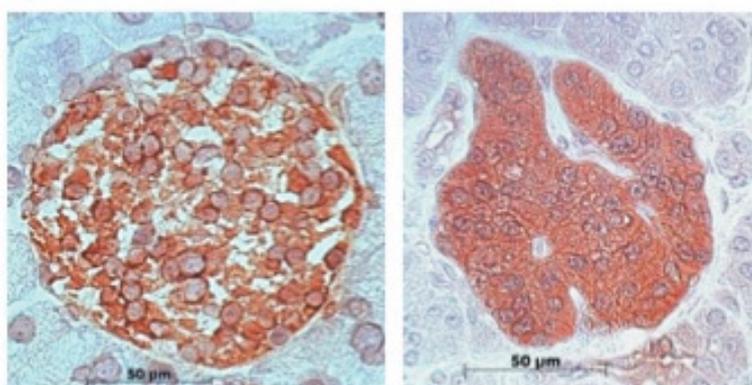
Abb. 13: Nachweis von Selenoprotein P mittels quantitativer Realtime-PCR

Der relative SeP-mRNA-Gehalt korreliert mit der Fluoreszenz bei 530nm. Der Gehalt der INS-1-Zellen an SeP-mRNA lag bei 28% des zum Vergleich in Hepatozyten bestimmten Wertes, der der Alpha-Zelllinie INR1G9 hingegen nur bei 8%. Die Daten zeigen die absolute Quantifizierung der drei Zelllinien eines repräsentativen Experimentes aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Berechnung erfolgte anhand des *Delta Delta Crossing Point* Modells.

4.1.3 Nachweis der Proteinexpression von SeP mittels *in-situ* Immunlokalisation in murinen und humanen Pankreata

Um die Lokalisation von SeP im Pankreas genauer zu untersuchen, wurde eine *in-situ* Immunlokalisation mittels Immunhistochemie (Abb.13) und Immunfluoreszenz (Abb.14) an murinen und humanen Pankreata auf SeP, Insulin und Glukagon durchgeführt. Diese Experimente machten deutlich, dass SeP sowohl in Alphazellen als auch in Betazellen des murinen Pankreas vorkommt und sowohl mit Glukagon als auch mit Insulin kolokalisiert ist, jedoch nicht im exokrinen Pankreasgewebe exprimiert wird. Um falsch positive Ergebnisse zu erkennen, wurden parallel Negativkontrollen angefertigt, welche –bei regelhafter Immunhistochemie- nicht angefärbt werden.

A



murin

human

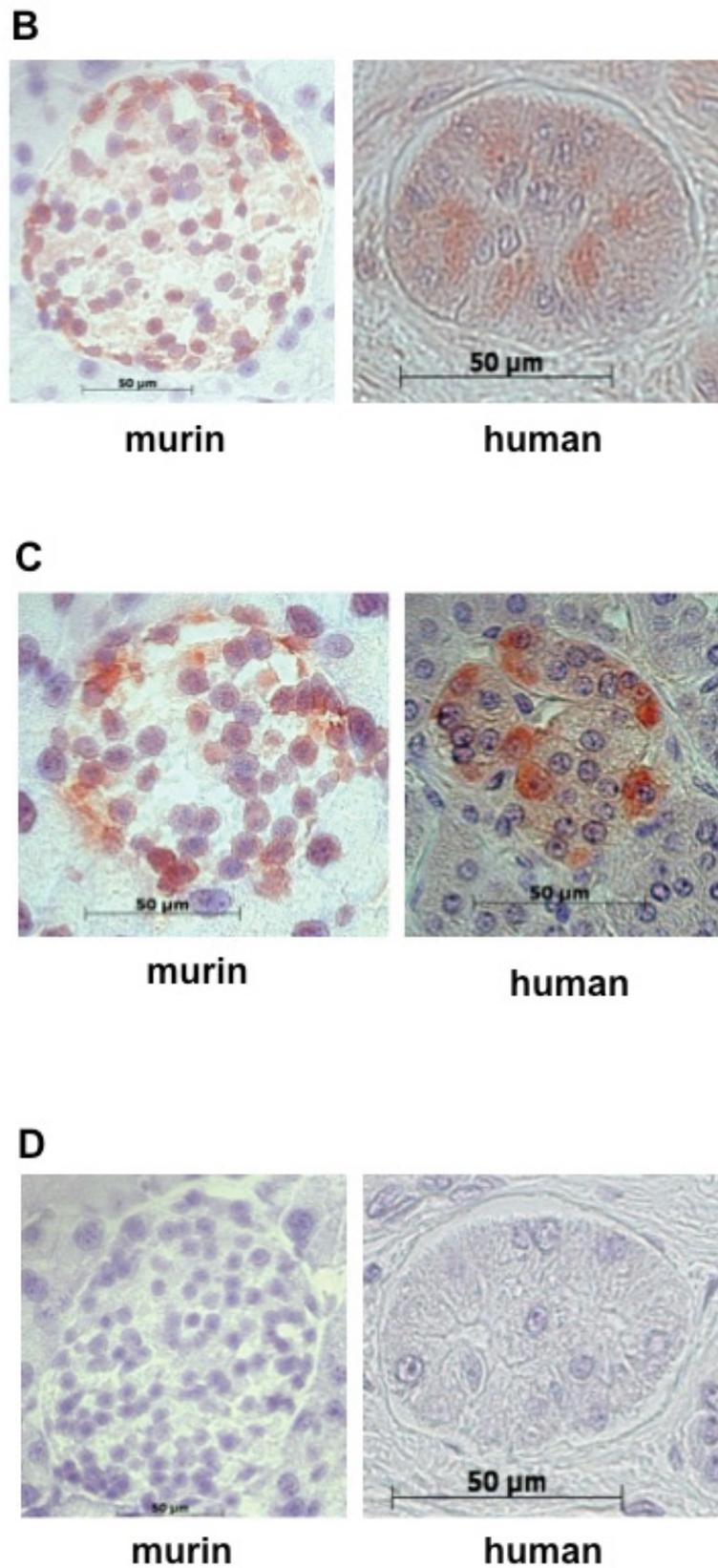


Abb. 14: Immunhistochemie muriner Pankreata (40X)

A) Insulin B) SeP C) Glukagon D) Negativkontrollen

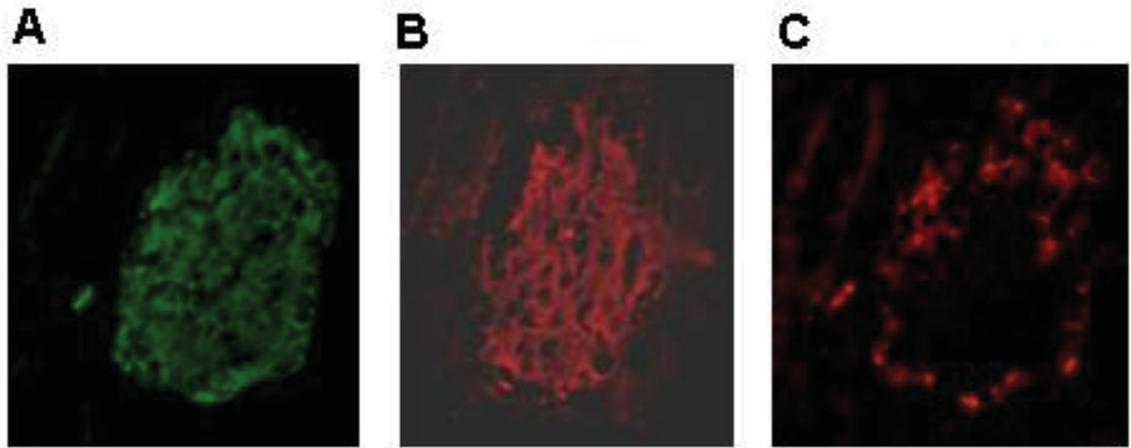


Abb. 15: Immunfluoreszenz muriner Pankreata (200X)

A) SeP B) Insulin C) Glukagon

4.1.4 Western-Blot-Etablierung

Die Western-Blot-Etablierung für Selenoprotein P erfolgte an verschiedenen primären Rattengeweben, an einem SDS-gelösten INS-1-Zellpelett bzw. einem in Zellysepuffer (Cell Lytic Mammalian Tissue Lysis/Extraction Reagent, Sigma) aufgenommenem INS-1-Zellpelett sowie an einem mittels VivaSpin aufkonzentriertem INS-1-Überstand. Die Inkubation erfolgte mit folgenden Primärantikörpern: anti-human SeP (Auftragssynthese Eurogentec) und anti-rat SeP (Eurogentec). Entsprechende Sekundärantikörper wurden verwendet. Es zeigten sich jedoch unspezifische Banden, sodass weitere Antikörper getestet wurden. Die Ergebnisse zeigt Kapitel 4.1.5.

4.1.5 Nachweis der Proteinexpression von SeP im Immunoblot

Zum weiteren Nachweis der SeP-Expression auf Proteinebene wurde zunächst eine Etablierung des *Western Blots* an Proteinlysaten aus INS-1-Zellen und primären Rattengeweben vorgenommen. INS-1-Zellen wurden kultiviert und mit 1% SDS lysiert. Proben aus primären Rattengeweben wurden mittels *ProteoJET™ Mammalian Cell Lysis Reagent* (Fermentas) hergestellt. Die Lysate wurden anschließend nach Ultraschallhomogenisierung wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben auf ein Polyacrylamidgel geladen. Die Blots wurden mit zwei unterschiedlichen Primärantikörpern -anti-human SeP (Auftragssynthese Eurogentec) und anti-rat SeP (Eurogentec)- inkubiert und mit den entsprechenden Sekundärantikörpern behandelt. Bei beiden Blots zeigten sich nach der photographischen Detektion jedoch unspezifische bzw. keine Banden (Abb. 16 und Abb. 17).

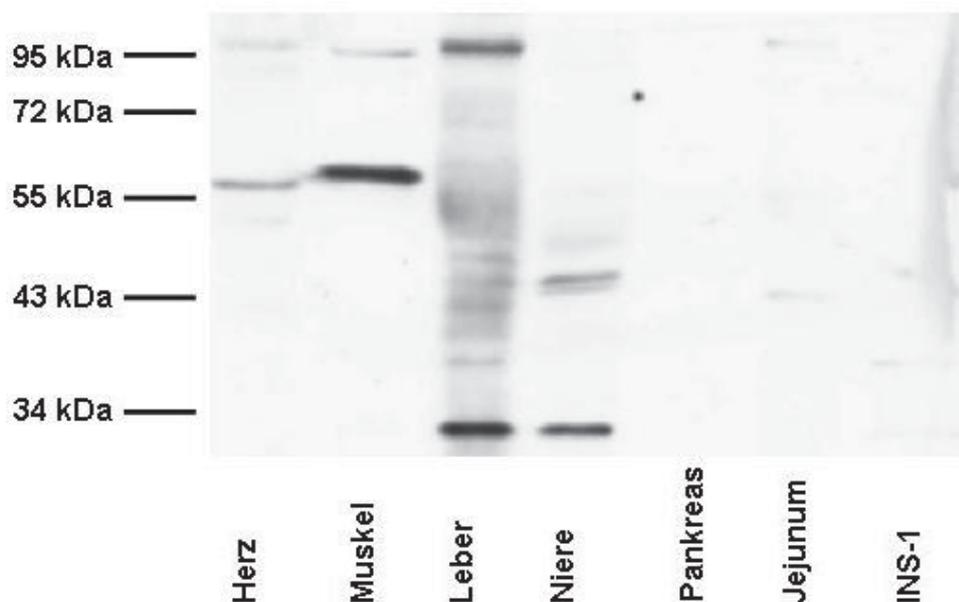


Abb. 16: Western Blot auf SeP an primären Rattengeweben und INS-1-Zellen

Der Western Blot erfolgte mit anti-rat SeP (Eurogentec). Die einzelnen Organe der Ratten wurden mittels *ProteoJET™ Mammalian Cell Lysis Reagent* (Fermentas) hergestellt und einem INS-1-Lysat gegenübergestellt.

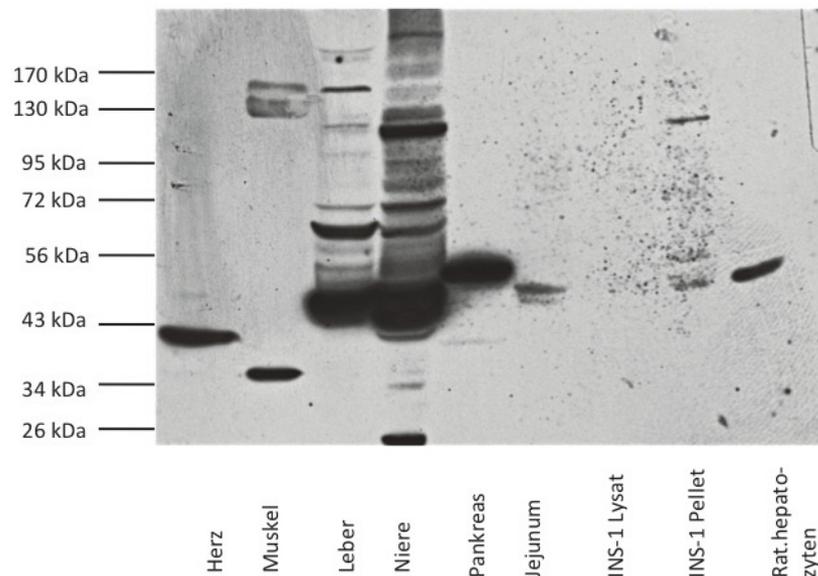


Abb. 17: Western Blot auf SeP an primären Rattengeweben und INS-1-Zellen

Der Western Blot erfolgte mit anti-rat SeP (Eurogentec). Die einzelnen Organe der Ratten wurden mittels *ProteoJET™ Mammalian Cell Lysis Reagent* (Fermentas) hergestellt und einem INS-1 Lysat, einem INS-1 Pellet und Rattenhepatozyten gegenübergestellt.

Im folgenden Kontrollexperiment wurden nur noch Lysate der INS-1-Zellen sowie ein Zellkulturüberstand untersucht. Die bereits verwandten Antikörper anti-human SeP (Auftragssynthese Eurogentec) und anti-rat SeP (Eurogentec) wurden einem weiteren Antikörper gegen Selenoprotein P (C-14): sc-22639 (Santa Cruz) in der Verdünnung 1:500 gegenübergestellt.

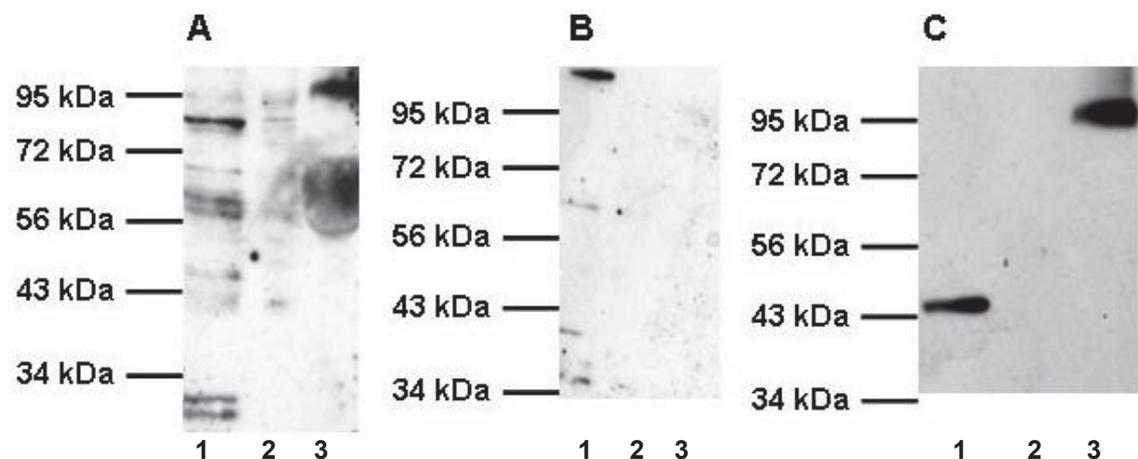


Abb. 18: Western Blot Etablierung auf SeP in INS-1-Zellen

(A): anti-human SeP (Auftragssynthese Eurogentec)

(B): anti-rat SeP (Eurogentec)

(C): Selenoprotein P (C-14): sc-22639 (Santa Cruz)

(1): SDS-Lysat der INS-1-Zellen

(2): Cell-Lyse-Puffer (Sigma) Lysat

(3): Überstand der INS-1-Zellen.

Von Selenoprotein P sind verschieden große Proteinisoformen identifiziert worden: Intrazelluläres deglykosyliertes Selenoprotein P besitzt eine Größe von 40kDa (111), das nicht-glykosylierte core Protein 45kDa (110). Hoch glykosylierte SeP-Formen sind hingegen 67kDa groß (108; 121). Lediglich beim Antikörper der Firma Santa Cruz (Abb. 18c) zeigte sich beim INS-1-SDS-Lysat eine spezifische dem Selenoprotein P entsprechende Bande bei 45kDa, sodass dieser Antikörper für die nachfolgenden Experimente ausgewählt wurde. Im Überstand der INS-1-Zellen konnte dagegen mit keinem der drei Antikörper Selenoprotein P detektiert werden (Abb. 32).

4.2 Einfluss der verwendeten Stimulantien auf die metabolische Aktivität der INS-1-Zellen

4.2.1 Selenverbindungen

Da zu hohe Selenkonzentrationen im Medium durch Zytotoxizität den Anteil lebender Zellen in einer Zellpopulation (Viabilität) der kultivierten Zellen beeinflussen können, wurde zunächst die Zytotoxizität der drei in dieser Arbeit verwendeten Selenverbindungen Natriumselenat, Natriumselenit und Selenomethionin mittels MTS-Assay und Zellcount-Assay (Abb. 19 und Abb.20) untersucht. Selenat und Selenomethionin verminderten bis zu einer Konzentration von 100 μ M die Viabilität der INS-1-Zellen nicht. Selenit schädigte die Zellen stärker. Es setzte die Viabilität auf 50% herab, wenn es in einer Konzentration von 10 μ M über 24 Stunden auf die Zellen einwirkte (Abb.19). Selenitkonzentrationen bis zu 1 μ M waren hingegen nicht schädlich. Daher wurden die INS-1-Zellen mit jeweils 1 μ M der Selenverbindungen behandelt, um toxische Effekte ausschließen und gleichzeitig eine ausreichende Selenversorgung für die Biosynthese der Selenoproteine zu gewährleisten.

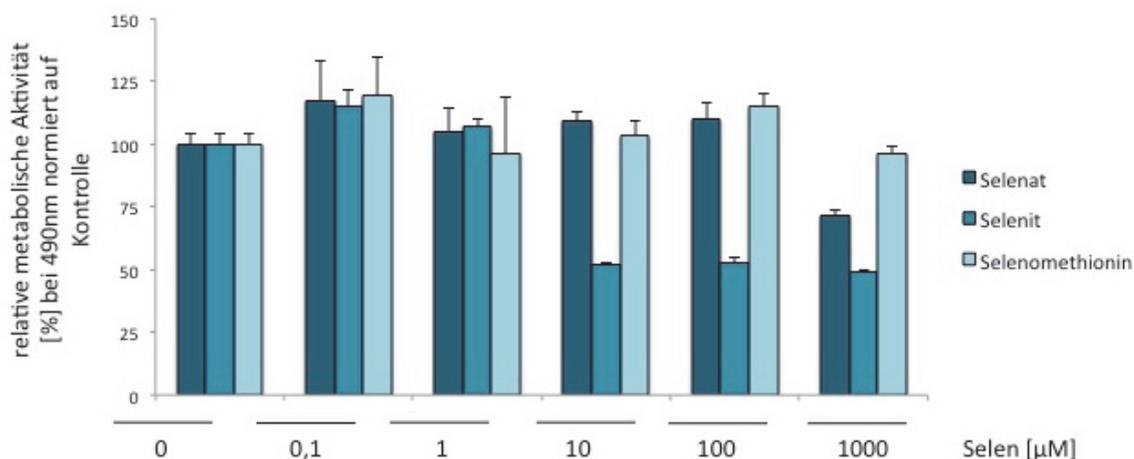


Abb. 19: Einfluss der Selenverbindungen auf die Viabilität der Ratten-Insulinoma-Zellen
INS-1-Zellen wurden für 24 Stunden mit Selenat, Selenit oder Selenomethionin in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde ein MTS-Assay durchgeführt. Die Viabilität der Kontrollzellen in serumfreien Medium mit 11mM Glukose wurde als 100% definiert. Die Untersuchungen wurden als Triplets durchgeführt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte +/- SD.

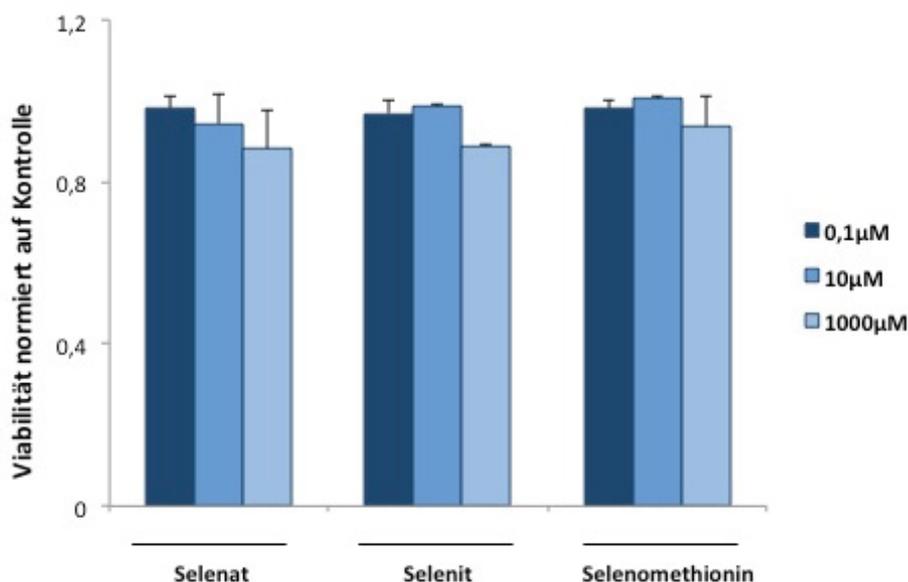


Abb. 20: Einfluss von Selenverbindungen auf die Viabilität der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1

INS-1-Zellen wurden für 24 Stunden mit Selenat, Selenit oder Selenomethionin mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert und anschließend ein Zellcount-Assay durchgeführt. Die Viabilität der Kontrollzellen in serumfreien Medium wurde als 1 definiert. Die Untersuchungen wurden als Triplets durchgeführt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte +/- SD.

4.2.2 Glukose

Ebenso wurde mit Hilfe des MTS-Assays der Einfluss von unterschiedlichen Glukosekonzentrationen untersucht. Es zeigte sich, dass bei einer 24stündigen Stimulation der INS-1-Zellen mit zunehmender Glukosekonzentration bis 16,7mM Glukose die Viabilität zunahm. Bei Zusatz von 1µM Selenat zeigte sich eine ähnliche Viabilität im Vergleich zu den Proben ohne Selenzusatz. Bei zusätzlicher Inkubation mit 10µM Selenat nahm bei einer Glukosekonzentration von 16,7mM die Viabilität ab (Abb. 21).

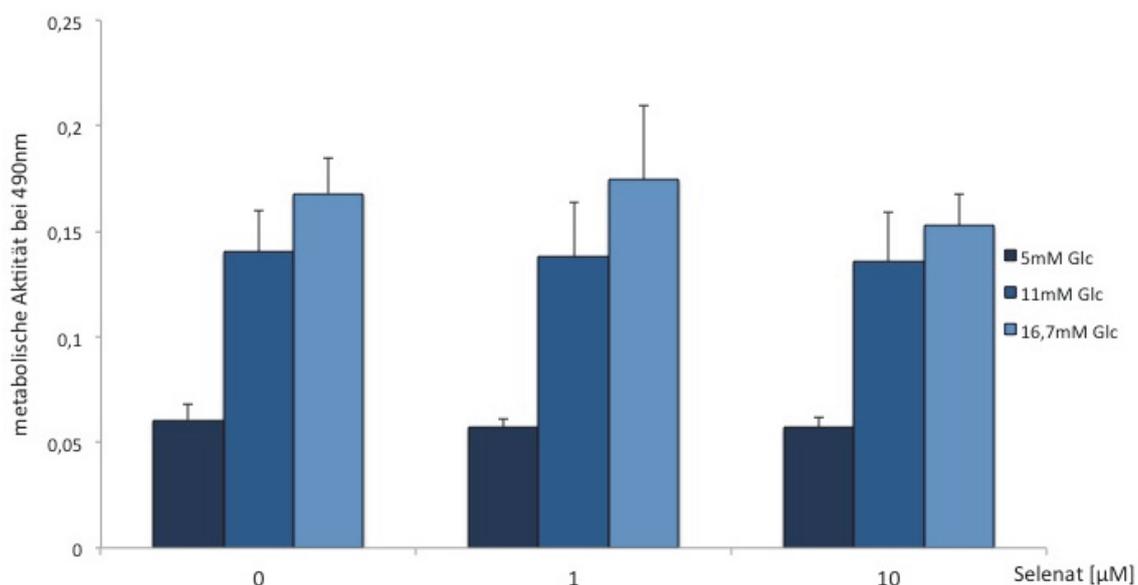


Abb. 21: Einfluss von Glukose auf die Viabilität der INS-1-Zellen

INS-1-Zellen wurden in serumfreien Medium mit Glukose in den angegebenen Konzentrationen mit oder ohne Selenzusatz in den angegebenen Konzentrationen für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Viailität durch einen MTS-Assay (Promega) bestimmt. Die Experimente wurden als Triplets durchgeführt. Die Daten zeigen Mittelwerte +/- SD.

4.2.3 Streptozotocin

Streptozotocin stellt ein Betazelltoxin dar, welches über reaktive Sauerstoffspezies, reaktive Stickstoffspezies und DNA-Alkylierung u.a. zur Apoptose der Zellen führt (60; 77). Daher wurden Konzentrationen des Streptozotocins im MTS-Assay ermittelt, welche für INS-1-Zellen nicht zytotoxisch sind und daher nicht über eine Zytotoxizität die SeP-Expression vermindern könnten.

Zur Untersuchung einer akuten Toxizität des Streptozotocins wurden die INS-1-Zellen über 60 Minuten mit Streptozotocinkonzentrationen von 0,1mmol/l bis 10mmol/l stimuliert und anschließend über 23 Stunden in FCS inkubiert (Abb. 22). Um eine chronische Toxizität zu untersuchen, wurden die INS-1-Zellen über 24 Stunden mit Streptozotocin in Konzentrationen von 0,1mmol/l bis zu 10mmol/l inkubiert (Abb.23). Bei den Versuchen wurde auch verglichen, ob durch die Zugabe von Serum in das Kulturmedium Unterschiede der Viabilität der INS-1-Zellen verursacht werden.

Streptozotocin verminderte bei der 60minütigen Stimulation bis zu einer Konzentration von 2mmol/l nicht die metabolische Aktivität der INS-1-Zellen. Bei einer Konzentration von 5mmol/l und höher setzte es die Viabilität der Zellen auf 50% herab (Abb. 22). Die Langzeitstimulation über 24 Stunden verminderte die Viabilität der Zellen nicht signifikant stärker als die 60minütige Inkubation (Abb.23).

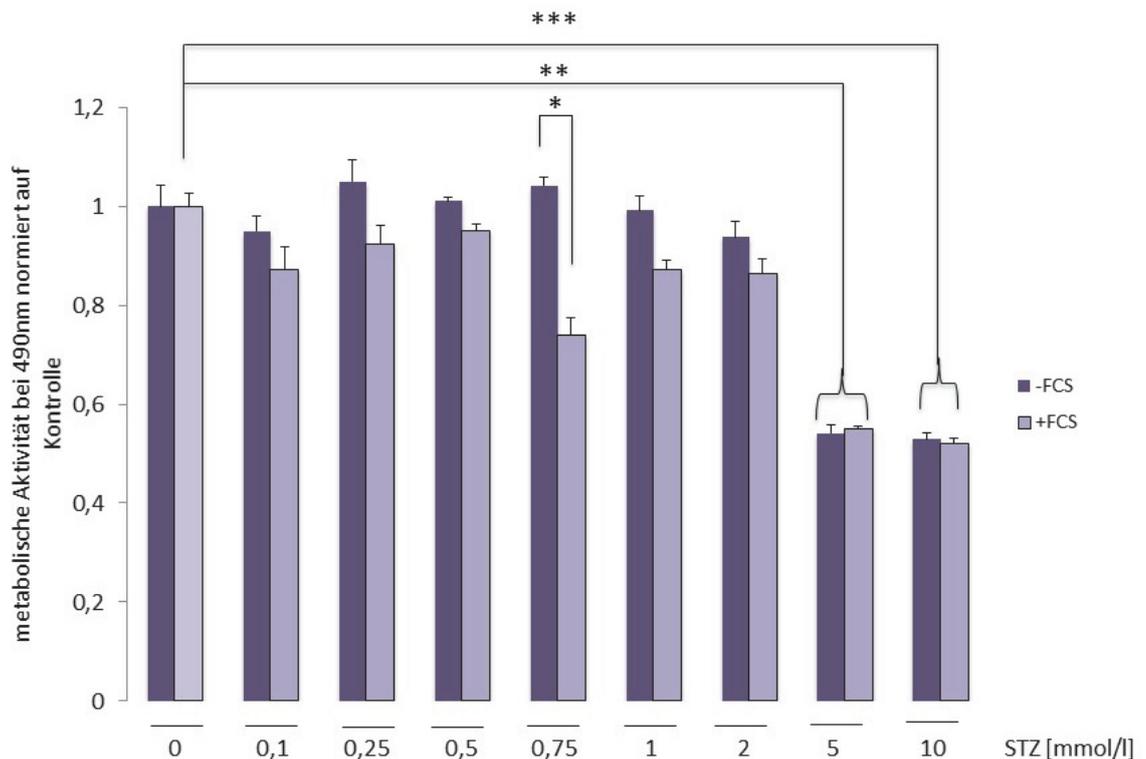


Abb. 22: Einfluss der STZ-Konzentrationen auf die Viabilität der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1

INS-1-Zellen wurden für 60 Minuten mit den angegebenen STZ-Konzentrationen und für weitere 23 Stunden in serumfreiem Medium mit 11mM Glukose ohne Selenzusatz inkubiert. Es wurde anschließend ein MTS-Assay (Promega) durchgeführt. Die Viabilität der Kontrollzellen in serumfreiem Medium wurde als 100% definiert. Die Untersuchungen wurden als Dupletts durchgeführt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte +/- SD. *= $p < 0,05$, **= $p > 0,01$

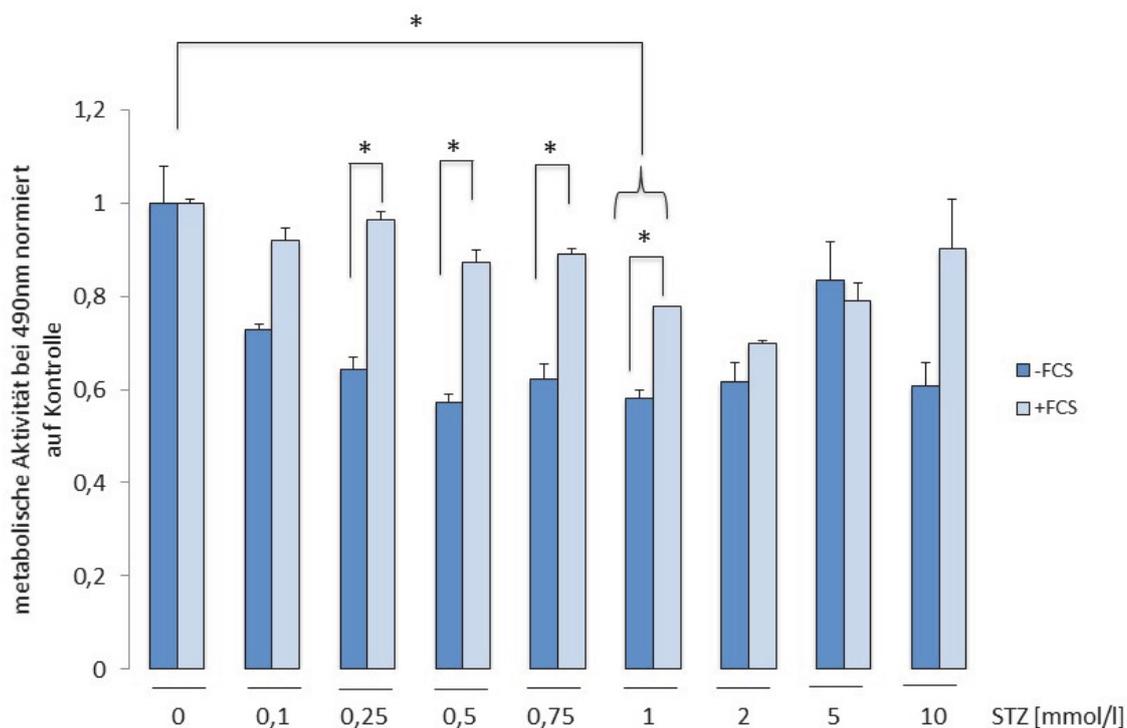


Abb. 23: Einfluss der STZ-Konzentrationen auf die Viabilität der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1

INS-1-Zellen wurden für 24 Stunden mit den angegebenen STZ in serumfreiem Medium mit 11mM Glukose ohne Selenzusatz inkubiert. Es wurde anschließend ein MTS-Assay (Promega) durchgeführt. Die Viabilität der Kontrollzellen in serumfreiem Medium wurde als 100% definiert. Die Untersuchungen wurden als Dupletts durchgeführt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte +/- SD. *= $p < 0,05$, **= $p > 0,01$

4.2.4 Hydroperoxide

Zur Induktion von oxidativem Stress wurden Wasserstoffperoxid und *tert*-Buthylhydroperoxid ausgewählt. Wasserstoffperoxid gilt dabei als ein stärkerer Stressor für die Zellen als *tert*-Buthylhydroperoxid (BHP). Die INS-1-Zellen weisen nur sehr geringen Mengen an Katalase sowie moderate Mengen an GPx1 auf, die u.a. für den Abbau des Wasserstoffperoxids verantwortlich ist (55; 61; 62). Es sollte der Einfluss der Hydroperoxide auf die Viabilität der INS-1-Zellen mit Hilfe des MTS-Assay untersucht werden (Abb.24). Wasserstoffperoxid verminderte signifikant ($p < 0,01$) die Viabilität der INS-1-

Zellen bei einer Konzentration von 100µM und 24stündiger Inkubation auf 41% im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. *Tert*-Buthydroperoxid hingegen bewirkte bei Konzentrationen bis 100µM keine signifikante Reduktion der Viabilität der Zellen (Abb. 24).

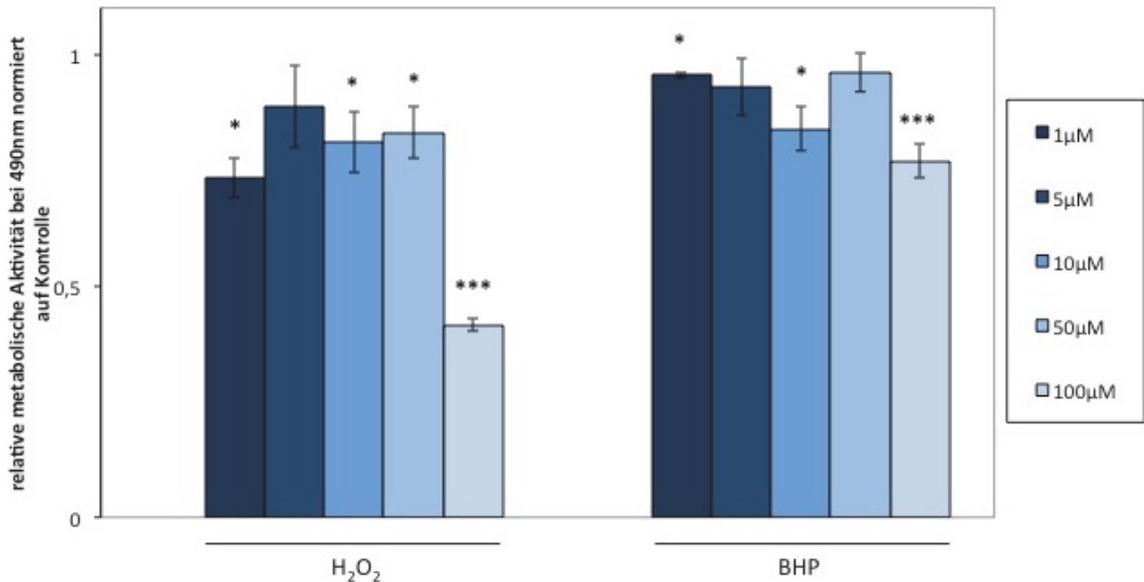


Abb. 24: Einfluss der Hydroperoxide auf die Viabilität der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1
INS-1-Zellen wurden für 24 Stunden mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) oder *tert*-Buthydroperoxid (BHP) mit den angegebenen Konzentrationen in 11mM Glukose ohne Selenzusatz inkubiert. Anschließend wurde ein MTS-Assay (Promega) durchgeführt. Die Viabilität der Kontrollzellen in serumfreien Medium wurde als 100% definiert. Die Untersuchungen wurden als Triplets durchgeführt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte +/- SD.

Zusätzlich wurde durch die Zugabe von Selenat, Selenit und Selenomethionin untersucht, ob diese Selenverbindungen die Viabilität der INS-1- Zellen im

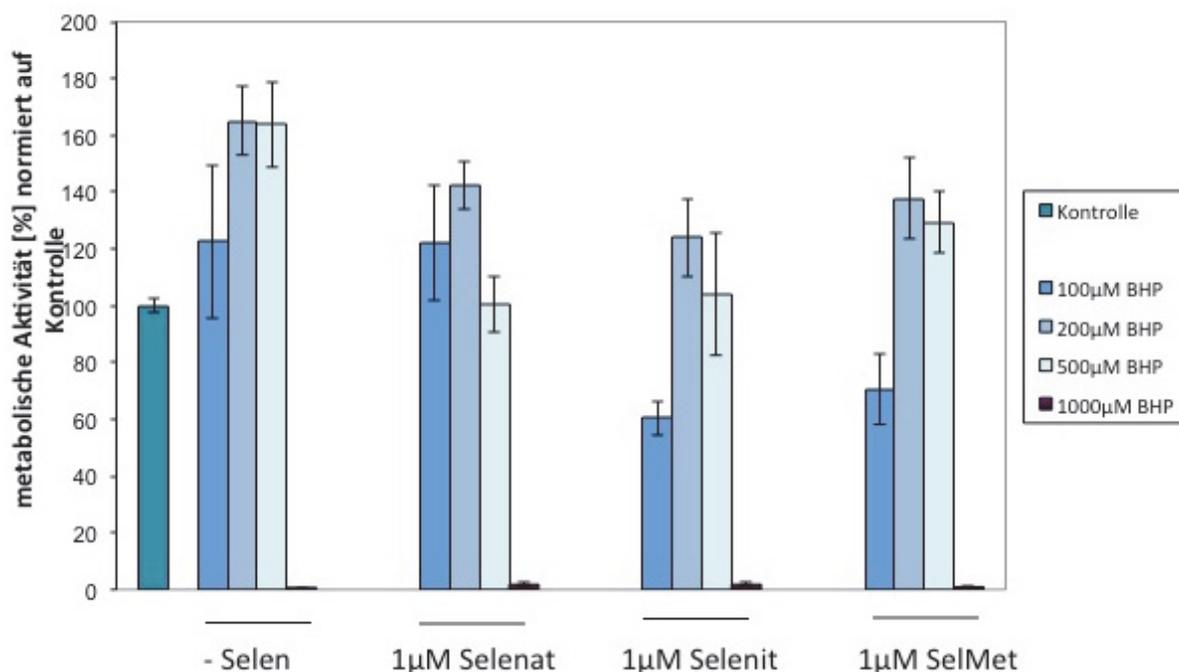


Abb. 25: Einfluss von *tert*-Buthylhydroperoxid auf die Viabilität der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1 bei Zugabe von Selenverbindungen

INS-1-Zellen wurden für 24 Stunden mit *tert*-Buthylhydroperoxid (BHP) in den angegebenen Konzentrationen und zusätzlich mit den Selenverbindungen Selenat, Selenit und Selenomethionin inkubiert. Anschließend wurde ein MTS-Assay (Promega) durchgeführt. Die Viabilität der Kontrollzellen in serumfreiem Medium wurde als 100% definiert. Die Untersuchungen wurden als Triplets durchgeführt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte +/- SD.

Sinne einer Protektion vor den Hydroperoxiden beeinflussen können. Die Koinkubation mit Selenverbindungen erfolgte bei Konzentrationen der Hydroperoxide im Bereich von 100µM bis 1000µM bei BHP bzw. von 100µM bis 500µM bei Wasserstoffperoxid. Es zeigte sich allerdings keine Erhöhung der Viabilität bei Zugabe der Selenverbindungen im Vergleich zur Inkubation mit *tert*-Buthylhydroperoxid (Abb. 25) oder Wasserstoffperoxid in selendefizienten Medien (Abb. 26).

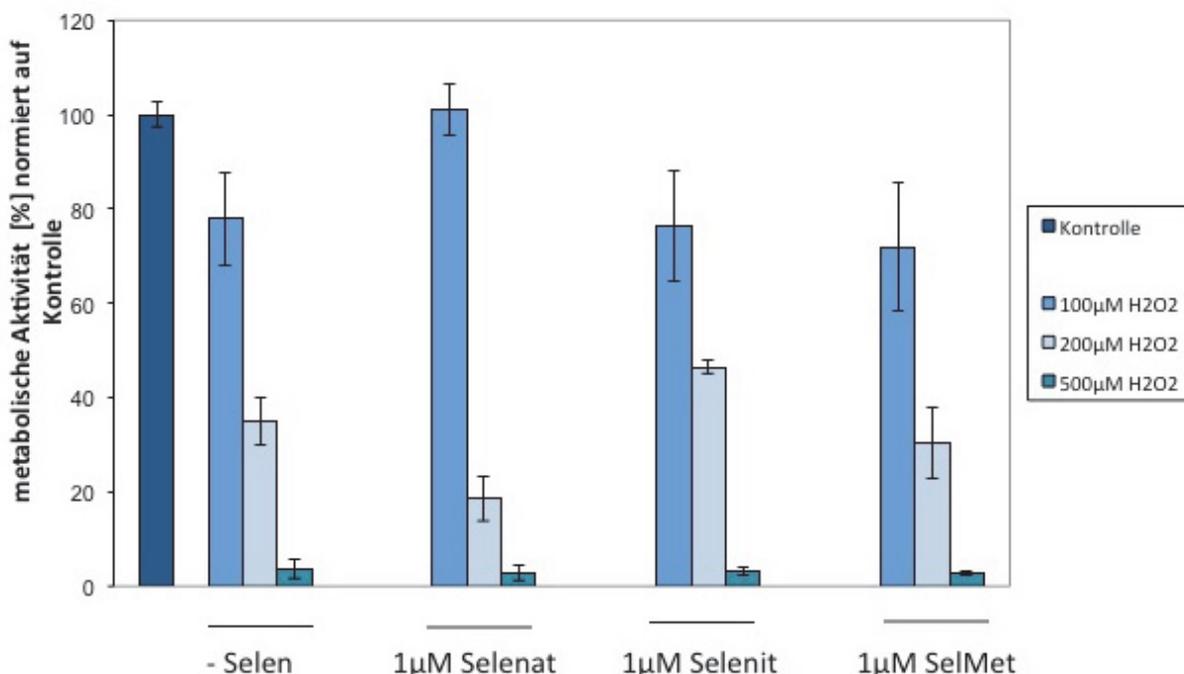


Abb. 26: Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Viabilität der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1 bei Zugabe von Selenverbindungen

INS-1-Zellen wurden für 24 Stunden mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in den angegebenen Konzentrationen und zusätzlich mit den Selenverbindungen Selenat, Selenit und Selenomethionin inkubiert. Anschließend wurde ein MTS-Assay (Promega) durchgeführt. Die Viabilität der Kontrollzellen in serumfreien Medium wurde als 100% definiert. Die Untersuchungen wurden als Triplets durchgeführt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte +/- SD.

4.3 Regulation der SeP-Expression in pankreatischen Betazellen

4.3.1 Inhibition der SeP-Expression in INS-1-Zellen bei erhöhten Glukosekonzentrationen

Der Einfluss von Selenverbindungen und Glukose auf die Biosynthese von Selenoprotein P in Betazellen wurde am Modell der glukoseresponsiven Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1 untersucht (141). Die Biosynthese vieler Selenoproteine ist von einer ausreichenden Selenversorgung abhängig (146). Es konnte bereits gezeigt werden, dass u.a. Selenit, Selenat und Selenomethionin die SeP-Produktion in Hepatozyten stimulieren (147). Die

Proteinexpression von hepatischem SeP wurde hierbei durch die Zugabe von Selenit in einer Konzentration von 100nM über 72 Stunden auf das 6,5fache gesteigert. Selenit stellt somit den stärksten Stimulator unter den Selenverbindungen dar, ist jedoch in höheren Konzentrationen stark toxisch. Die Zugabe von Selenat, Selenomethionin, Selenocystein und Selenomethyl-Selenocystein fördert ebenso die SeP-Expression in Hepatozyten, wenn auch in geringerem Maße als Selenit (147).

In den hier durchgeführten Experimenten regulierte jede der drei Selenverbindungen die SeP-Genexpression in den INS-1-Zellen bei Zugabe von 5mM Glukose signifikant herauf. Der am stärksten stimulierende Effekt wurde bei der Behandlung mit 1 μ M Selenat mit einem 2,8fachen Anstieg der SeP-mRNA beobachtet (Abb. 27). Um den Einfluss einer Hyperglykämie zu untersuchen, wurde die SeP-Genexpression der INS-1-Zellen, welche Selenverbindungen und unterschiedliche Glukosekonzentrationen von 5mM, 11mM und 16,7mM in den Kulturmedien ausgesetzt waren, untereinander verglichen. Diese Glukosekonzentrationen stellen *in vitro* hypoglykämische, normoglykämische und hyperglykämische Zustände dar (141). Hohe Glukosekonzentrationen supprimierten dosisabhängig den seleninduzierten Anstieg der SeP-Genexpression. Ungeachtet der zugesetzten Selenverbindungen erfolgte eine signifikante Abnahme der SeP-mRNA bei 16,7mM Glukose im Vergleich zu 5mM Glukose (Abb. 27). 11mM Glukose führten ebenfalls zu einer Abnahme der SeP-mRNA, diese war jedoch nicht signifikant.

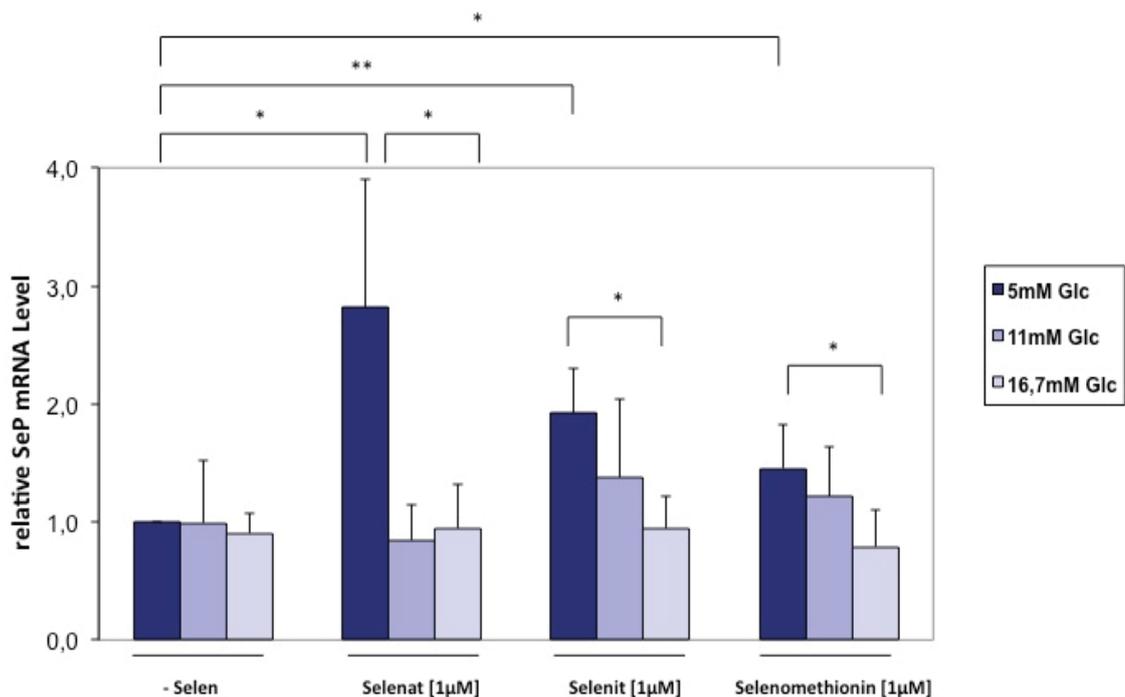


Abb. 27: Modulation der SeP-Expression in der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1 durch Selenverbindungen und Glukose

INS-1-Zellen wurden für 24 Stunden in serumfreien Medium kultiviert oder mit 1µM der jeweiligen Selenverbindung in Kombination mit den angegebenen Glukosekonzentrationen behandelt. Die relative SeP-mRNA wurde mittels *Realtime*-PCR bestimmt. Die SeP-mRNA-Expression bei 5mM Glukose ohne Selenzusatz wurde auf 1 gesetzt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte +/- SD 3er voneinander unabhängiger Experimente.

*p<0,05, **p<0,01

Zusätzlich wurde der Einfluss von Selen und Glukose auf die mRNA-Expression von zwei weiteren Genen in INS-1-Zellen mittels *Realtime*-PCR untersucht:

1. Glutathionperoxidase 1 (GPx1) als ein weiteres Selenoprotein und
2. *peroxisomal proliferator activated receptor-γ coactivator 1α* (PGC-1α) als transkriptioneller Koaktivator.

PGC-1 α ist in der Transkriptionskontrolle von SeP in Hepatozyten involviert (128; 148). Selenat stimulierte GPx1 signifikant, der Einfluss von Selenit war jedoch nicht signifikant (Abb.29). PGC-1 α wurde durch 11mM Glukose im Vergleich zu 5mM Glukose signifikant herunterreguliert. Dieser Effekt war ebenfalls bei Zugabe von Selenat und Selenit zu erkennen, nicht jedoch bei Zugabe von Selenomethionin. Eine signifikante Erhöhung der PGC-1 α -Expression durch Selenverbindungen konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 28).

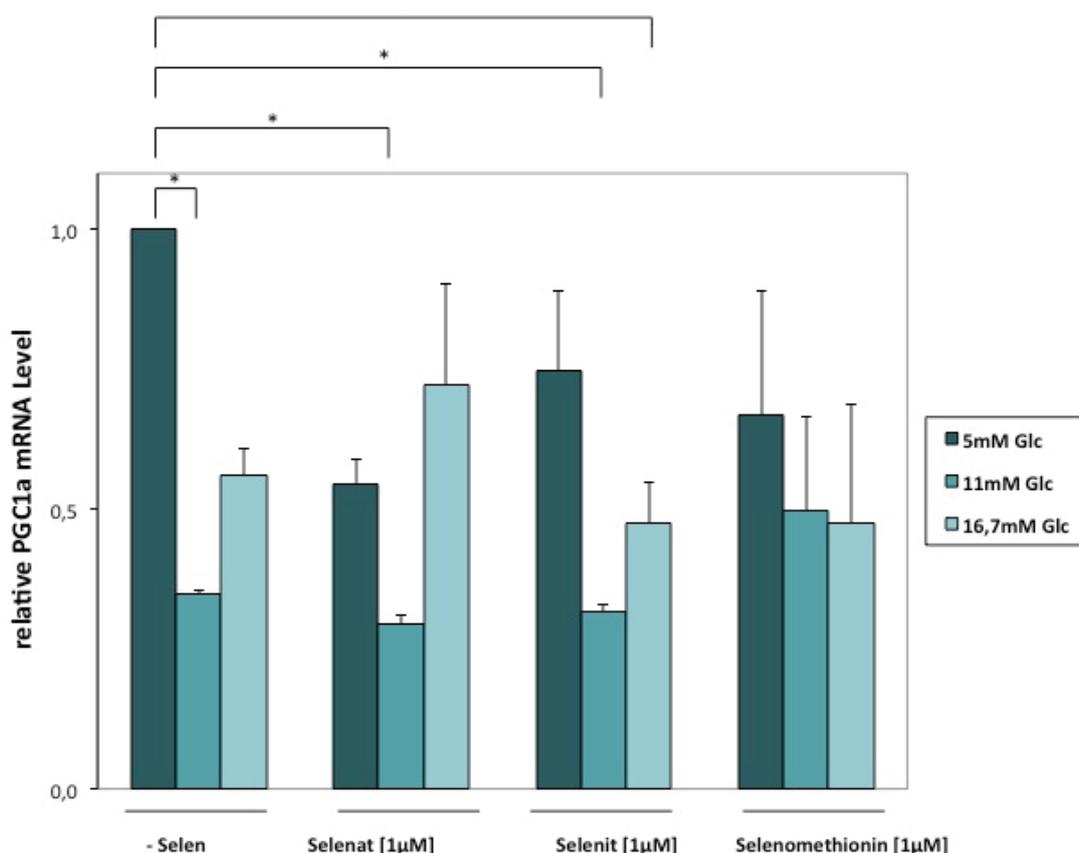


Abb. 28: Modulation der PGC1 α -Expression in der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1 durch Selen und Glukose

INS-1-Zellen wurden für 24 Stunden in serumfreien Medium kultiviert oder mit 1 μ M der jeweiligen Selenverbindung in Kombination mit den angegebenen Glukosekonzentrationen behandelt. Die relativen PGC1 α -mRNA Level wurden mittels *Realtime*-PCR bestimmt, normalisiert auf HPRT1. Die SeP-mRNA-Expression bei 5mM Glukose ohne Selenzusatz wurde auf 1 gesetzt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SD dreier voneinander unabhängiger Experimente. * $p < 0,05$

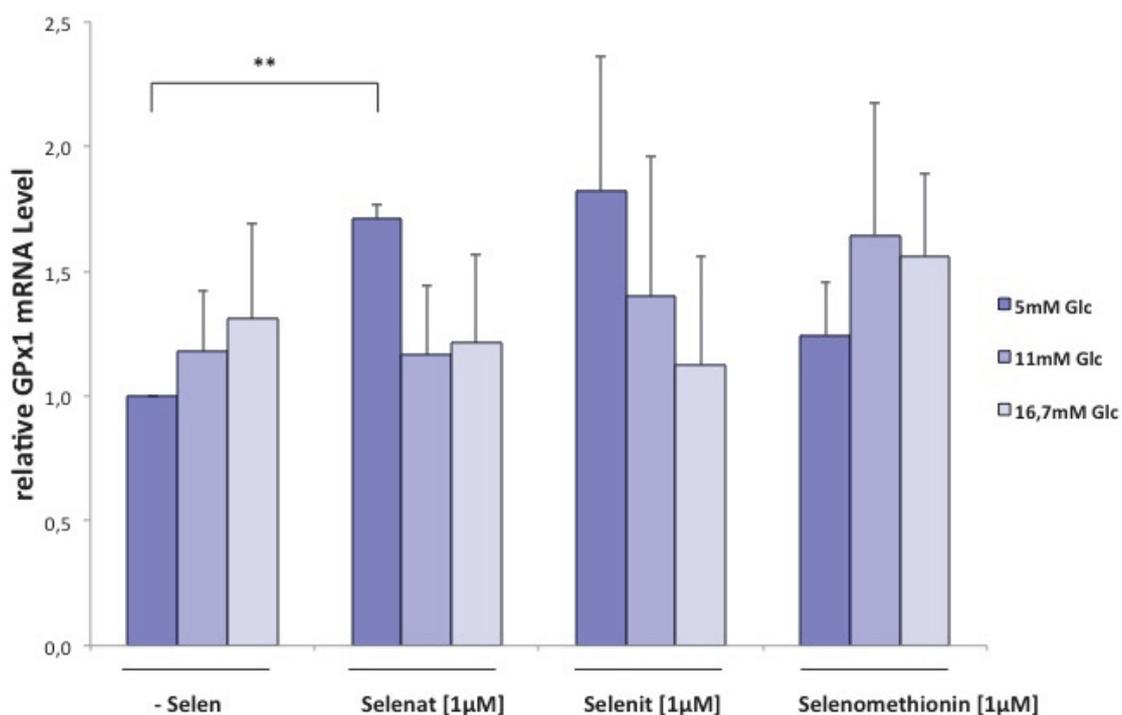


Abb. 29: Modulation der GPx1-Expression in der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1 durch Selen und Glukose

INS-1-Zellen wurden für 24 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert oder mit 1µM der jeweiligen Selenverbindung in Kombination mit den angegebenen Glukosekonzentrationen behandelt. Die relativen GPx1-mRNA Level wurden mittels *Realtime*-PCR bestimmt, normalisiert auf HPRT1. Die SeP-mRNA-Expression bei 5mM Glukose ohne Selenzusatz wurde auf 1 gesetzt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte +/- SD dreier voneinander unabhängiger Experimente. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$

Anschließend wurde untersucht, ob die Effekte von Selen und Glukose auf die mRNA-Expression von SeP durch Beeinflussung der Promotoraktivität in INS-1-Zellen vermittelt werden. Da der SeP-Promotor für die Ratte in der Literatur bisher nicht beschrieben war, wurde zunächst ein etwa 1500bp großes Fragment des Ratten-SeP-Promotors kloniert und sequenziert. Dazu wurde genomische DNA aus INS-1-Zellen isoliert. Ein 1500bp großes Fragment,

welches direkt vor der Translationsstartseite der hauptsächlich exprimierten Transkriptvariante 1 des Selenoprotein P lokalisiert ist, wurde mittels PCR amplifiziert und in den Luciferase Reporter pGL3 Basic Genvektor kloniert. Die klonierte Ratten-SeP-Promotorregion wurde anhand der Sequenz der homologen humanen SeP-Promotorregion ausgewählt (*GenBank accession number*: Y12262) (121). Durch Sequenzierung der klonierten DNA konnte gezeigt werden, dass der Ratten-SeP-Promotor ein TATA-Motiv enthält,

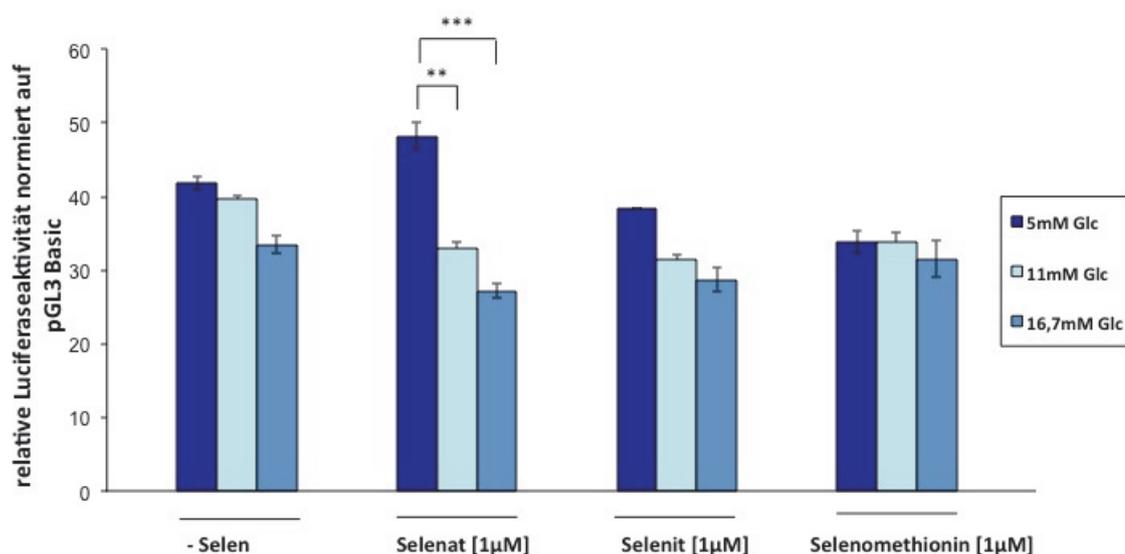


Abb. 30: Regulation der SeP-Promotoraktivität durch Selen und Glukose

INS-1-Zellen wurden wie in Abb. 27 stimuliert und mittels eines Luciferase-Reportergen-Konstrukts mit dem SeP-Promotor-Konstrukt (im Leervektor pGL3 basic) und pRL-TK, einem Renilla-Luciferase-Plasmid, kotransfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurde die Luciferaseaktivität in den Zelllysaten bestimmt. Die Werte wurden auf die Aktivität des Promotor/Luciferase Konstrukts pGLBbasic normiert. Zellen wurden zur Kontrolle mit dem Leervektor pGL3 Basic transfiziert. Die Daten zeigen Mittelwerte +/- SD von drei bis fünf voneinander unabhängigen Experimenten.

p<0,01, *p<0,001

welches darauf hinweist, dass die SeP-Transkription durch die RNA-Polymerase II erfolgt, sowie eine kombinierte Bindungsstelle für *hepatocyte nuclear factor 4α* (HNF-4α) und *forkhead box O1a* (FoxO1a) aufweist, welche für die hohe SeP-Expression in Hepatozyten verantwortlich ist (128). Die SeP-Promotoraktivität wurde durch Selen nicht signifikant verändert. Hochglukose jedoch (11mM oder 16,7mM) inhibierte die SeP-Promotoraktivität signifikant, wenn diese in Kombination mit Selenat zur Stimulation verwendet wurde (Abb. 30).

Da die stärkste Beeinflussung sowohl der SeP-Genexpression als auch der Promotoraktivität in den INS-1-Zellen durch Selenat und Hochglukose beobachtet wurden (Abb. 27 und 30), wurde der Einfluss dieser Stimuli ebenfalls auf die Proteinexpression von Selenoprotein P untersucht. Die intrazellulären SeP-Proteinlevel wurden durch Selenat bei normoglykämischen Bedingungen erhöht. Hohe Glukosekonzentrationen (11mM und 16,7mM Glukose) supprimierten den stimulatorischen Effekt des Selenats. Diese Ergebnisse waren aufgrund der hohen Variation auf Proteinebene jedoch nicht signifikant (Abb. 31).

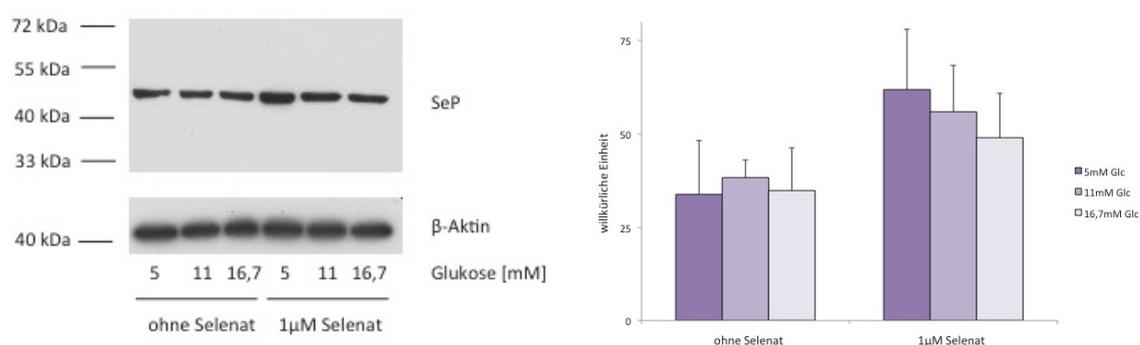


Abb. 31: Einfluss von Selenat und Glukose auf die SeP-Proteinexpression in INS-1-Zellen

INS-1-Zellen wurden für 24 Stunden in serumfreiem Medium oder mit 1 μ M Selenat in Kombination mit Glukose in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die SeP- Proteinlevel wurden mittels Immunoblot von Zelllysaten bestimmt, als Ladekontrolle diente β -Aktin. Abb. 31a (linke Seite) zeigt einen repräsentativen Western Blot aus drei Experimenten. Abb. 31b zeigt die densitometrische Analyse dreier voneinander unabhängiger Experimente. Die Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SD.

Das Molekulargewicht des in den INS-1-Zelllysaten detektierten Selenoprotein P entsprach der 45kDa-SeP Isoform, welche zuvor in humanen Astrozyten und murinen Adipozyten beschrieben wurde (110; 111). Da SeP vor allem als ein extrazelluläres Protein bekannt ist (136), wurden Überstände der INS-1-Zellen auf SeP untersucht. Allerdings konnte selbst in 40fach konzentrierten Überständen keine sezernierte SeP-Isoform ermittelt werden (Abb. 32).

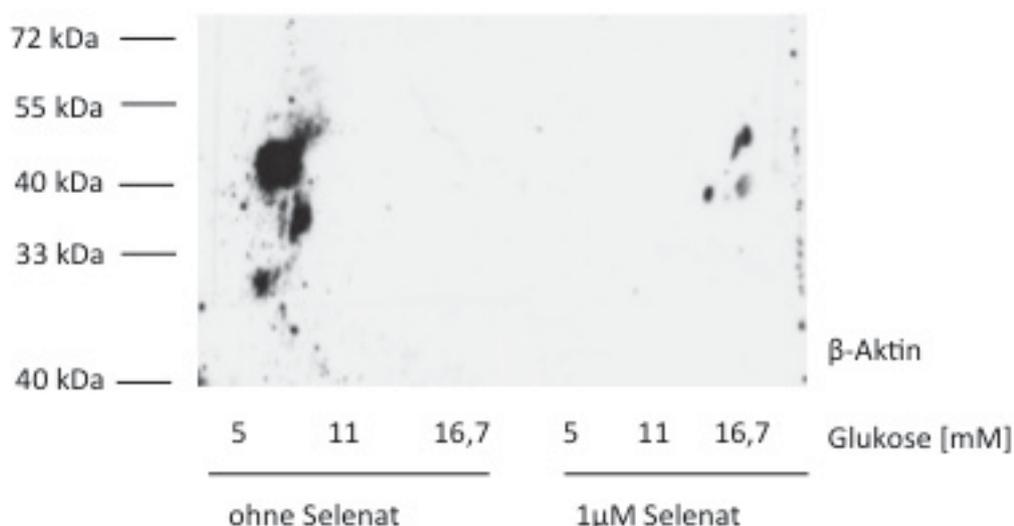


Abb. 32 Proteinexpression des SeP in 40fach konzentrierten Überständen

INS-1-Zellen wurden für 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert oder mit 1µM Selenat in Kombination mit Glukose in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Die Überstände wurden abgenommen und bis zu 40fach mittels VivaSpin aufkonzentriert. Die SeP-Proteinlevel wurden dann mittels Immunoblotten von Zelllysaten bestimmt, als Ladekontrolle diente β-Aktin. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot aus drei Experimenten, in denen keine sezernierte Form des SeP in den Überständen nachgewiesen werden konnte.

4.3.2 Destabilisierung der SeP-mRNA in INS-1-Zellen durch Hochglukose

Hohe Glukosekonzentrationen beeinflussen die Stabilität von mRNAs inklusive der Insulin-mRNA in den Betazellen (149). Um zu untersuchen, ob die SeP-mRNA bei erhöhten Glukosekonzentrationen schneller degradiert wird, wurden INS-1-Zellen mit dem Transkriptioninhibitor Aktinomycin D behandelt. Die Zugabe von Aktinomycin D bedingt durch Einlagerung in die DNA eine vorzeitige Beendigung der Transkription. Durch Aktinomycin D wurde die SeP-mRNA verringert. Durch zusätzliche Inkubation mit hohen Glukosekonzentrationen wurde sie weiter dezimiert: Nach 20stündiger Inkubation mit Aktinomycin D war die SeP-mRNA bei 5mM Glukose auf 36% vermindert, bei Glukosekonzentrationen von 16,7mM sogar auf 12% (Abb.33). Hohe Glukosekonzentrationen scheinen daher die SeP-mRNA in Betazellen zu destabilisieren.

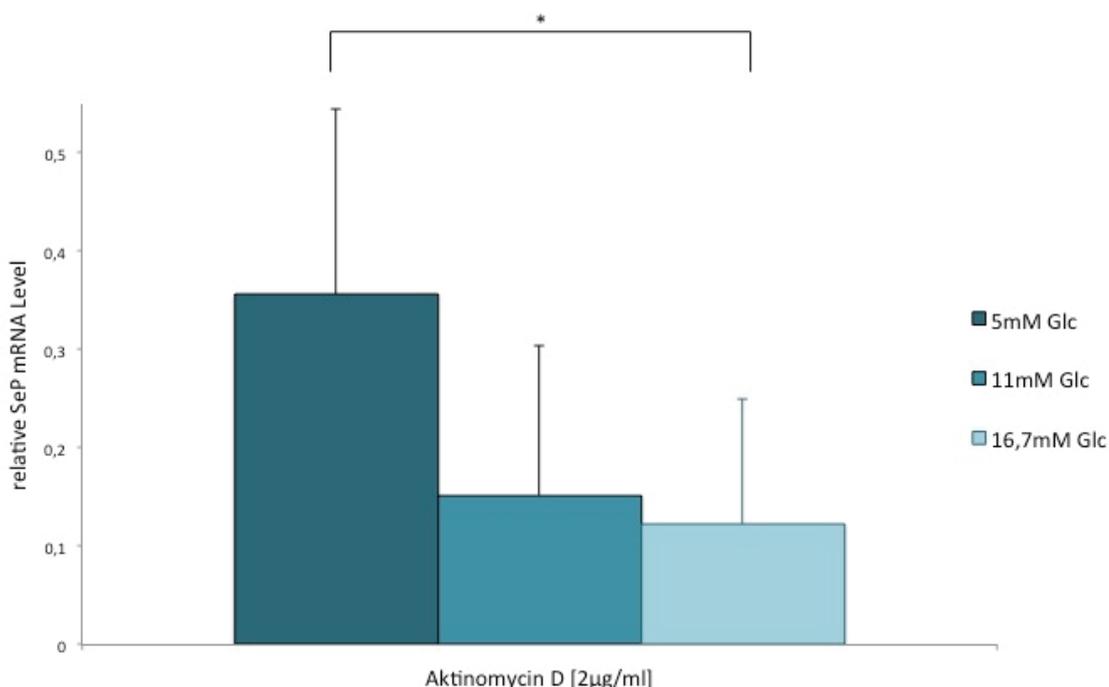


Abb. 33: Destabilisierung der SeP-mRNA

INS-1-Zellen wurden über 20 Stunden in serumfreiem Medium, welches mit den angegebenen Glukosekonzentrationen versetzt war, inkubiert und mit Aktinomycin D in einer Konzentration von 2 µg/ml behandelt. Die SeP-mRNA wurden mittels *Realtime*-PCR analysiert. HPRT1 wurde für die Normalisierung herangezogen. Die SeP-mRNA-Expression bei 5mM Glukose wurde auf 1 gesetzt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte +/- SD von fünf voneinander unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$).

4.3.3 Inhibition der SeP-Genexpression in murinen Inseln durch Hochglukose

Um die beobachteten inhibitorischen Effekte der Glukose auf die SeP-Expression in Betazellen zu verifizieren, wurden primäre Inseln muriner Pankreata steigenden Glukosekonzentrationen von 2,75mM Glukose (Hypoglykämie) bis zu 22mM Glukose (schwere Hyperglykämie) exponiert (141). Anschließend wurden die SeP-mRNA-Level mittels *Realtime*-PCR analysiert. Im Vergleich zu 5,5mM Glukose (Normoglykämie), war die SeP-Genexpression in den primären Inseln bei 2,75mM Glukose nicht verändert. Bei Inkubation in einem Medium mit 11mM Glukose war die SeP-Expression signifikant auf 76% vermindert, bei 22mM Glukose signifikant auf 72% (Abb. 34).

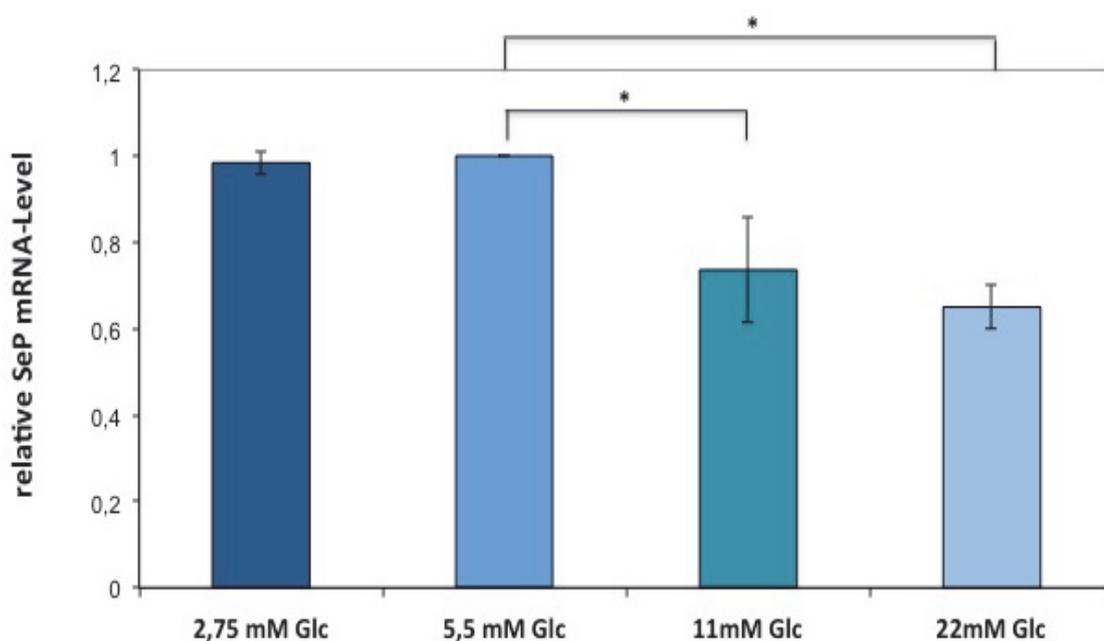


Abb. 34: Einfluss der Glukosekonzentrationen auf die SeP-mRNA-Expression in isolierten murinen Inseln

Isolierte murine Inseln wurden in Krebs-Ringer-Lösung mit den angegebenen Glukosekonzentrationen für 24 Stunden inkubiert. Die SeP-mRNA-Level wurden mittels *Realtime*-PCR analysiert und gegen HPRT1 normalisiert. Die SeP-Genexpression bei 5,5 mM Glukose (Normoglykämie) wurde auf 100% gesetzt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte +/- SD von drei voneinander unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$).

4.3.4 Einfluss von Hydroperoxiden auf die SeP-Expression

Da die pankreatischen Betazellen nur sehr geringe Mengen an Katalase und moderate Mengen an Superoxiddismutase aufweisen (55), sollte untersucht werden, ob die Induktion von oxidativem Stress die Expression von Selenoprotein P als antioxidatives Enzym der Betazelle verändert. Dadurch sollte ermittelt werden, ob Selenoprotein P die Betazellen vor oxidativem Stress schützen und ihre antioxidative Kapazität erhöhen kann.

Nach Testung der Zytotoxizität des *tert*-Butylhydroperoxids und des Wasserstoffperoxids (siehe Kapitel 4.2.4) wurden die INS-1-Zellen mit nicht-toxischen Konzentrationen beider Hydroperoxide bis 50 μ M mit Zusatz von den in den Abbildungen aufgeführten Selenverbindungen über 24 Stunden in serumfreien Medium inkubiert und anschließend die SeP-Expression mittels

Western Blot und *Realtime*-PCR analysiert. Zum Vergleich der Effekte erfolgte ebenso parallel eine Analyse der RNA-Proben auf PGC1 α .

Es konnten jedoch keine signifikanten Veränderungen der Proteine auf mRNA-Ebene oder auf Proteinebene festgestellt werden (Abb. 35-37).

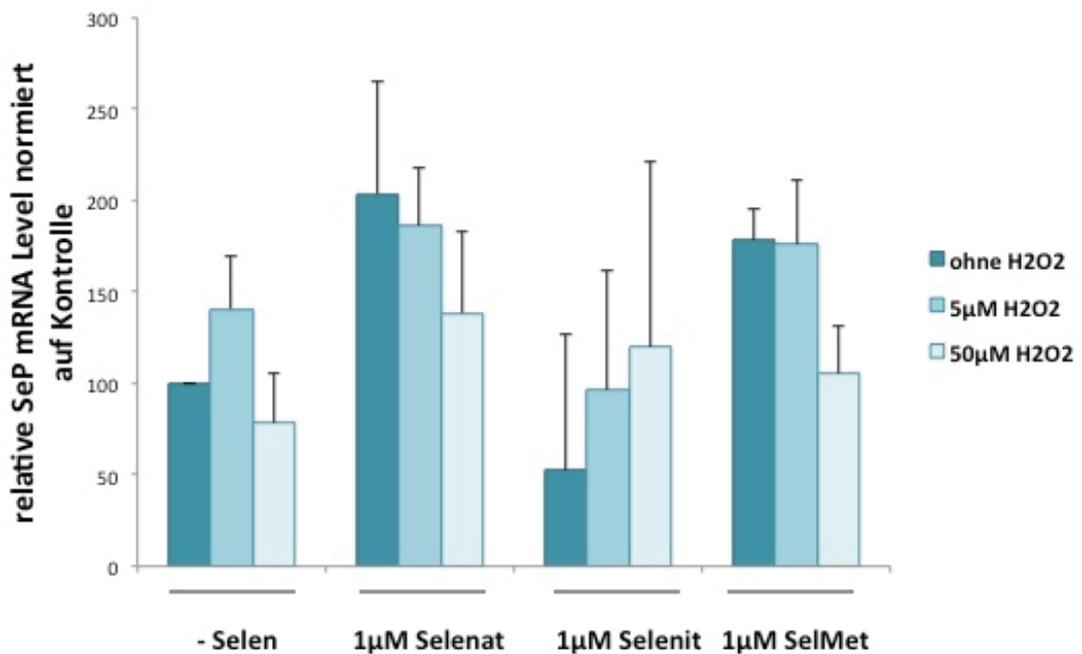


Abb. 35: Modulation der SeP-mRNA-Expression in der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1-Zellen durch Wasserstoffperoxid

INS-1-Zellen wurden mit den angegebenen Wasserstoffperoxidkonzentrationen und Selenverbindungen für 24 Stunden in serumfreien Medium inkubiert. Die SeP-mRNA-Level wurden mittels *Realtime*-PCR analysiert und gegen HPRT1 normalisiert sowie auf die Kontrolle relativiert. Die Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SD fünf voneinander unabhängiger Experimente.



Abb. 37: Proteinexpression des SeP nach Stimulation mit H₂O₂

1: Kontrolle, 2: 5 μM H₂O₂, 3: 50 μM H₂O₂, 4: 1 μM Selenat, 5: 1 μM Selenat, 5 μM H₂O₂, 6: 1 μM Selenat, 50 μM H₂O₂

INS-1-Zellen wurden für 24 Stunden in serumfreien Medium mit den angegebenen Konzentrationen an H₂O₂ und Selenverbindungen inkubiert. Die SeP Proteinlevel wurden mittels Immunoblotten von Zelllysaten bestimmt, als Ladekontrolle diente α-Tubulin. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot aus drei Experimenten

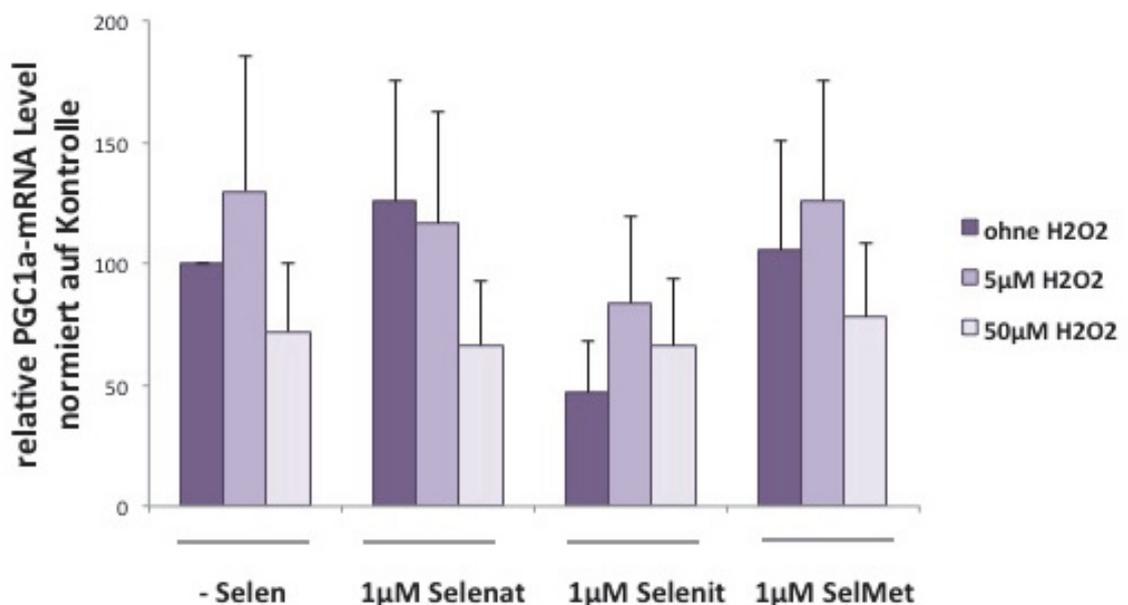


Abb. 36: Modulation der PGC1α-mRNA-Expression in der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1-Zellen durch Wasserstoffperoxid

INS-1-Zellen wurden mit den angegebenen Wasserstoffperoxidkonzentrationen und Selenverbindungen für 24 Stunden in serumfreien Medium inkubiert. Die PGC1α-mRNA-Level wurden mittels *Realtime*-PCR analysiert und gegen HPRT1 normalisiert sowie auf die Kontrolle relativiert. Die Abbildung zeigt Mittelwerte +/- SD drei voneinander unabhängiger Experimente.

4.3.5 Einfluss von Streptozotocin auf die SeP-Genexpression in INS-1-Zellen

Streptozotocin aus der Gruppe der Nitrosoharnstoffe stellt ein Betazelltoxin zur Induktion eines Diabetes mellitus bei Versuchstieren dar. Es verursacht eine DNA-Alkylierung mit konsekutiver Unterbindung der Zellteilung (77). Zusätzlich induziert Streptozotocin durch die Produktion von Superoxid und Stickstoffmonoxid oxidativen bzw. nitrosativen Stress (150; 151). Um den Effekt von Streptozotocin auf die SeP-Expression in Betazellen *in vitro* zu untersuchen, wurden INS-1-Zellen über 24 Stunden mit Streptozotocin inkubiert. Die SeP-Genexpression wurde jedoch weder bei Selenzusatz noch ohne Selenzusatz signifikant durch Streptozotocin verändert (Abb. 37).

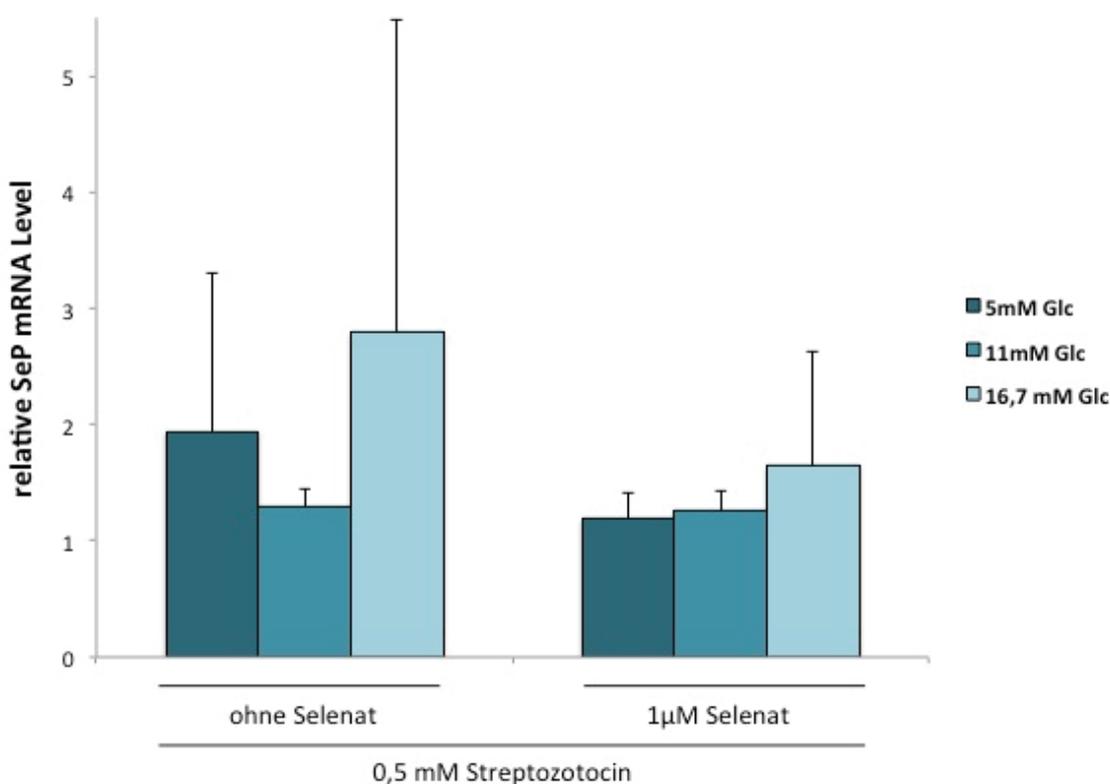


Abb. 38: Modulation der SeP-mRNA-Expression in INS-1-Zellen durch STZ

INS-1-Zellen wurden mit 0,5mM Streptozotocin, den angegebenen Glukosekonzentrationen und ohne Selen oder mit Selenzusatz für 24 Stunden inkubiert. Die SeP-mRNA wurde mittels *Realtime*-PCR analysiert, auf 5 mM Glukose relativiert und gegen β -Aktin normalisiert. Die Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SD von drei voneinander unabhängigen Experimenten.

4.3.6 Erhöhung der pankreatischen SeP-Expression in streptozotocinbehandelten Mäusen

Um die Effekte von Streptozotocin auf die pankreatische SeP-Expression *in vivo* zu untersuchen, wurden Wild-Typ C57/B16 Mäuse mit 40mg/kg Körpergewicht Streptozotocin (STZ) behandelt. Der Blutzucker wurde jeden zweiten Tag gemessen. Die Tiere wurden nach ein bis zwei Wochen nach der Streptozotocinbehandlung getötet. Die Mäuse wurden eine Woche nach der Behandlung mit einem Nüchternblutzucker von 8,0 bis 14,7mM prädiabetisch. Nach zwei Wochen wurden die Mäuse mit einem Nüchternblutzucker von 17,0 bis 18,6mM diabetisch. Die SeP-Expression in den pankreatischen Inseln wurde mittels Immunhistochemie untersucht. Die pankreatische SeP-Expression war kurze Zeit (bis zu 7 Tagen) nach der Streptozotocinbehandlung erhöht (Nüchternblutzucker 8,0mM, Abb. 39b und 39c). Auf lange Sicht verminderte sich die pankreatische SeP-Expression parallel zum Untergang der Betazellmasse. Dies resultierte in steigenden Blutzuckerwerten nach der Streptozotocinbehandlung (Abb. 39d und 39e).

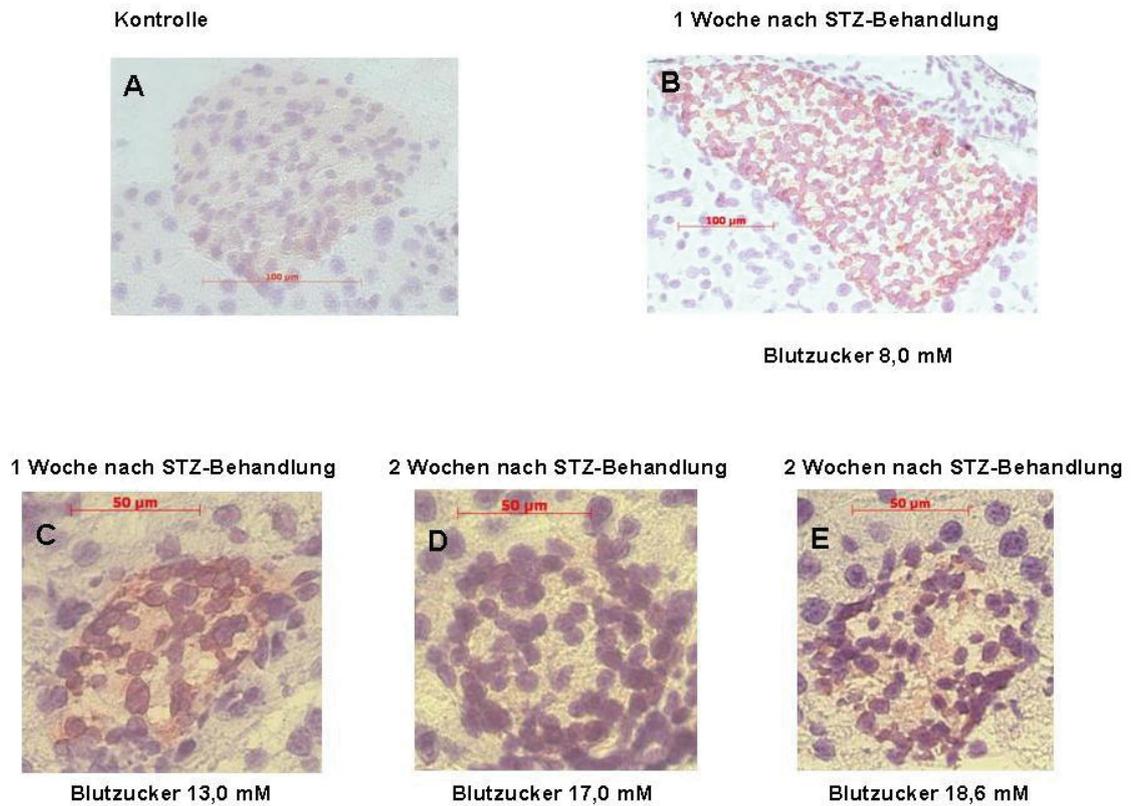


Abb. 39: Modulation der pankreatischen SeP-Expression in STZ-Mäusen

Pankreatische Teilschnitte von mit Streptozotozin (40 mg/kg KG) behandelten C57/B16 Mäusen wurde mittels Immunhistochemie auf Selenoprotein P untersucht.

(A) nicht behandelte Kontrolle

(B) und (C): SeP-Detektion eine Woche nach der Behandlung

(D) und (E): SeP-Detektion zwei Wochen nach der Behandlung

Unter den Abbildungen sind die jeweiligen Blutzuckerwerte angegeben.

5 Diskussion

5.1 Die Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies für die pankreatische Betazelle

Bei Diagnosestellung des Diabetes mellitus Typ 2 ist die Betazell-Funktion bereits um 50% reduziert. Ein progredienter Abfall beeinflusst das Ansprechen auf die Therapie (152). Spezifische Ursachen der Betazell-Dysfunktion bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 sind zum einen ein initialer Verlust der Betazellmasse, zum anderen eine erhöhte Apoptoserate bzw. eine verminderte Regeneration der Betazellen (70). Darüber hinaus führen eine langandauernde Insulinresistenz, die Lipotoxizität und die Glukotoxizität zu einem Betazell-Versagen. Die Apoptoserate kann durch verschiedene Faktoren erhöht werden. Zu diesen gehören unter anderem eine chronische Hyperglykämie und oxidativer Stress (48; 44; 153; 43).

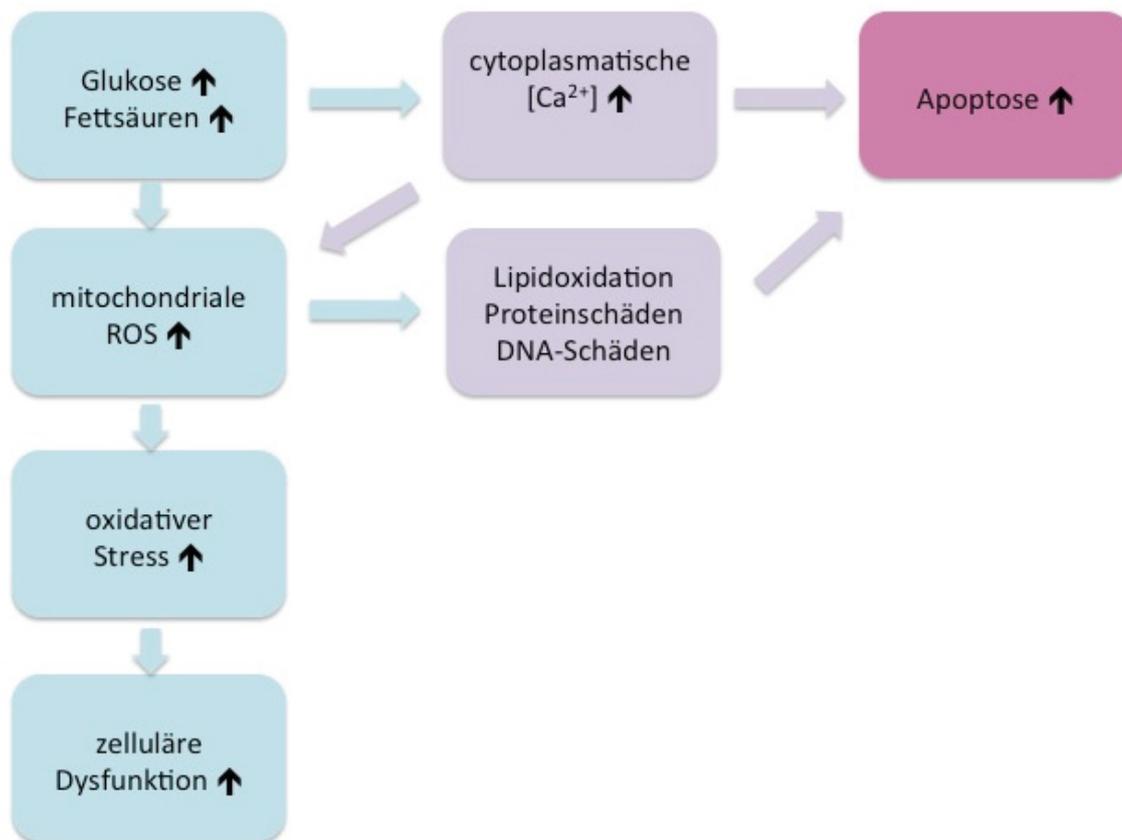


Abb. 40: Kausaler Zusammenhang zwischen erhöhten mitochondrialen ROS-Konzentrationen, oxidativem Stress, Betazell­dysfunktion und Apoptose

Durch Hyperglykämie und erhöhten Konzentrationen an Fettsäuren, wird der Fluss in der Atmungskette angeregt, sodass vermehrt ROS entstehen, welche zu oxidativem Stress mit konsekutiver zellulärer Dysfunktion führen. Oxidativer Stress induziert ferner Oxidationen verschiedener Proteine. Zusammen mit einer erhöhten zytoplasmatischen Calciumkonzentration führen diese Faktoren zu einer gesteigerten Apoptoserate und Insulinresistenz. Modifiziert nach (73)

Oxidativer Stress entsteht durch verschiedene Stoffwechselwege und Zellfunktionen, wie z.B. die Atmungskette. Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies, wie das Superoxid und das Wasserstoffperoxid erfüllen dabei eine duale Funktion: Geringe Konzentrationen fungieren als *second messenger* in intrazellulären Signalkaskaden. Diese können die Insulinsekretion verstärken und sind hierfür von essentieller Bedeutung (63). Die Supplementation mit Antioxidantien verminderte dabei die Insulinsekretion. Hohe Konzentrationen hingegen können Dysfunktion und Apoptose verursachen und zusätzlich die GSIS in pankreatischen Inseln und INS-1-Zellen vermindern (69). Die Stimulation der Betazelllinie INS-1 mit Wasserstoffperoxid und *tert*-BHP zeigt, dass Wasserstoffperoxid bereits in geringeren Konzentrationen als *tert*-BHP die

Viabilität der INS-1-Zellen vermindert (Abb.24). Wasserstoffperoxid wird über die Katalase und die Glutathionperoxidase abgebaut, *tert*-BPH wird nur über die Glutathionperoxidase abgebaut. Beide Hydroperoxide können jedoch auch nicht-enzymatisch zerfallen (154). Aufgrund des geringen Vorkommens der Katalase in pankreatischen Betazellen und den INS-1-Zellen sind die Zellen vermutlich für Wasserstoffperoxid anfälliger als für BHP. Dies kann auch durch die Zugabe verschiedener Selenverbindungen nicht verhindert werden (Abb.26). Die Glutathionperoxidase 1 ist in die Redox-Homöostase bei der Insulinsignaltransduktion involviert (154). Sie kommt in ebenso geringen Mengen wie die Katalase in pankreatischen Betazellen vor (55). Die GPx1 besitzt gegenüber Wasserstoffperoxid eine größere Affinität als für *tert*-BPH, sodass Wasserstoffperoxid schneller entgiftet wird (65).

Weitere Studien untersuchten den Effekt von hohen Glukosekonzentrationen auf die Insulinsekretion *in vivo*. Durch die Stimulation mit hohen Glukosekonzentrationen wird die maximale Rate der GSIS (53) und der Insulingehalt der untersuchten Inseln reduziert (52; 155). Die Inseln zeigen eine erhöhte Glukosesensitivität, jedoch mit verringerter Glukoseempfindlichkeit. Die Insulinsekretion wird bereits bei präprandialen Glukosekonzentrationen stimuliert. Diese Stimulation betrifft sowohl den initialen Calcium-Einstrom, der die GSIS auslöst, als auch den verstärkenden Signalweg der GSIS über die Steigerung der calciuminduzierten Exozytose (156). Durch postprandial erhöhte Glukosekonzentrationen erfolgte kein weiterer Anstieg der Insulinsekretion, sodass der Bedarf nicht ausreichend gedeckt werden konnte (156).

Die Experimente zur Viabilität der Betazellen haben gezeigt, dass die Zellen gegen einige der verwendeten Stimulantien besonders anfällig sind. Selen ist bekannt dafür, die Betazellfunktion zu beeinflussen. In dieser Arbeit waren Selenat und Selenomethionin bis zu einer Konzentration von 100µM nicht schädlich für die INS-1-Zellen. Selenit hingegen halbiert die metabolische Aktivität der INS-1-Zellen bereits ab einer Konzentration von 10µM. Selenverbindungen wirken in niedrigen Dosen durch die Stimulation von Selenoenzymen antioxidativ. In hohen Dosen jedoch wirkt vor allem Selenit durch die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies prooxidativ (157; 158).

Weitere *in vitro* und *in vivo* Studien konnten zeigen, dass Selen wichtige Aspekte der Betazelle und der Insulinsignalkaskade reguliert. Selenit und Selenat stimulieren wahrscheinlich durch die Erhöhung der intrazellulären GPx1-Aktivität die Biosynthese und Sekretion des Insulins in Min6 Insulinoma Zellen und isolierten Ratteninseln (159). Die Zugabe von Selenverbindungen erhöht daher u.a. den Insulingehalt und die Insulinsekretion in Langerhans'schen Inseln (159). Jedoch wurde ebenso gezeigt, dass Selensupplementation zu einer erhöhten Expression der GPx führt. Dadurch wiederum werden Hydrogenperoxide vermehrt entgiftet. Konsekutiv verringert sich die Insulinsignalkaskade, da die *second messenger* in Form von ROS und RNS vermindert vorkommen (160).

5.2 Die Lokalisation und Expression von SeP im Pankreas

Selenoprotein P-mRNA wird ubiquitär in humanen und murinen Geweben sowie in Geweben der Ratte exprimiert (145; 136). Die mRNA des SeP kann in den meisten Zellverbänden nachgewiesen werden. Die Leber ist darüberhinaus in der Lage, SeP in größeren Mengen aus ihren Zellen in die Blutbahn zu sezernieren (136). Zusätzlich konnte Selenoprotein P-mRNA bereits in der pankreatischen Betazelllinie β TC3 (139) und in embryonalen Geweben nachgewiesen werden (144).

In dieser Arbeit konnte die SeP-Expression in humanen und murinen Inseln des Pankreas sowie in der Ratten-Insulinomazelllinie INS-1 nachgewiesen werden (Abb. 13, 14, 15, 16 und 17). Hierbei scheint die Proteinexpression im Pankreas jedoch auf die Langerhans'schen Inseln beschränkt zu sein. In diesen ist SeP sowohl mit Insulin in Betazellen als auch mit Glukagon in Alphazellen kolokalisiert (Abb.14 und 15). Als *in vitro* Modell wurde die immortalisierte Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1 untersucht. Auch hier konnte die Expression von Selenoprotein P festgestellt werden (Abb.13). Im Vergleich zur Glucagon-produzierenden Zelllinie INR1G9 war diese bei den INS-1-Zellen höher. In der Alphazelllinie α TC1 konnte zuvor jedoch keine Expression von SeP auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (139). Das SeP in INS-1-Zellen lässt sich darüber hinaus im Western Blot als eine 45kDa große Isoform darstellen (Abb.18).

Unsere Arbeitsgruppen haben bereits vorher ein ähnliches Expressionsmuster des SeP in kultivierten Astrozyten beschrieben, welche SeP in Form eines nicht-glykosylierten membranassoziierten Proteins enthalten (110). Zwei intrazelluläre Isoformen des SeP mit Molekulargewichten von ca. 40kDa und ca. 45kDa wurden darüber hinaus in Adipozyten gefunden, in denen SeP für die adipogene Differenzierung benötigt wird (111).

In weiteren Versuchen zeigte sich, dass die INS-1-Zellen nicht in der Lage sind, SeP zu sezernieren (Abb. 32). Hepatozyten und Darmepithelien sezernieren im Vergleich mit den INS-1-Zellen bis zu vier reich glykosylierte SeP-Isoformen (116; 161), welche den Großteil des im Plasma zirkulierenden Selens enthalten und als Selentransporter dienen (136). Da es sich bei den INS-1-Zellen nicht um primäre Zellen im Verband der pankreatischen Inseln handelt, fehlen möglicherweise parakrine kostimulatorische Signale sowie Stimulationsfaktoren, welche *in vivo* eine Sezernierung des SeP bewirken könnten. Daher ist es möglich, dass sich die intrazelluläre Lokalisation des SeP in INS-1-Zellen von der *in vivo* Situation unterscheidet.

5.3 Regulation der SeP-Expression in pankreatischen Betazellen

5.3.1 Regulation der SeP- Expression durch Selen- und Glukoseverbindungen

Die Biosynthese der Selenoproteine ist unter anderem von der Selenverfügbarkeit abhängig (162). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Biosynthese verschiedener Selenoproteine abhängig von dieser Verfügbarkeit signifikante Unterschiede aufweist (163) und sich so eine Hierarchie der Selenoproteine ausbildet. Bei Selendepletion nehmen z.B. die Aktivität und/oder die Proteinbiosynthese der GPx1 und des SeP drastisch ab. Die verminderte Proteinsynthese korreliert bei einigen Selenoproteinen mit einer Verringerung der jeweiligen mRNA. Die Abnahme der mRNA ist dabei auf einen Stabilitätsverlust mit konsekutiver Degradierung zurückzuführen (164; 165). Hierbei sind die Selenoproteine jedoch unter gleichen Bedingungen

unterschiedlich stark betroffen. Die GPx1-mRNA fällt unter Selendepletion von allen Selenoproteinen am stärksten ab, wohingegen die GPx4 nicht durch Selen reguliert wird. Die SeP-mRNA ist in geringerem Maße als die GPx1 selenabhängig (154; 162; 166) und steht daher in der Hierarchie der Selenoproteine höher als die GPx1.

Einige der Selenoproteine reagieren unmittelbar mit einem Aktivitätsverlust auf Selendefizienz, andere Proteine bleiben bei moderatem Selenmangel relativ lange stabil und werden erst bei länger andauernden starken Selenmangel vermindert exprimiert (162). Proteine, welche nur langsam auf Veränderungen des Selengehalts reagieren, werden bei Selensättigung zeitnaher rekonvalesziert (123; 162). Daher stehen Selenoproteine mit langsamen Ansprechverhalten auf Selenmangelsituationen in der Hierarchie der Selenoproteine höher und besitzen allen Anschein nach eine bedeutendere physiologische Rolle als Selenoproteine mit schnellem Ansprechverhalten (162).

Hierzu passend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass diätetische Selenverbindungen die Gen- und Proteinexpression des SeP in INS-1-Zellen erhöhen (Abb.27 und 31). Aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse ist daher anzunehmen, dass SeP in den pankreatischen Betazellen eine bedeutende physiologische Stellung einnimmt.

Aufgrund der erhöhten hepatischen Genexpression und Sekretion des Selenoprotein P bei erhöhten Glukosekonzentrationen (126), vermuteten wir, dass Glukose ebenfalls die SeP-Expression in Betazellen beeinflussen kann. Im Gegensatz zu Hepatozyten regulierten hohe Glukosekonzentrationen von 11mM bis 22mM die SeP-Genexpression herab und verminderten die SeP-Promotoraktivität, die SeP-mRNA und Proteinlevel in INS-1-Zellen (Abb.29, 30, und). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass hohe Glukosekonzentrationen zu einer verminderten Stabilität der mRNA des SeP führen (Abb.33). Steigende Glukosekonzentrationen erhöhen bei kurzfristiger Stimulation zudem die Viabilität der INS-1-Zellen (Abb.21), bei länger andauernder Stimulation jedoch wird die Viabilität aufgrund der Glukotoxizität sinken. Übereinstimmend damit wurde zuvor gezeigt, dass die Exposition isolierter Inseln gegenüber hohen

Glukosekonzentrationen den *peroxisomal proliferator activated receptor- γ coactivator 1 α* (PGC1 α), einen transkriptionellen Koaktivator, welcher für die hohe Genexpression des SeP in Hepatozyten benötigt wird, herabreguliert (128; 167). In vorherigen Studien wurde bereits der Effekt auf die Expression verschiedener Proteine durch unterschiedlich hohe Glukosekonzentrationen untersucht. *In vitro* Experimente mit der Betazelllinie INS-1 zeigten eine verminderte Expression von Glucagon-Like-Peptid 1 (GLP-1), Gastric Inhibitory Polypeptide Receptor (GIPR) und Peroxisome Proliferator-Actived Receptor Alpha (PPAR α), wenn die Zellen mit Hochglukose stimuliert wurden (168). Dabei wurde die mRNA von GLP-1 und GIPR dosisabhängig herunterreguliert.

Durch erhöhte Glukosewerte wird konsekutiv bei den betrachteten Zeiträumen von 24 Stunden die Insulinsekretion gesteigert. In Hepatozyten konnte bereits gezeigt werden, dass Insulin die SeP-Expression herabreguliert (126). Anhaltende Hyperglykämien verursachen zudem eine Dedifferenzierung der Betazellen. Diese ist gekennzeichnet durch einen Verlust der GSIS, der erhöhten Expression glykolytischer Enzyme und verminderter Expression des Insulins und betazellspezifischer Transkriptionsfaktoren wie PDX1 (53; 169). Eine differenzierungsgesteuerte Zunahme der SeP-Level wurde bei Darmepithelen und Adipozyten beobachtet (111; 161). Daher könnte die Abnahme der pankreatischen Expression des Selenoprotein P durch hohe Glukosekonzentrationen durch Dedifferenzierung der Betazellen, induziert durch Glukotoxizität, resultieren.

In dieser Arbeit wird somit gezeigt, dass die Betazelle ein zusätzliches antioxidatives Protein, Selenoprotein P, exprimiert. Die physiologische Funktion des endogenen Selenoprotein P als antioxidatives Enzym als auch die durch exogen zugeführtes Selen induzierte vermehrte Expression antioxidativer Enzyme wie der Glutathionperoxidase könnten dazu beitragen, die negativen Konsequenzen einer gestörten Redox-Balance in pankreatischen Betazellen auf den (menschlichen) Organismus zu vermindern. Gereinigtes SeP reduziert das Phospholipid-Hydroperoxid *in vitro*, auch wenn es geringere Reaktivität als die PH-GPx aufweist (138). Endogenes SeP in Betazellen könnte daher im Schutz von Komponenten der Plasmamembran vor oxidativem Schaden eine

Rolle spielen. Da SeP bis zu zehn Selenatome enthält (136), könnte es ebenfalls als Selendonor dienen, welcher Selen für die Biosynthese von Selenoproteinen, wie z.B. GPx, bereitstellt und so die Pathogenese bzw. die Manifestation des Diabetes mellitus Typ 2 verlangsamen. Die Hemmung der SeP-Expression durch Hochglukose könnte einen Mechanismus darstellen, wie Hyperglykämie zu einer Schädigung von Betazellen führen kann.

5.3.2 Regulation der SeP-Expression durch Streptozotocin

Um den Effekt der Hyperglykämie auf die pankreatische SeP-Expression *in vivo* zu untersuchen, wurde ein Tiermodell angewandt, bei welchem Diabetes durch das Betazelltoxin Streptozotocin induziert wird. Hierzu wird den Versuchstieren Streptozotocin injiziert. Die jeweilige Dosierung ist abhängig von der Versuchstierart. Die Blutzuckerkurve verläuft nach der Injektion in einem triphasischen Muster. Nach 45 bis 60 Minuten post injectionem erfolgt initial eine Hyperglykämie, gefolgt von einer Hypoglykämie. Erst nach 30 Stunden post injectionem kommt es bei Mäusen zu einer anhaltenden progredienten Hyperglykämie. Durch mehrfache Injektionen niedrig dosiertem Streptozotocins kann dabei ein langsamer Übergang in eine prädiabetische und eine diabetische Phase beobachtet werden (170).

Die Expression der wasserstoffperoxidabbauenden Enzyme Peroxiredoxin 1 und Peroxiredoxin 2 werden durch die STZ-Behandlung erhöht (60). *In vivo* Studien an STZ-Ratten zeigten eine Aktivitätszunahme der Katalase in hepatischen Geweben (171) sowie in Erythrozyten (172). Sadi et al haben in ihren Untersuchungen keine Veränderungen der GPx und der SOD in STZ-Ratten beobachten können (173).

In dieser Arbeit konnte initial eine streptozotocininduzierte Zunahme der pankreatischen SeP-Proteinlevel beobachtet werden. Diese besteht jedoch nur bei normoglykämischen Blutglukosewerten (Abb.39). Auf längere Sicht resultieren durch die STZ-Behandlung ein progressiver Verlust an Betazellen und ansteigende Blutzuckerspiegel. Diese sind von einer Abnahme der SeP-Expression in den pankreatischen Inseln begleitet. Es ist daher anzunehmen, dass die adaptativen antioxidative Mechanismen nicht ausreichen, um den

streptozotocininduzierten Zelltod der Betazellen zu verhindern. Daher ist es denkbar, dass weitere Selenoproteine in den selenvermittelten Schutz der Betazelle vor Streptozotocin involviert sein könnten. GPx1 beispielsweise wird durch Selensupplementation induziert (146) und eine Überexpression schützt transgene Mäuse vor der STZ-induzierten Betazelldestruktion (174).

Es bleibt aber zu bedenken, dass reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies nur zu einem geringen Teil der streptozotocininduzierten Nekrosen der Betazellen beitragen, da diese hauptsächlich durch DNA-Alkylierung hervorgerufen werden (77). Die oben ausgeführten Erörterungen können die Pathogenese daher nur zum Teil erklären.

5.4 Interaktion des Selens, SeP und Diabetes mellitus Typ 2

Frühere Studien zeigen antidiabetische und insulinmimetische Effekte von Selenverbindungen, v.a. von Selenat (175): Natriumselenat stimuliert in sehr hohen Konzentrationen die Glukoseaufnahme in isolierten Ratten-Adipozyten durch Erhöhung der Translokation von Glukosetransportern zur Plasmamembran (176; 177). In neuen Studien wird jedoch gezeigt, dass eine erhöhte Selenzufuhr in bereits adäquat mit Selen versorgten Populationen das Risiko für eine Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 erhöhen kann. Sowohl zu niedrige als auch zu hohe Selenkonzentrationen können also das Risiko für einen Diabetes mellitus Typ 2 erhöhen (178). Selenit und Selenat stimulieren die pankreatische Genexpression und verstärken dadurch die Inselfunktion (179). Eine hohe Selenzufuhr steigert die Expression verschiedener Selenoproteine. Eine vermehrte Synthese von GPx1, MsrB1, SelS und SeP führen dabei zu einem erhöhten Abbau von ROS, welche sowohl für die Regulation der GSIS als auch in der Insulinsignalkaskade benötigt werden. Dies könnte über eine gesteigerte Insulinsekretion zu einer Hyperinsulinämie mit Insulinresistenz und zu einer Glukoseintoleranz führen. Zusätzlich bedingen die vermehrt exprimierten Selenoproteine eine verstärkte hepatische Glukoneogenese und Lipogenese, wodurch der Blutzucker ansteigt (180).

Darüber hinaus konnte in *in vitro* Experimenten gezeigt werden, dass Selenoprotein P die mRNA-Expression glukoneogenetischer Enzyme und dadurch den Blutzucker steigert (127). Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der SeP-mRNA und der Glukosekonzentration im Plasma. Durch Zufügen von gereinigtem SeP wurde die AMPK (adenosin-monophosphate-activated protein kinase) *in vivo* und *in vitro* vermindert phosphoryliert und das Insulinsignal verminderte sich. Konsekutiv entstand eine Insulinresistenz. Die Insulinresistenz korrelierte dabei mit der hepatischen SeP-mRNA bei den Mäusen (127). Ein *Knockdown* des SeP verbesserte die systemische Insulinsensitivität und die Glukosetoleranz *in vivo* bei Mäusen (127).

Unter hyperglykämischen Bedingungen stimuliert die Interaktion von FoxO1a und HNF4α mit dem Koaktivator PGC1α über den SeP-Promotor die SeP-Expression (128) und die Expression glukoneogenetischer Enzyme (178). Insulin wiederum inaktiviert FoxO1a, inhibiert die Transkription glukoneogenetischer Enzyme und die SeP-Expression (128; 178).

Das essentielle Spurenelement Selen besitzt verschiedene positive Effekte bezüglich der Gesundheit. Jedoch weist es ein sehr enges therapeutisches Fenster auf. Daher muss die Supplementation dieses Spurenelements eng kontrolliert werden, um unerwünschte Effekte zu vermeiden.

In verschiedenen epidemiologischen und tierexperimentellen Studien konnten in den vergangenen Jahrzehnten Korrelationen zwischen Serumseleknkonzentrationen und der Prävalenz des Diabetes mellitus Typ 2 aufgezeigt werden.

In der doppelblinden, placebokontrollierten *NPC trial* (Nutritional Prevention of Cancer) Interventionsstudie wurden den Probanden tägliche Selendosen von 200µg über einen Zeitraum von 7,5 Jahren verabreicht. Durch diese Selensupplementation erhöhte sich das relative Risiko an Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken. Allerdings korrelierte das Risiko mit der initialen Plasmaselenkonzentration. Bei Patienten, welche anfangs Selenpiegel <105µg/l im Plasma aufwiesen, veränderte die Selensupplementation nicht die Inzidenz an Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken (RR 1.03) (181). Patienten, die jedoch Selenkonzentrationen im mittleren (105-121,6µg/l) bzw. höchsten

(>121,6 µg/l) Bereich zu Beginn der Studie zeigten, besaßen nach Selensupplementation ein Risiko von 35% bzw. 140% (RR 2.4) zu erkranken (181). Die durchschnittlichen Plasmaselenkonzentrationen der Supplementationsgruppe lagen dabei im Bereich zwischen 150µg/l und 200µg/l, ein Bereich, der bezüglich der Diabetesinzidenz als kritisch zu betrachten ist (182).

Ebenfalls eine positive Korrelation zwischen Selenspiegel und Diabetesprävalenz zeigte sich in der *NHANES III* – Studie (National Health and Nutrition Examination Survey III) (183). Hier lag die Diabetesprävalenz bei Patienten mit einer Plasmaselenkonzentration von >137,7µg/l um etwa 60% höher als bei Teilnehmern, welche einen Selenspiegel >111,6µg/l aufwiesen (184). Zudem traten unter Selensupplementation in dieser und weiteren Studien am Menschen erhöhte Nüchternblutglukosewerte sowie erhöhte HbA_{1c}-Werte auf (185).

Diabetes mellitus führte im Tierexperiment und in Humanstudien zu einer Überexpression von Enzymen der mitochondrialen Atmungskette (127; 148) und zur Überexpression von PGC1 α . Da diese wiederum die SeP-Expression stimulieren, sind bei schlecht eingestellten Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 erhöhte Konzentrationen an Selen zu erwarten (186; 187).

In einer experimentellen Supplementationsstudie an Ratten konnte die positive Korrelation von Selen und abnormen Nüchternblutzuckerwerten nicht bestätigt werden. Mit Streptozotocin behandelte Versuchstiere erhielten pro Tag 80µg Selenomethionin. Als Folge wurde nach drei Monaten eine Verminderung des Nüchternblutzuckers von 50% sowie ein Anstieg der GPx1 beobachtet (188; 189). Es ist davon auszugehen, dass durch die Supplementierung mit Selenomethionin eine Steigerung der SeP-Expression in den pankreatischen Betazellen dieser Ratten erfolgte und die Selensupplementation eine protektive Wirkung gegen die Zerstörung der Betazellen durch STZ bewirkte.

Ein ähnlicher Effekt konnte in dieser Arbeit in *in vitro* Experimenten gezeigt werden. Durch die Zugabe von Selenverbindungen erhöhte sich die SeP-mRNA-Expression unter hypo- und normoglykämischen Umständen signifikant (Abb. 29). Unter hyperglykämischen Bedingungen konnte dieser Anstieg jedoch

nicht mehr beobachtet werden. Positive Effekte der Selensupplementation könnten daher auf normoglykämische Zustände begrenzt sein.

Es stellt sich die Frage, inwieweit die Selenkonzentration und Selenoprotein P v.a. den Kohlenhydratstoffwechsel weiter beeinflussen können. Gerade im Bereich der westlichen Welt ist die Selensupplementation durch Nahrungsergänzungsmittel weit verbreitet und könnte so einen Einfluss auf die Epidemiologie des Diabetes mellitus Typ 2 besitzen (190). Die Ergebnisse der bisher durchgeführten Studien zur Selensupplementation belegen, dass eine Optimierung der Selenzufuhr notwendig ist. Zwar kann Selen protektive Effekte bezüglich diverser Erkrankungen wie z.B. Karzinome bewirken, jedoch kann eine überhöhte Selensupplementation zu adversen Effekte wie z.B. zu einer erhöhten Inzidenz an Diabetes mellitus Typ 2 führen. Die weiteren Effekte der Selensupplementation und des Selenoprotein P auf die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 müssen daher in folgenden Studien weiter untersucht werden. Die gesättigte Plasmakonzentration des SeP könnte als Referenz dienen, da es als Biomarker für den humanen Selenstatus betrachtet wird.

Obwohl der unselektive Einsatz von Selensupplementation in den verschiedenen Bevölkerungen kritisch zu betrachten ist, gibt es dennoch spezifische Bevölkerungsgruppen, welche von einer Selensupplementation profitieren könnten. Dabei handelt es sich vor allem um Populationen mit geringem Selengehalt in ihren Böden und Nahrungsmitteln wie z.B. die serbische Bevölkerung (178). Ebenso könnte die Selensupplementation bei Subgruppen mit geringen antioxidativen Kapazitäten oder chronischen Erkrankungen wie z.B. HIV und chronischen Nierenerkrankungen von Bedeutung sein (94). Dies muss jedoch noch weiter untersucht werden.

Die Assoziation zwischen Selen und kardiometabolischen Endpunkten könnte eine u-förmige Korrelation zeigen. Selenkonzentrationen sowohl unterhalb als auch oberhalb des physiologischen Bereich der optimalen Aktivität der Selenoproteine könnten Schäden verursachen (191; 192; 193). Derartige Zusammenhänge wurden vermehrt bei Nahrungsmitteln beobachtet (194).

6 Schlussfolgerungen

Diese Arbeit belegt die Expression des Selenoprotein P in pankreatischen Betazellen von Nagetieren und des Menschen. Mittels *Realtime*-PCR und *Western Blot* konnte die SeP-mRNA bzw. die Proteinexpression in primären Rattengeweben nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass SeP-mRNA im Pankreas der Ratte vergleichsweise höher exprimiert wird als das Selenoenzym GPx1.

In der Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1 konnte die SeP-Expression bestätigt werden. Der Gehalt an SeP-mRNA der INS-1-Zellen betrug im Vergleich zur SeP-Expression in Hepatozyten 28%, der Gehalt der Alpha-Zelllinie INR1G9 8%. Im *Western Blot* zeigte sich die 45kDa große Isoform des SeP. Mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz konnte die Expression des SeP ebenfalls in murinen und humanen Langerhans'schen Inseln nachgewiesen werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich die Expression auf den endokrinen Anteil des Pankreas beschränkt. SeP befindet sich dort sowohl in Alpha- als auch in Betazellen.

Die Biosynthese vieler Selenoproteine ist abhängig von einer ausreichenden Selenversorgung. Selenat, Selenit und Selenomethionin regulierten die SeP-Genexpression in den INS-1-Zellen bei Kultivierung im Medium mit 5mM Glukose signifikant herauf. Durch Stimulation mit 1 μ M Selenat konnte dabei ein 2,8facher Anstieg der SeP-mRNA-Expression beobachtet werden. Hohe Glukosekonzentrationen supprimierten dosisabhängig den seleninduzierten Anstieg der SeP-Genexpression in INS-1-Zellen. Die verminderte SeP-Expression bei hohen Glukosekonzentrationen konnte an isolierten murinen Inseln bestätigt werden. Tendenziell wurde eine Inhibition der SeP-Expression in INS-1-Zellen durch hohe Glukosekonzentrationen auch im *Western Blot* bestätigt. Diese Ergebnisse waren jedoch aufgrund einer hohen Standardabweichung nicht signifikant. Andere untersuchte Proteine wie die GPx1 und PGC1 α wurden durch Selen oder Glukose in ihrer Expression nicht beeinflusst. Die SeP-Promotoraktivität wurde durch Selen nicht signifikant verändert. Hochglukose jedoch (11mM oder 16,7mM) inhibierte die SeP-

Promotoraktivität signifikant, wenn diese in Kombination mit Selenat zur Stimulation verwendet wurde. In Versuchen mit Aktinomycin D konnte gezeigt werden, dass durch hohe Glukoseverbindungen die SeP-mRNA vermehrt destabilisiert wird.

In STZ-behandelten Mäusen, welche abnorm hohe Nüchternblutzuckerwerte aufwiesen, wurde SeP initial bei einer prädiabetischen Phase vermehrt exprimiert. Mit zunehmendem Untergang der Betazellmasse und steigenden Blutzuckerwerten bei einer diabetischen Stoffwechsellage verminderte sich die pankreatische SeP-Expression.

Die erhobenen Daten weisen darauf hin, dass Selenoprotein P eine Rolle im antioxidativen Schutz der Betazellen besitzen könnte. Verglichen mit anderen antioxidativen Enzymen (z.B. Glutathionperoxidasen) ist Selenoprotein P in den Betazellen des Pankreas hoch exprimiert und könnte daher in deren basalen Schutz vor Beschädigung durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) involviert sein. Die Suppression unter hyperglykämischen Bedingungen könnte zum Betazellverfall und Betazellverlust in der Rolle der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 beitragen.

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Deutsche Diabetes Gesellschaft. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. *Evidenzbasierte Leitlinien*. **2011**.
2. Deutsche Diabetes Gesellschaft. Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland. *Evidenzbasierte Leitlinien*. **2004**.
3. Shaw, J. E. , Sicree, R. A. und Zimmet, PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. **2010**, S. 4-14.
4. Triplitt, C. L. Examining the mechanisms of glucose regulation. *Am J Manag Care*. **2012**, S. 4-10.
5. Whiting, DR, et al. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. **2011**, S. 311-321.
6. Häring, H.-U. und Artunc, F. H. *Diabetologie in Klinik und Praxis: 195 Tabellen*. Stuttgart : Thieme, **2011**.
7. Gerich, J. E. . Physiology of glucose homeostasis. *Diabetes Obes Metab*. **2000**, S. 345-350.
8. Stumvoll, M., et al. Renal glucose production and utilization: new aspects in humans. *Diabetologia*. **1997**, S. 749-757.
9. DeFronzo, RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am*. Juli **2004**, S. 787-835.
10. Bryant, NJ, Govers, R und James, DE. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2002**, S. 267-277.
11. Guyton, A.C. und Hall, J. E. *Textbook of medical physiology*. Philadelphia : Elsevier Saunders, **2006**.
12. Wright, EM, Hirayama, BA und Loo, DF. Active sugar transport in health and disease. *J Intern Med*. **2007**, S. 32-43.

13. Tortora, G. J. und Grabowski, S. R. *Principles of anatomy and physiology*. New York : Wiley, **2003**.
14. Hoffman, B.B. und Lefkowitz, R.J. *Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists*. 10. New York : McGraw-Hill, **2001**. S. 215-268.
15. Becker, LB. *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, **2001**. S. 751-762.
16. De Vos, A, et al. Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J Clin Invest*. **1995**, S. 2489-2495.
17. McCulloch, LJ, et al. GLUT2 (SLC2A2) is not the principal glucose transporter in human pancreatic beta cells: implications for understanding genetic association signals at this locus. *Mol Genet Metab*. **2011**, S. 648-653.
18. Mislér, S, et al. Electrophysiology of stimulus-secretion coupling in human beta-cells. *Diabetes*. **1992**, S. 1221-1228.
19. Mislér, S, et al. Metabolite-regulated ATP-sensitive K⁺ channel in human pancreatic islet cells. *Diabetes*. **1989**, S. 422-427.
20. Barnett, DW, Pressel, DM und Mislér, S. Voltage-dependent Na⁺ and Ca²⁺ currents in human pancreatic islet beta-cells: evidence for roles in the generation of action potentials and insulin secretion. *Pflugers Arch*. **1995**, S. 272-282.
21. Rorsman, P und Braun, M. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annu Rev Physiol*. **2013**, S. 155-179.
22. Herrington, J. Gating modifier peptides as probes of pancreatic beta-cell physiology. *Toxicon*. **2007**, S. 231-238.
23. Braun, M, et al. Somatostatin release, electrical activity, membrane currents and exocytosis in human pancreatic delta cells. *Diabetologia*. **2009**, S. 1566-1578.
24. Bosco, D, et al. Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans. *Diabetes*. **2010**, S. 1202-1210.

25. Walsh, KB. Targeting GIRK Channels for the Development of New Therapeutic Agents. *Front Pharmacol.* **2011**, S. 64.
26. Rodriguez-Diaz, R, et al. Alpha cells secrete acetylcholine as a non-neuronal paracrine signal priming beta cell function in humans. *Nat Med.* **2011**, S. 888-892.
27. Holst, JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev.* **2007**, S. 1409-1439.
28. Braun, M, et al. Exocytotic properties of human pancreatic beta-cells. *Ann N Y Acad Sci.* **2009**, S. 187-193.
29. Wang, Z, et al. Glucagon-like peptide-1 is a physiological incretin in rat. *J Clin Invest.* **1995**, S. 417-421.
30. Kim, W und Egan, JM. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacol Rev.* **2008**, S. 470-512.
31. Lee, YS und Jun, HS. Anti-diabetic actions of glucagon-like peptide-1 on pancreatic beta-cells. *Metabolism.* **2013**, S. 9-19.
32. Weyer, C, et al. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest.* **1999**, S. 787-794.
33. Hellman, B. The frequency distribution of the number and volume of the islets Langerhans in man. *Acta Soc Med Ups.* **1959**, S. 432-460.
34. Cabrera, O, et al. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2006**, S. 2334-2339.
35. Jansson, L und Hellerström, C. Glucose-induced changes in pancreatic islet blood flow mediated by central nervous system. *Am J Physiol.* **1986**, S. 644-647.
36. Bonner-Weir, S und O'Brien, TD. Islets in type 2 diabetes: in honor of Dr. Robert C. Turner. *Diabetes.* **2008**, S. 2889-2904.

37. Saisho, Y, et al. Pancreas volumes in humans from birth to age one hundred taking into account sex, obesity, and presence of type-2 diabetes. *Clin Anat.* **2007**, S. 933-942.
38. Bouwens, L und Klöppel, G. Islet cell neogenesis in the pancreas. *Virchows Arch.* **1996**, S. 553-560.
39. Bonner-Weir, S. Life and death of the pancreatic beta cells. *Trends Endocrinol Metab.* **2000**, S. 375-378.
40. Butler, AE, et al. Increased beta-cell apoptosis prevents adaptive increase in beta-cell mass in mouse model of type 2 diabetes: evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid. *Diabetes.* **2003**, S. 2304-2314.
41. Weir, GC, et al. Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes.* **2001**, S. 151-159.
42. Dickson, LM und Rhodes, CJ. Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2004**, S. 192-198.
43. Bonner-Weir, S. Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth. *Endocrinology.* **2000**, S. 1926-1929.
44. Lingohr, MK, Buettner, R und Rhodes, CJ. Pancreatic beta-cell growth and survival--a role in obesity-linked type 2 diabetes. *Trends Mol Med.* **2002**, S. 375-384.
45. Klöppel, G, et al. Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv Synth Pathol Res.* **1985**, S. 110-125.
46. Saito, K, Yaginuma, N und Takahashi, T. Differential volumetry of A, B and D cells in the pancreatic islets of diabetic and nondiabetic subjects. *Tohoku J Exp Med.* **1979**, S. 273-283.
47. Butler, AE, et al. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes.* **2003**, S. 102-110.
48. Unger, RH und Zhou, YT. Lipotoxicity of beta-cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover. *Diabetes.* **2001**, S. 118-121.

49. Lenzen, S. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem Soc Trans.* **2008**, S. 343-347.
50. Sies, H und Cadenas, E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **1985**, S. 617-631.
51. Sies, H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem.* **1993**, S. 213-219.
52. Poitout, V und Robertson, RP. Glucolipototoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev.* **2008**, S. 351-366.
53. Kim JW und Yoon, KH. Glucolipototoxicity in Pancreatic β -Cells. *Diabetes Metab J.* **2011**, S. 444-450.
54. Newsholme, P, et al. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol.* **2007**, S. 9-24.
55. Tiedge, M, et al. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes.* **1997**, S. 1733-1742.
56. Tang, C, et al. Evidence for a role of superoxide generation in glucose-induced beta-cell dysfunction in vivo. *Diabetes.* **2007**, S. 2722-2731.
57. Nishikawa, T, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* **2000**, S. 787-790.
58. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* **2001**, S. 813-820.
59. McCord, JM und Fridovich, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* **1969**, S. 6049-6055.
60. Bast, A, et al. Oxidative and nitrosative stress induces peroxiredoxins in pancreatic beta cells. *Diabetologia.* **2002**, S. 867-876.
61. Li, X, Chen, H und Epstein, PN. Metallothionein and catalase sensitize to diabetes in nonobese diabetic mice: reactive oxygen species may have a protective role in pancreatic beta-cells. *Diabetes.* **2006**, S. 1592-1604.

62. Wang, XD, et al. Molecular mechanisms for hyperinsulinaemia induced by overproduction of selenium-dependent glutathione peroxidase-1 in mice. *Diabetes*. **2008**, S. 1515-1524.
63. Pi, J, et al. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*. **2007**, S. 1783-1791.
64. Lei, XG und Vatamaniuk, MZ. Two tales of antioxidant enzymes on β cells and diabetes. *Antioxid Redox Signal*. **2011**, S. 489-503.
65. Mysore, TB, et al. Overexpression of glutathione peroxidase with two isoforms of superoxide dismutase protects mouse islets from oxidative injury and improves islet graft function. *Diabetes*. **2005**, S. 2109-2116.
66. Harmon, JS, et al. beta-Cell-specific overexpression of glutathione peroxidase preserves intranuclear MafA and reverses diabetes in db/db mice. *Endocrinology*. **2009**, S. 4855-4862.
67. Laybutt, DR, et al. Increased expression of antioxidant and antiapoptotic genes in islets that may contribute to beta-cell survival during chronic hyperglycemia. *Diabetes*. **2002**, S. 413-423.
68. Rolo, AP und Palmeira, CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. **2006**, S. 167-178.
69. Maechler, P, Jornot, L und Wollheim, CB. Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem*. **1999**, S. 27905-27913.
70. Lowell, BB und Shulman, GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science*. **2005**, S. 384-387.
71. Grankvist, K, Marklund, SL und Täljedal, IB. CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem J*. **1981**, S. 393-398.
72. Choi, SW, et al. Acute hyperglycemia and oxidative stress: direct cause and effect? *Free Radic Biol Med*. **2008**, S. 1217-1231.

73. Fridlyand, LE und Philipson, LH. Does the glucose-dependent insulin secretion mechanism itself cause oxidative stress in pancreatic beta-cells? *Diabetes*. **2004**, S. 1942-1948.
74. Ishii, H, et al. Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science*. **1996**, S. 728-731.
75. Kuboki, K, et al. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. *Circulation*. **2000**, S. 676-681.
76. Elsner, M, Tiedge, M und Lenzen, S. Mechanism underlying resistance of human pancreatic beta cells against toxicity of streptozotocin and alloxan. *Diabetologia*. **2003**, S. 1713-1714.
77. Lenzen, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. **2008**, S. 216-226.
78. Karunanayake, EK, et al. Autoradiographic study of the distribution and cellular uptake of (¹⁴C)-streptozotocin in the rat. *Diabetologia*. **1976**, S. 123-128.
79. Tjälve, H, Wilander, E und Johansson, EB. Distribution of labelled streptozotocin in mice: uptake and retention in pancreatic islets. *J Endocrinol*. **1976**, S. 455-456.
80. Schnedl, WJ, et al. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes*. **1994**, S. 1326-1333.
81. Wang, Z und Gleichmann, H. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes*. **1998**, S. 50-56.
82. Ledoux, SP und Wilson, GL. Effects of streptozotocin on a clonal isolate of rat insulinoma cells. *Biochim Biophys Acta*. **1984**, S. 387-392.
83. LeDoux, SP, et al. Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell damage. Alterations in DNA. *Diabetes*. **1986**, S. 866-872.

84. Wilson, GL, et al. Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell damage. Activation of poly (ADP-ribose) synthetase and cellular distribution. *Diabetes*. **1988**, S. 213-216.
85. Konrad, RJ und Kudlow, JE. The role of O-linked protein glycosylation in beta-cell dysfunction. *Int J Mol Med*. **2002**, S. 535-539.
86. Yamamoto, H, Uchigata, Y und Okamoto, H. DNA strand breaks in pancreatic islets by in vivo administration of alloxan or streptozotocin. *Biochem Biophys Res Commun*. **1981**, S. 1014-1020.
87. Uchigata, Y, et al. Protection by superoxide dismutase, catalase, and poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan- and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. *J Biol Chem*. **1982**, S. 6084-6088.
88. Strandell, E, et al. Functional characteristics of cultured mouse pancreatic islets following exposure to different streptozotocin concentrations. *Mol Cell Endocrinol*. **1988**, S. 83-91.
89. Schwarz, K, et al. Prevention of exudative diathesis in chicks by factor 3 and selenium. *Proc Soc Exp Biol Med*. **1957**, S. 621-625.
90. Schwarz, K und Foltz, CM. Factor 3 activity of selenium compounds. *J Biol Chem*. **1958**, S. 245-251.
91. Flohe, L, Günzler, WA und Schock, HH. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett*. **1973**, S. 132-134.
92. Rotruck, JT, et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*. **1973**, S. 588-590.
93. Krzykow, GV, et al. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*. **2003**, S. 1439-1443.
94. Fairweather-Tait, SJ, et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Antioxid Redox Signal*. **2011**, S. 1337-1383.
95. Alfthan, G und Neve, J. Reference values for serum selenium in various areas-evaluated according to the TRACY protocol. *J Trace Elem Med Biol*. **1996**, S. 77-87.

96. Rayman, MP. The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up? *Br J Nutr.* **2004**, S. 557-573.
97. —. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proc Nutr Soc.* **2005**, S. 527-542.
98. Ganther, HE. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis.* **1999**, S. 1657-1666.
99. Kajander, EO, et al. Metabolism, cellular actions, and cytotoxicity of selenomethionine in cultured cells. *Biol Trace Elem Res.* **1991**, S. 57-68.
100. Esaki, N, et al. Selenocysteine lyase, a novel enzyme that specifically acts on selenocysteine. Mammalian distribution and purification and properties of pig liver enzyme. *J Biol Chem.* **1982**, S. 4386-4391.
101. Suzuki, KT, et al. Selenosugar and trimethylselenonium among urinary Se metabolites: dose- and age-related changes. *Toxicol Appl Pharmacol.* **2005**, S. 1-8.
102. Bansal, MP, et al. Evidence for two selenium-binding proteins distinct from glutathione peroxidase in mouse liver. *Carcinogenesis.* **1989**, S. 541-546.
103. Chang, PW, et al. Isolation, characterization, and chromosomal mapping of a novel cDNA clone encoding human selenium binding protein. *J Cell Biochem.* **1997**, S. 217-224.
104. Papp, LV, et al. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal.* **2007**, S. 775-806.
105. Bösl, MR, et al. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (*Trsp*). *Proc Natl Acad Sci USA.* **1997**, S. 5531-5534.
106. Herrman, JL. The properties of a rat serum protein labelled by the injection of sodium selenite. *Biochim Biophys Acta.* **1977**, S. 61-70.
107. Motsenbocker, MA und Tappel, AL. A selenocysteine-containing selenium-transport protein in rat plasma. *Biochim Biophys Acta.* **1982**, S. 147-153.

108. Burk, RF und Hill, KE. Selenoprotein P. A selenium-rich extracellular glycoprotein. *J Nutr.* **1994**, S. 1891-1897.
109. Burk, RF, et al. Selenoprotein P associates with endothelial cells in rat tissues. *Histochem Cell Biol.* **1997**, S. 11-15.
110. Steinbrenner, H, et al. Involvement of selenoprotein P in protection of human astrocytes from oxidative damage. *Free Radic Biol Med.* **2006**, S. 1513-1523.
111. Zhang, Y und Chen, X. Reducing selenoprotein P expression suppresses adipocyte differentiation as a result of increased preadipocyte inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2011**, S. 77-85.
112. Carlson, BA, et al. Specific excision of the selenocysteine tRNA[Ser]Sec (Trsp) gene in mouse liver demonstrates an essential role of selenoproteins in liver function. *J Biol Chem.* **2004**, S. 8011-8017.
113. Burk, RF und Hill, KE. Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annu Rev Nutr.* **2005**, S. 215-235.
114. Stoytcheva, Z, et al. Efficient incorporation of multiple selenocysteines involves an inefficient decoding step serving as a potential translational checkpoint and ribosome bottleneck. *Mol Cell Biol.* **2006**, S. 9177-9184.
115. Akesson, B und Martensson, B. Chromatography of selenoproteins in human serum using matrix-bound heparin. *Int J Vitam Nutr Res.* **1991**, S. 72-76.
116. Ma, S, et al. Mass spectrometric characterization of full-length rat selenoprotein P and three isoforms shortened at the C terminus. *J Biol Chem.* **2002**, S. 12749-12754.
117. Brigelius-Flohé, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med.* **1999**, S. 951-965.
118. Schweizer, U, et al. Hepatically derived selenoprotein P is a key factor for kidney but not for brain selenium supply. *Biochem J.* **2005**, S. 221-226.
119. Behne, D und Kyriakopoulos, A. Mammalian selenium-containing proteins. *Annu Rev Nutr.* **2001**, S. 453-473.

120. Bradshaw, TD, et al. Elucidation of thioredoxin as a molecular target for antitumor quinols. *Cancer Res.* **2005**, S. 3911-3919.
121. Dreher, I, Jakobs, TC und Köhrle, J. Cloning and characterization of the human selenoprotein P promoter. Response of selenoprotein P expression to cytokines in liver cells. *J Biol Chem.* **1997**, S. 29364-29371.
122. Steinert, P, Bächner, D und Flohé, L. Analysis of the mouse selenoprotein P gene. *Biol Chem.* **1998**, S. 683-691.
123. Renko, K, et al. Down-regulation of the hepatic selenoprotein biosynthesis machinery impairs selenium metabolism during the acute phase response in mice. *FASEB J.* **2009**, S. 1758-1765.
124. Mostert, V, Lombeck, I und Abel, J. A novel method for the purification of selenoprotein P from human plasma. *Arch Biochem Biophys.* **1998**, S. 326-330.
125. Walter, PL, et al. Stimulation of selenoprotein P promoter activity in hepatoma cells by FoxO1a transcription factor. *Biochem Biophys Res Commun.* **2008**, S. 316-321.
126. Speckmann, B, Sies, H und Steinbrenner, H. Attenuation of hepatic expression and secretion of selenoprotein P by metformin. *Biochem Biophys Res Commun.* **2009**, S. 158-163.
127. Misu, H, et al. A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metabol.* **2010**, S. 483-495.
128. Speckmann, B, et al. Selenoprotein P expression is controlled through interaction of the coactivator PGC-1alpha with FoxO1a and hepatocyte nuclear factor 4alpha transcription factors. *Hepatology.* **2008**, S. 1998-2006.
129. Formenko, DE und Gladyshev, VN. Identity and functions of CxxC-derived motifs. *Biochemistry.* **2003**, S. 11214-11225.
130. Saito, Y, et al. Domain structure of bi-functional selenoprotein P. *Biochem J.* **2004**, S. 841-846.
131. Saito, Y, et al. Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein p. *J Biol Chem.* **1999**, S. 2866-2871.

132. Traulsen, H, et al. Selenoprotein P protects low-density lipoprotein against oxidation. *Free Radic Res.* **2004**, S. 123-128.
133. Sies, H und Arteel, GE. Interaction of peroxynitrite with selenoproteins and glutathione peroxidase mimics. *Free Radic Biol Med.* **2000**, S. 1451-1455.
134. Burk, RF, et al. Pathogenesis of diquat-induced liver necrosis in selenium-deficient rats: assessment of the roles of lipid peroxidation and selenoprotein P. *Hepatology.* **1995**, S. 561-569.
135. Atkinson, JB, Hikk, KE und Burk, RF. Centrilobular endothelial cell injury by diquat in the selenium-deficient rat liver. *Lab Invest.* **2001**, S. 193-200.
136. Burk, RF und Hill, KE. Selenoprotein P-expression, functions, and roles in mammals. *Biochim Biophys Acta.* **2009**, S. 1441-1447.
137. Hill, KE, et al. Neurological dysfunction occurs in mice with targeted deletion of the selenoprotein P gene. *J Nutr.* **2004**, S. 157-161.
138. Takebe, G, et al. A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *J Biol Chem.* **2002**, S. 41254-41258.
139. Niwa, H, et al. Identification of pancreatic beta cell-related genes by representational difference analysis. *Endocrinology.* **1997**, S. 1419-1426.
140. Arteel, GE, et al. Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration. *Biol Chem.* **1998**, S. 1201-1205.
141. Asfari, M, et al. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology.* **1986**, S. 167-178.
142. Twigger, SN, et al. The Rat Genome Database, update 2007--easing the path from disease to data and back again. *Nucleic Acids Res.* **2007**, S. 658-662.
143. Köhrle, J, et al. Selenium, the thyroid, and the endocrine system. *Endocr Rev.* **2005**, S. 944-984.
144. Lee, SR, et al. Spatiotemporal expression of the selenoprotein P gene in postimplantational mouse embryos. *Int J Dev Biol.* **2008**, S. 1005-1011.

145. Hoffmann, PR, et al. The selenoproteome exhibits widely varying, tissue-specific dependence on selenoprotein P for selenium supply. *Nucleic Acids Res.* **2007**, S. 3963-3973.
146. Steinbrenner, H und Sies, H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochim Biophys Acta.* **2009**, S. 1478-1485.
147. Hoefig, CS, et al. Comparison of different selenocompounds with respect to nutritional value vs. toxicity using liver cells in culture. *J Nutr Biochem.* **2011**, S. 945-955.
148. Yoon, JC, et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature.* **2001**, S. 131-138.
149. Nielsen, DA, et al. Control of insulin gene expression in pancreatic beta-cells and in an insulin-producing cell line, RIN-5F cells. I. Effects of glucose and cyclic AMP on the transcription of insulin mRNA. *J Biol Chem.* **1985**, S. 13585-13589.
150. Nukatsuka, M, et al. Enhancement by streptozotocin of O₂- radical generation by the xanthine oxidase system of pancreatic beta-cells. *FEBS Lett.* **1988**, S. 295-298.
151. Turk, J, et al. Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun.* **1993**, S. 1458-1464.
152. Matthews, DR, et al. UKPDS 26: Sulphonylurea failure in non-insulin-dependent diabetic patients over six years. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Diabet Med.* **1998**, S. 297-303.
153. Donath, MY, et al. Mechanisms of beta-cell death in type 2 diabetes. *Diabetes.* **2005**, S. 108-113.
154. Brigelius-Flohé, R und Maiorino, M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta.* **2013**, S. 3289-3303.
155. Ling, Z, et al. Effects of chronically elevated glucose levels on the functional properties of rat pancreatic beta-cells. **1996**, S. 1774-1782.

156. Khaldi, MZ, et al. Increased glucose sensitivity of both triggering and amplifying pathways of insulin secretion in rat islets cultured for 1 wk in high glucose. **2004**, S. 207-217.
157. Spallholz, JE. Free radical generation by selenium compounds and their prooxidant toxicity. *Biomed Environ Sci.* **1997**, S. 260-270.
158. Mueller, AS und Pallauf, J. 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.* **2006**, S. 548-560.
159. Campbell, SC, et al. Selenium stimulates pancreatic beta-cell gene expression and enhances islet function. *FEBS Lett.* **2008**, S. 2333-2337.
160. Steinbrenner, H. Interference of selenium and selenoproteins with the insulin-regulated carbohydrate and lipid metabolism. *Free Radic Biol Med.* **2013**, S. 1538-1547.
161. Speckmann, B, et al. Proinflammatory cytokines down-regulate intestinal selenoprotein P biosynthesis via NOS2 induction. *Free Radic Biol Med.* **2010**, S. 777-785.
162. Schomburg, L und Schweizer, U. Hierarchical regulation of selenoprotein expression and sex-specific effects of selenium. *Biochim Biophys Acta.* **2009**, S. 1453-1462.
163. Driscoll, DM und Copeland, PR. Mechanism and regulation of selenoprotein synthesis. *Annu Rev Nutr.* **2003**, S. 17-40.
164. Christensen, MJ und Burgener, KW. Dietary selenium stabilizes glutathione peroxidase mRNA in rat liver. *J Nutr.* **1992**, S. 1620-1626.
165. Bermano, G, Arthur, JR und Hesketh, JE. Selective control of cytosolic glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase mRNA stability by selenium supply. *FEBS Lett.* **1996**, S. 157-160.
166. Barnes, KM, et al. 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.* **2009**, S. 199-206.

167. Zhang, P, et al. Free fatty acids increase PGC-1alpha expression in isolated rat islets. *FEBS Lett.* **2005**, S. 1446-1452.
168. Pan, Q. R., et al. Glucose, Metformin, and AICAR Regulate the Expression of G Protein-coupled Receptor Members in INS-1 beta Cell. **2009**, S. 799-804.
169. Weir, GC und Bonner-Weir, S. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes.* **2004**, S. 16-21.
170. Rerup, CC. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev.* **1970**, S. 485-518.
171. Andallu, B und Varadacharyulu, NCh. Antioxidant role of mulberry (*Morus indica* L. cv. Anantha) leaves in streptozotocin-diabetic rats. *Clin Chim Acta.* **2002**, 3-10.
172. Qujeq, D. Catalase (antioxidant enzyme) activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Diabetes & Metabolism.* **2007**, S. 22-24.
173. Sadi, G und Güray, T. Gene expressions of Mn-SOD and GPx-1 in streptozotocin-induced diabetes: effect of antioxidants. *Mol Cell Biochem.* **2009**, S. 127-134.
174. Harmon, JS, et al. beta-Cell-specific overexpression of glutathione peroxidase preserves intranuclear MafA and reverses diabetes in db/db mice. *Endocrinology.* **2009**, 4855-4862.
175. Stapleton, SR. Selenium: an insulin-mimetic. *Cell Mol Life Sci.* **2000**, S. 13-14.
176. Hej, YJ, et al. Stimulation of MAP kinase and S6 kinase by vanadium and selenium in rat adipocytes. *Mol Cell Biochem.* **1998**, S. 367-375.
177. Ezaki, O. The insulin-like effects of selenate in rat adipocytes. *J Biol Chem.* **1990**, S. 1124-1128.
178. Rayman, MP und Stranges, S. Epidemiology of selenium and type 2 diabetes: Can we make sense of it? *Free Radic Biol Med.* **2013**, S. 1557-1564.
179. Campbell, SC, et al. Selenium stimulates pancreatic beta-cell gene expression and enhances islet function. *FEBS Lett.* **2008**, S. 2333-2337.

180. Zhou, J, Huang, K und Lei, XG. Selenium and diabetes-evidence from animal studies. *Free Radic Biol Med.* **2013**, S. 1548-1556.
181. Stranges, S, et al. Effects of long-term selenium supplementation on the incidence of type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann Intern Med.* **2007**, S. 217-223.
182. Clark, LC, et al. 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.* **1996**, S. 1957-1963.
183. Laclaustra, M, et al. Serum selenium concentrations and hypertension in the US Population. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes.* **2009**, S. 369-376.
184. Bleys, J, Navas-Acien, A und Guallar, E. Selenium and diabetes: more bad news for supplements. *Ann Intern Med.* **2007**, S. 271-272.
185. Czernichow, S, et al. 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.* **2006**, S. 395-399.
186. Cser, A, et al. Selenium status and lipoproteins in healthy and diabetic children. *J Trace Elem Electrolytes Health Diss.* **1993**, S. 205-210.
187. Zwirska-Korczala, K, et al. Assessment of blood superoxide dismutase, glutathione peroxidase activity and malondialdehyde concentration as oxidation status parameters in obese women. *Pol Arch Med Wewn.* **2003**, S. 725-731.
188. Erbayraktar, Z, et al. Effects of selenium supplementation on antioxidant defense and glucose homeostasis in experimental diabetes mellitus. *Biol Trace Elem Res.* **2007**, S. 217-226.
189. Becker , DJ, et al. Oral selenate improves glucose homeostasis and partly reverses abnormal expression of liver glycolytic and gluconeogenic enzymes in diabetic rat. **1996**, 39, S. 3-11.
190. Combs, GF Jr. Selenium in global food systems. *Br J Nutr.* **2001**, S. 517-547.

191. Chiang, EC, et al. Defining the Optimal Selenium Dose for Prostate Cancer Risk Reduction: Insights from the U-Shaped Relationship between Selenium Status, DNA Damage, and Apoptosis. *Dose Reponse*. **2009**, S. 285-300.
192. Stranges, S, et al. Selenium status and cardiometabolic health: state of the evidence. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. **2010**, S. 754-760.
193. Rayman, MP, et al. A randomized trial of selenium supplementation and risk of type-2 diabetes, as assessed by plasma adiponectin. *PLoS One*. **2012**.
194. Hayes, DP. Adverse effects of nutritional inadequacy and excess: a hormetic model. *Am J Clin Nutr*. 2008, S. 578-581.
195. Ip, C. Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. *J Nutr*. 1998, S. 1845-1854.
196. Hatfield, DL und Gladyshev, VN. How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol Cell Biol*. 2002, S. 3565-3576.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Anna-Lena Hotze